

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas**

**Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de
efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*
resistente ao imipenem**

Patrícia Regina Neves

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Elsa Masae Mamizuka
Co-orientador:
Prof. Dr. Nilton Lincopan**

**São Paulo
2010**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas**

Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem

Patrícia Regina Neves

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Elsa Masae Mamizuka
Co-orientador:
Prof. Dr. Nilton Lincopan**

**São Paulo
2010**

Patrícia Regina Neves

Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Prof^a. Dr^a. Elsa Masae Mamizuka
orientadora/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

À minha família pelo amor, apoio e
incentivo em todos os momentos...
e a DEUS por mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, pela oportunidade, acolhimento, dedicação, paciência, ensinamentos pessoais e exemplo de seriedade profissional. Saiba da minha grande admiração, meu respeito e meu carinho por você.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Nilton Lincopan, pelos ensinamentos constantes, generosidade, paciência, incentivo e estímulo à pesquisa. Saiba da minha consideração, meu respeito, admiração e amizade por você.

À Profa. Dra. Maria Teresa Destro pelas contribuições em meu exame de qualificação e por disponibilizar inúmeras vezes o software para confecção do dendrograma.

À Profa. Dra. Ana Sara Levin pela leitura cuidadosa e sugestões em meu exame de qualificação.

Às Profas. Dra. Sílvia Figueiredo Costa, Dra. Ana Gales e ao Dr. Jorge Sampaio por gentilmente ceder as cepas controle e pelas contribuições ao desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Levy e ao Dr. Mário Noronha pelo fornecimento dos isolados.

Aos Profs. Dr. Sandro Almeida, Dra. Irene Soares, Dra. Sílvia Berlanga, Dr. Mário e Dra. Rosário Hirata, Dra. Marina Martinez, Dra. Ana Campa e Dra. Dulcinéia Abdalla pela disponibilização de equipamentos necessários à conclusão desse trabalho.

Ao pessoal do laboratório, Andyara, John, Juliana, Rafael, Charline, Monica, Álvaro, Lara, Lílian, Francielle, Mariama, Ketrin, Juan, Lívia, Manú, Jacinta, pela amizade e por amenizar os momentos de tensão.

Às funcionárias da secretaria do bloco 17, Ana Dantas, Edna, Sueli e Dora, pelos auxílios prestados inúmeras vezes durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Elaine e ao Jorge, funcionários da secretaria de pós-graduação pelos diversos atendimentos prestados, além do apoio e atenção.

Aos funcionários do departamento e a todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.

À FAPESP, pela bolsa concedida e auxílio financeiro (06/54334-3).

À Adriana Pereira, por me receber inúmeras vezes em sua casa para discussão dos resultados.

Aos meus pais, João e Célia, meus irmãos, Marco e Fernando, minhas cunhadas, Elaine e Alessandra e a meus sobrinhos, Caroline e Rodrigo pelo constante amor, carinho, apoio e incentivo a todos os meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível.

RESUMO

NEVES, P. Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem. 100f. **Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2010.

Introdução: Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes estão associados a elevadas taxas de mortalidade. A resistência ao imipenem é uma urgência global, uma vez que é considerado o tratamento de escolha para infecções associadas a bactérias Gram negativas multirresistentes. Assim, elucidar os mecanismos de resistência é de vital importância para realizar um controle epidemiológico efetivo da disseminação deste tipo de isolado. **Objetivos:** Caracterizar os principais mecanismos de resistência ao imipenem em 76 isolados clínicos brasileiros de *Pseudomonas aeruginosa*, recuperados em 2004/2007, de 4 centros hospitalares do Estado de São Paulo. **Material e métodos:** Foram investigados: i) o perfil de resistência com determinação da CIM do imipenem; ii) a detecção de metalo-beta-lactamases (MBL) através de métodos fenotípicos e genotípicos; iii) a sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco na detecção de MBL; iv) a presença de genes codificadores de metilases 16S RNAr e sua associação com fenótipos aminoglicosídeo resistentes; v) alterações da permeabilidade por perda da porina OprD; vi) a presença ou ausência do gene *oprD* por PCR; vii) triagem fenotípica para expressão de bombas de efluxo através da determinação da CIM de quinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos na presença/ausência de inibidores específicos, realizando uma análise comparativa com o método de disco combinado; viii) os genes associados às bombas de efluxo *mexA* e *mexE*, através de PCR; ix) caracterizar a expressão das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, x) a clonalidade dos isolados por tipagem genotípica, através de ERIC-PCR, avaliando a relação genética (dendrograma) e sua associação com o predomínio de um determinado mecanismo de resistência. **Resultados:** Dentre os isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem estudados (n=76, CIM₅₀ e CIM₉₀ = 32 µg/mL e > 512 µg/mL, respectivamente) 82% apresentaram um fenótipo de multirresistência. O principal mecanismo de resistência ao imipenem foi a produção de MBL, detectada em 74% dos isolados, e destes, 62% carregavam o gene *bla*_{SPM-1} e 12% carregavam o gene *bla*_{VIM-like}. O método de dupla difusão do disco identificou a produção de MBL em 61% dos isolados. A combinação CAZ/MAA apresentou maior sensibilidade na detecção de MBL associada à SPM-1 (89%), mostrando uma especificidade de 86%. A presença do gene *rmtD* foi confirmada em 66% das amostras resistentes aos aminoglicosídeos, sendo que a presença concomitante do gene *rmtD* e do gene *bla*_{SPM-1} foi confirmada em 61% dos isolados. A deleção da porina OprD foi observada em 71% dos isolados. Dentre os isolados MBL positivos, 66% apresentaram ausência desta porina e, dentre as amostras MBL negativas, 85% não apresentaram OprD. Assim, para a resistência ao imipenem foi confirmada a contribuição de dois mecanismos, mediados pela presença de MBL e ausência de porina OprD. Em 13% (10/76) isolados, a deleção da porina OprD esteve associada à presença de seqüências de inserção (SI) em uma região anterior ao gene *oprD*. Por outro lado, a ausência de amplificação da região 736/1394 do gene *oprD*, em 11% (9/76) dos isolados, sugeriu a presença de polimorfismos. O gene *mexA* esteve presente em 92% dos isolados, enquanto que o gene *mexE* esteve presente em 82% dos isolados. A triagem de bombas de efluxo por disco combinado e análise da CIM na presença de reserpina, CCCP e PAβN, utilizando levofloxacina, meropenem, aztreonam, imipenem ou levofloxacina, não teve correlação com a superexpressão dos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN. Ambos os métodos careceram de especificidade e sensibilidade quando comparados ao PCR em tempo real. A superexpressão dos sistemas *mexA* e *mexE* foi confirmada em 35% (7/20) isolados MBL negativos, enquanto que 11% (6/56) isolados MBL positivos apresentaram superexpressão do gene *mexA* ou *mexE*, sendo que 7% (4/56) isolados MBL positivos superexpressaram ambos os genes. A superexpressão dos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN como único mecanismo de resistência ao meropenem e imipenem foi confirmada em 10% (2/20) dos isolados MBL negativos. Nos 76 isolados, a tipagem genotípica por ERIC-PCR, identificou a presença de 24 clusters (considerando 90% de similaridade na análise do dendrograma). **Conclusão:** A convergência de múltiplos mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* parece ser um evento favorável para a seleção de clones endêmicos multirresistentes disseminados na região Sudeste do Brasil.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência bacteriana. Metalo-beta-lactamases. Bombas de efluxo. Porina OprD.

ABSTRACT

NEVES, P. Permeability alterations and expression of efflux pumps in clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. 100p. **Thesis (Ph.D.) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo**, São Paulo, 2010.

Introduction: Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are associated with high mortality rates. Resistance to imipenem is a global concern, since it is a drug of choice for the treatment of infections produced by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Thus, research on resistance mechanisms is crucial to carry out an effective program for infection control and epidemiology of imipenem-resistant strains. **Objective:** to characterize the major mechanisms of imipenem resistance in 76 clinical isolates of *P. aeruginosa* recovered from clinical samples collected, from 2004 to 2007, in four hospitals in the State of São Paulo, Brazil. **Material and methods:** Isolates were screened for: i) resistance profile to antibacterial agents, determining the MIC of imipenem; ii) the detection of metallo-beta-lactamase (MBL) by phenotypic and genotypic methods, iii) MBL detection by using a double-disk diffusion test (D-test), determining the sensitivity and specificity of the assay; iv) the presence of genes encoding 16S rRNA methylases and their association with aminoglycoside-resistant phenotypes, v) changes in the bacterial permeability due to porin (OprD) loss; vi) the presence or absence of the *oprD* gene by using PCR; vii) phenotypic expression of efflux pumps by determining the MIC of quinolones, cephalosporins and carbapenems in the presence/absence of specific inhibitors, performing a comparative analysis with a combined-disk method, viii) genes encoding efflux pumps proteins (*mexC* and *mexX*) by PCR; ix) MexAB-OprM and MexEF efflux pumps expression; x) clonal relatedness, by ERIC-PCR genotyping, regarding the predominance of major resistance genotypes. **Results:** Among imipenem-resistant *P. aeruginosa* strains (n=76, MIC₅₀ e MIC₉₀ = 32 µg/mL e > 512 µg/mL, respectively) 82% showed a multidrug-resistant phenotype. The main mechanism of imipenem resistance was the MBL production detected in 74% strains, of which 62% harbored the *bla*_{SPM-1} gene, and 12% harbored the *bla*_{VIM}-like gene. The D-test identified MBL production in 61% strains. In this regard, CAZ/MAA was the most sensitive combination for MBL detection associated to SPM-1 enzyme (89%), exhibiting 86% specificity. The presence of the *rmtD* 16S rRNA methylase gene was confirmed in 66% aminoglycoside-resistant strains. Moreover, presence of both *rmtD* and *bla*_{SPM-1} genes was identified in 61% strains. Loss of OprD porins was observed in 71% strains. In this regard, 66% MBL positive strains and 85% MBL negative strains showed OprD loss. Thus, MBL production and OprD loss contributed to imipenem resistance in *P. aeruginosa*. Most likely, in 13% (10/76) strains the porin loss was associated to insertion sequences (SI) inserted upstream of the *oprD* gene. On the other hand, in 11% (9/76) strains the absence of a PCR product targeting the 736/1394 region of the *oprD* gene, suggested the presence of polymorphisms. The *mexA* gene was identified in 92% strains, whereas the *mexE* gene was identified in 82% strains. Results obtained from efflux pump screening by using a combined-disk assay and MIC determination in the presence of reserpine, CCCP e PABN (using levofloxacin, meropenem, aztreonam or imipenem) was not correlated with results obtained from MexAB-OprM and MexEF-OprN overexpression analysis by RT-PCR. In this regard, both combined-disk and MIC assay showed lack of specificity and sensitivity in comparison to RT-PCR. Overexpression of *mexA* and *mexE* genes was confirmed in 35% (7/20) MBL-negative and 11% (6/56) MBL-positive strains, respectively, being 7% (4/56) MBL-positive strains overexpressed both genes. The overexpression of MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux pumps, as only mechanism of resistance to meropenem and imipenem was observed in 10% (2/20) MBL-negative strains. ERIC-PCR typing revealed the presence of 24 clusters among 76 imipenem-resistant *P. aeruginosa* strains (≥ 90% similarity). **Conclusion:** The convergence of multiple mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* seems to be a favorable event for the selection of multiresistant clones endemic in the southeastern region of Brazil.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial resistance. Metallo-beta-lactamases. Efflux pumps. OprD porin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Acetiltransferase
AK	Amicacina
ANT	Nucleotidiltransferase
APH	Fosfotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHI	Infusão de cérebro e coração
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAZ	Ceftazidima
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNP	Dinitrofenol
EDTA	Ácido Etileno-Diamino Tetra-Acético
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence</i>
GIM	Enzima do tipo MBL (<i>German Imipenemase</i>)
IMP	Enzima do tipo MBL (<i>Imipenemase</i>)
IPM	Imipenem
LEV	Levofloxacina
MAA	Ácido 2-mercaptoacético
MBL	Metalo-beta-lactamase
MDR	<i>Multiple drug resistance</i>
MEM	Meropenem
<i>mex</i>	Gene codificador de bomba de efluxo
MH	Müeller Hinton
MPA	Ácido 2-mercaptopropiônico
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
<i>oprD</i>	Gene codificador de porina OprD
PA β N	<i>Phenyl-arginine-beta-naphthylamide</i>
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PBS	Tampão sódio fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	Fluoreto fenil metil sulfonil
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SIM	Enzima do tipo MBL (<i>Seoul Imipenemase</i>)
SPM	Enzima do tipo MBL (<i>São Paulo Metallo-beta-lactamase</i>)
UTI	Unidade de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
VIM	Enzima do tipo MBL (<i>Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase</i>)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
<i>1.1. A importância do imipenem na terapia e as consequências da sua resistência nas infecções por P. aeruginosa</i>	3
<i>1.2. Principais mecanismos de resistência ao imipenem em P. aeruginosa</i>	3
<i>1.2.1. Metallo-beta-lactamases (MBL)</i>	4
<i>1.2.2. Porinas</i>	5
<i>1.2.3. Superexpressão de bombas de efluxo</i>	7
<i>1.3. Detecção da expressão gênica por PCR em Tempo Real</i>	13
<i>1.4. Produção de metilases 16S RNAr e resistência aos aminoglicosídeos</i>	14
<i>1.5. Tipagem genotípica</i>	16
2 - OBJETIVOS	18
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	19
<i>3.1. Amostras bacterianas</i>	19
<i>3.2. Condições de cultivo</i>	19
<i>3.3. Preparo dos inóculos bacterianos</i>	20
<i>3.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos</i>	20
<i>3.5. Concentração inibitória mínima do imipenem</i>	20
<i>3.6. Confirmação fenotípica e molecular da produção de MBL</i>	21
<i>3.6.1. Investigação fenotípica da produção de MBL</i>	21

3.6.2. Avaliação da presença dos genes codificadores de MBL	22
3.6.3. Cálculo da sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco para triagem de MBL	23
3.7. Extração de DNA bacteriano	23
3.8. Avaliação da presença de genes codificadores de metilases 16S RNAr	24
3.9. Análise fenotípica de porina OprD de membrana externa	25
3.9.1 Extração de proteínas da membrana externa	25
3.9.2. Avaliação da presença de porina OprD por SDS-PAGE	26
3.9.3. Avaliação da presença do gene oprD	27
3.10. Investigação molecular e fenotípica das bombas de efluxo	28
3.10.1. Investigação de genes codificadores de bombas de efluxo	28
3.10.2. Investigação fenotípica das bombas de efluxo	28
3.10.2.1. Método do disco combinado para detecção da produção de bombas de efluxo	28
3.10.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para investigação da produção de bombas de efluxo	30
3.10.3. Avaliação da expressão de bombas de efluxo	30
3.10.3.1. Extração do RNA total	30
3.10.3.2. Síntese de cDNA	31
3.10.3.3. PCR em Tempo Real para detecção de superexpressão de bombas de efluxo	32
3.11. Avaliação da relação genética entre os isolados	35
4 - RESULTADOS	36

4.1. <i>Antibiograma</i>	36
4.2. <i>Concentração inibitória mínima do imipenem</i>	36
4.3. <i>Confirmação fenotípica e molecular da produção de MBL</i>	37
4.4. <i>Avaliação da presença de genes codificadores de metilases 16S RNAr</i>	42
4.5. <i>Produção de porina OprD</i>	43
4.5.1. <i>Investigação fenotípica da produção de porina OprD</i>	43
4.5.2. <i>Investigação da presença do gene codificador de porina OprD</i>	45
4.6. <i>Investigação molecular e fenotípica da produção de bombas de efluxo</i>	49
4.6.1. <i>Investigação da presença de genes codificadores de bombas de efluxo</i>	49
4.6.2. <i>Investigação fenotípica da produção de bombas de efluxo</i>	50
4.6.2.1. <i>Método do disco combinado para detecção da produção de bombas de efluxo</i>	50
4.6.2.2. <i>Concentração inibitória mínima para detecção da produção de bombas de efluxo</i>	52
4.7. <i>Detecção de superexpressão de bombas de efluxo por PCR em Tempo Real</i>	52
4.8. <i>Avaliação da relação genética entre os isolados</i>	55
4.7.2. <i>PCR em Tempo Real</i>	48
4.8. <i>Análise clonal dos perfis de similaridade genética</i>	49
5 - DISCUSSÃO	57
5.1. <i>Antibiograma qualitativo e quantitativo (CIM)</i>	58
5.2. <i>Confirmação fenotípica da produção de MBL</i>	59

5.3. Avaliação da sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco para detecção de MBL	60
5.4. Avaliação da presença de genes codificadores de mMetilases 16S RNAr	63
5.5. Porina OprD	65
5.5.1. Investigação fenotípica da produção de porina OprD	65
5.5.2. Investigação da presença do gene codificador de porina OprD	66
5.6. Investigação fenotípica das bombas de efluxo	69
5.7. Detecção de superexpressão de bombas de efluxo por PCR em tempo real	72
5.8. Avaliação da relação genética entre os isolados	74
6 - CONCLUSÕES	78
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8 - ANEXOS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo _____	9
Figura 2 - Contexto genético dos genes codificadores de proteínas constituintes dos sistemas de efluxo _____	12
Figura 3 - Esquematização dos primers desenhados de acordo com a seqüência obtida no GenBank X63152.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> oprD gene _____	27
Figura 4 - Método da dupla difusão do disco _____	39
Figura 5 - Amplificações das cepas controle para os genes <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>bla_{VIM-like}</i> , <i>bla_{IMP-like}</i> _____	41
Figura 6 - Eletroforese SDS-PAGE de proteínas OprD de <i>P. aeruginosa</i> corado por coomassie blue R-250 _____	43
Figura 7 - Amplificações do gene oprD região 554/2139 equivalente a 1586 bp _____	45
Figura 8 - Amplificações do gene oprD região 1877/2139 equivalente a 262 bp _____	46
Figura 9 - Amplificações do gene oprD região 1877/1948 equivalente a 71 bp _____	46
Figura 10 - Método do disco combinado para avaliação fenotípica da presença de bombas de efluxo em <i>P. aeruginosa</i> _____	50
Figura 11 - Perfis de similaridade genética, gerados por ERIC-PCR _____	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índice de resistência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas no Brasil _____	2
Tabela 2 - Substratos antimicrobianos para diferentes sistemas de efluxo presentes em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	10
Tabela 3 - Primers utilizados para detecção de genes codificadores de MBL _____	23
Tabela 4 - Primers utilizados para detecção dos genes produtores de metilases _____	24
Tabela 5 - Primers utilizados para detecção do gene <i>oprD</i> _____	27
Tabela 6 - Primers utilizados para detecção dos genes <i>mex</i> codificadores de bombas de efluxo em <i>P. aeruginosa</i> _____	28
Tabela 7 - Primers utilizados na PCR em tempo real para avaliação da expressão de bombas de efluxo _____	32
Tabela 8 - Porcentagem (%) de resistência dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> , a antibióticos de uso habitual _____	36
Tabela 9 - Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do imipenem _____	37
Tabela 10 - Resultados da confirmação fenotípica da produção de MBL através da determinação da CIM do imipenem na presença de EDTA _____	37
Tabela 11 - Resultados do método de dupla difusão do disco para detecção de isolados produtores de MBL _____	38
Tabela 12 - Prevalência de genes <i>bla_{SPM-1}</i> e <i>bla_{VIM-like}</i> , codificadores de MBL, em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	40

Tabela 13 - Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos de dupla difusão do disco para detecção de MBL	41
Tabela 14 - Presença dos genes <i>blaSPM-1</i> e <i>rmtD</i> codificadores de enzimas SPM-1 e metilase RmtD em <i>P. aeruginosa</i> , respectivamente	42
Tabela 15 - Porcentagem (%) de resistência dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> , a antibióticos aminoglicosídeos e carbapenêmico	43
Tabela 16 - Investigação de porina <i>OprD</i> em 56 isolados de <i>P. aeruginosa</i> MBL positivos de diferentes procedências, de acordo com a determinação fenotípica	44
Tabela 17 - Investigação de porina <i>OprD</i> em 20 isolados de <i>P. aeruginosa</i> MBL negativos de diferentes procedências, de acordo com a determinação fenotípica	44
Tabela 18 - Características fenotípicas de 17 isolados com ausência de amplificação de diferentes regiões do gene <i>oprD</i>	47
Tabela 19 - Percentual (%) de ampliações positivas para a investigação do gene <i>oprD</i> nos isolados IPM resistentes provenientes de diversos hospitais	48
Tabela 20 - Interpretação fenotípica de mecanismos de impermeabilidade associado à produção de metalo-beta-lactamase (MBL)	49
Tabela 21 - Distribuição percentual (%) de genes codificadores de bombas efluxo em 76 amostras imipenem resistentes, de acordo com o local de isolamento	49
Tabela 22 - Atividade sinérgica do inibidor de efluxo x antibióticos em isolados imipenem resistentes não produtores de metaloenzimas	51
Tabela 23 - Concentração inibitória mínima do inibidor de efluxo x antibióticos em isolados imipenem resistentes não produtores de MBL	52

Tabela 24 - *Pesquisa de superexpressão das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, através de PCR em tempo real* _____53

Tabela 25 - *Características fenotípicas e moleculares de 20 isolados imipenem resistentes MBL negativos* _____54

1 - INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes de infecção nosocomial em hospitais brasileiros, onde diversos estudos têm associado a sua presença com uma disseminação clonal da espécie (DE FREITAS & BARTH, 2002; FIGUEIREDO-MENDES *et al.*, 2005; KOKIS *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2004; PELLEGRINO *et al.*, 2002; SADER *et al.*, 1993).

A importância clínica da infecção por *P. aeruginosa* caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência a antibacterianos associada a uma difícil erradicação da doença, conseqüentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade (GALES *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005).

Esse microorganismo pode apresentar resistência natural ou adquirida, a um grande número de antibióticos utilizados na prática clínica, como cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos (YONEDA *et al.*, 2005). A presença de uma enzima beta-lactamase AmpC codificada cromossomicamente é responsável pela resistência intrínseca a algumas penicilinas e cefalosporinas, e quando há super expressão deste gene, há o fenômeno de indução de resistência (LIVERMORE, 2002).

O intercâmbio de material genético, que ocorre de forma natural intra ou inter espécies entre os bacilos Gram negativos, é apontado como um dos responsáveis pela aquisição de determinantes de resistência. Assim, a capacidade que *P. aeruginosa* possui de tornar-se resistente durante o tratamento ao antibiótico é inerente à espécie, e muitas vezes inevitável (LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

Nas UTIs de grandes hospitais do Brasil, a resistência a antibióticos é muito preocupante. Estudos multicêntricos, sejam do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) ou do MISTYC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information*

Collection), têm mostrado que a resistência ao imipenem é o principal problema encontrado. Índices de resistência em nosso país têm aumentado drasticamente nos últimos anos, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Índice de resistência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no Brasil

Antibióticos	Resistência (%)					
	AMÉRICA LATINA		BRASIL			
	SENTRY (ANDRADE <i>et al.</i> , 2003)	SENTRY (SADER <i>et al.</i> , 2001)	PELLEGRINO <i>et al.</i> , 2002	ZAVASCKI <i>et al.</i> , 2004	MYSTIC (KIFFER <i>et al.</i> , 2005)	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2009
Imipenem	37,8	30,2	38,3	58,9	36,6	82,7
Amicacina	34,6	30,5	35,6	57,6	33,8	78,7
Ceftazidima	43,7	34,3	36,5	48,7	36,0	90,7

Estudos epidemiológicos baseados em dados do SENTRY, direcionados principalmente para pacientes hospitalizados, mostram um total de 3.728 isolados entre bactérias Gram positivas e Gram negativas, obtidos de doze centros hospitalares de quatro Estados, tendo sido *Pseudomonas aeruginosa*, responsável por 496 (13,3%) casos dentre os isolados, sendo o terceiro patógeno mais freqüente, com 30,2% de resistência ao imipenem (SADER *et al.*, 2001). Dados do MYSTIC, específico para estudos epidemiológicos em UTIs, mostraram que de 1550 amostras de bactérias Gram negativas, provenientes de vinte centros hospitalares, *Pseudomonas aeruginosa* estava envolvida em infecções da corrente sanguínea/cateter, trato respiratório, trato urinário, pele/tecidos moles,. Esta bactéria mostrou elevada freqüência (30,3% de 470 isolados), com 36,6% de resistência ao imipenem (KIFFER *et al.*, 2005). Em outros estudos, realizados por grupos independentes, no sul e centro-oeste do país, têm sido relatada uma resistência que atinge percentuais de 58,9% até 82,7%, respectivamente (ZAVASCKI *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2009).

Este aumento no perfil de resistência aos antibióticos é uma tendência globalizada, gerando maior impacto na América Latina (Tabela 1).

1.1. A importância do imipenem na terapia e as consequências da sua resistência nas infecções por P. aeruginosa

Os antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são beta-lactâmicos de amplo espectro, derivados da tienamicina, com atividade bactericida no tratamento de infecções provocadas por isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*. Esses fármacos têm uma considerável estabilidade frente à maioria das beta-lactamases, incluindo as beta-lactamases de amplo espectro (ESBL). Por esta razão, os carbapenêmicos são considerados fármacos de reserva no tratamento deste tipo de infecção (RUPP & FEY, 2003). Portanto, são freqüentemente empregados como último recurso no tratamento de infecções de origem hospitalar, causadas por bactérias Gram negativas, resistentes aos demais beta-lactâmicos ou outros agentes antimicrobianos.

Assim, como a freqüência de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos tem aumentado significativamente (Tabela 1) e, como a indústria farmacêutica não tem lançado uma alternativa terapêutica com um espectro de atividade similar ou superior ao imipenem, o atual prognóstico das infecções por bactérias multirresistentes muitas vezes é desfavorável. Nestes casos, o panorama atual da antibioticoterapia restringe-se a alternativas terapêuticas com fármacos considerados inadequados devido à sua alta toxicidade, como por exemplo, as polimixinas (polimixina B e colistina), as quais muitas vezes não se encontram disponíveis comercialmente no Brasil (LEVIN *et al.*, 1999; FURTADO *et al.*, 2007).

1.2. Principais mecanismos de resistência ao imipenem em P. aeruginosa

A perda de sensibilidade ao imipenem pode ser decorrente, por exemplo: i) da diminuição da permeabilidade da membrana externa aos antimicrobianos, também

conhecida como perda de porinas; ii) da presença de PBPs (*penicillin-binding proteins*) com baixa afinidade por carbapenêmicos; iii) da superexpressão de bombas de efluxo; ou ainda, iv) da produção de enzimas capazes de hidrolisar estes agentes antimicrobianos. Estas enzimas, conhecidas como carbapenemases, são beta-lactamases pertencentes às classes A, B, ou D de Ambler (POIREL *et al.*, 2000).

Dentre os mecanismos responsáveis pela perda de sensibilidade ao imipenem, a impermeabilidade da membrana devido à perda de porinas ou à superexpressão das bombas de efluxo, confere uma resistência adicional a várias classes de antibióticos, como resultado de um efeito cascata gerado por múltiplos mecanismos de resistência inter-relacionados (LIVERMORE, 2002; LIVERMORE, 2003; NEVES *et al.*, 2008).

1.2.1. Metallo-beta-lactamases (MBL)

Atualmente no Brasil, isolados produtores de MBL são responsáveis pelos elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos (GALES *et al.*, 2003; LINCOPAN *et al.*, 2005; SADER *et al.*, 2005). À exceção do aztreonam, estas enzimas degradam todos os beta-lactâmicos incluindo as associações com inibidores de beta-lactamases, como o tazobactam, clavulanato e sulbactam. O grupo MBL é representado por enzimas tipo IMP (*Imipenem*) (WATANABE *et al.*, 1991), VIM (*Verona Integrin-encoded Metallo-beta-lactamase*) (LAURETTI *et al.*, 1999), GIM (*German Imipenemase*) (CASTANHEIRA *et al.*, 2004), SIM (*Seoul Imipenemase*) (LEE *et al.*, 2005), SPM-1 (*São Paulo Metallo-beta-lactamase*) (TOLEMAN *et al.*, 2002), AIM (*Australian imipenemase*) (YONG *et al.*, 2007), KHM-1 (*Kyorin Health Science metallo-beta-lactamase*) (SEKIGUCHI *et al.*, 2008), NDM-1 (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) (YONG *et al.*, 2009), DIM-1 (*Dutch Imipenemase*) (POIREL *et al.*, 2009) e TMB-1 (*Tripoli MBL*) (EL SALABI *et al.*, 2009).

Em isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL no Brasil, além da enzima SPM-1, tem sido relatada a presença de IMP e VIM, porém o principal problema concentra-se em isolados produtores de enzimas SPM-1, os quais parecem ser endêmicos e correlacionados a altos índices de mortalidade (GALES *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005).

A identificação precoce das MBL em *P. aeruginosa* é uma urgência clínica e epidemiológica. Laboratorialmente, a pesquisa de MBL pode ser realizada de forma similar à triagem de ESBL nas enterobactérias, porém são utilizados inibidores derivados de ácidos tiólicos ou agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ácido 2-mercaptoacético (MAA) e 2-mercaptopropiônico (MPA) (ARAKAWA *et al.*, 2000). Além do método de aproximação de disco para determinação de MBL, existem fitas comerciais, denominadas E-test (AB Biodisk, Suécia), que contêm em uma das extremidades concentrações decrescentes de imipenem, e na outra concentrações decrescentes de imipenem combinado com uma quantidade fixa de EDTA, onde uma redução ≥ 3 diluições na CIM do imipenem em presença de EDTA é um indicativo da produção de MBL (WALSH *et al.*, 2002; LUZZARO *et al.*, 2004).

1.2.2. Porinas

As bactérias Gram negativas, ao contrário das Gram positivas, possuem em sua composição, uma membrana externa que fisiologicamente, caracteriza-se por ser a primeira linha de defesa contra compostos tóxicos. O ingresso de substâncias na célula bacteriana é controlado pelas porinas de membrana externa (OMP, *Outer Membrane Protein*), que são proteínas capazes de formar canais constituídos de água no seu interior, o que permite a difusão passiva de solutos hidrofílicos através da membrana externa (NIKAIDO, 1994).

As OMP das bactérias Gram-negativas têm sido classificadas e caracterizadas segundo sua atividade, estrutura funcional, regulação e expressão (PAGÈS *et al.*, 2008).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, diferentes porinas podem ser encontradas em sua membrana externa, cada qual com sua função, tais como OprC, OprD, OprE e OprF. Dentre as OMP, a OprF é a mais abundante, sendo provavelmente a mais utilizada para difusão da maioria dos beta-lactâmicos para o interior da bactéria (LIVERMORE, 2002). OprC e OprE são canais inespecíficos, utilizados por alguns antimicrobianos (VILA & MARCO, 2002). A presença de OprD, também denominada porina D2, com peso molecular equivalente a 46 kDa, tem sido amplamente investigada, uma vez que a ausência ou mesmo a expressão reduzida do gene *oprD*, codificador desta porina, tem contribuído para a resistência aos carbapenêmicos, especialmente imipenem (LIVERMORE, 2001; NIKAIDO *et al.*, 1991). Fisiologicamente, a principal função desta porina OprD é permitir a captação passiva dos aminoácidos básicos através da membrana externa. Sabe-se que ela é capaz de permitir a entrada de carbapenêmicos, ainda que não de outros beta-lactâmicos (YOSHIHARA *et al.*, 1996). A afinidade e a capacidade de difusão de imipenem através desta porina são quase setenta vezes mais elevadas que as observadas para meropenem (NIKAIIDO *et al.*, 1991). Isolados que apresentam mutações na porina OprD, são selecionados durante o tratamento com imipenem. Esses isolados demonstram diminuição da afinidade e do transporte desse antibiótico através dessa proteína, comprovando assim que a resistência ao imipenem está intimamente ligada à falta de expressão ou perda da OprD, mostrando um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) para imipenem, com valores que atingem um limiar característico de uma resistência intermediária (YONEYAMA *et al.*, 1992; YONEYAMA & NAKAE, 1993; YONEYAMA *et al.*, 1995; NIKAIIDO *et al.*, 1991; FUNG-TOMC *et al.*, 1995; HUANG & HANCOCK, 1996; LIVERMORE, 2001).

A resistência ao meropenem está ligada à mutação do gene que codifica a porina OprD e a ativação de bombas de efluxo que utilizem o meropenem como substrato. A mutação do gene *oprD* ocorre em isolados resistentes ao imipenem com sensibilidade reduzida ou preservada ao meropenem, sem afetar outros beta-lactâmicos, a menos que outros mecanismos de resistência estejam presentes (LIVERMORE, 2001; OCHIs *et al.*, 1999; KÖHLER *et al.*, 1999a).

Alguns autores têm relatado a presença de resistência cruzada aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas após uso de ciprofloxacina. Essa resistência está associada a diversas alterações nas proteínas da membrana externa, incluindo um aumento da expressão de proteínas de 54 kDa (RÅDBERG *et al.*, 1990; LIVERMORE & WOODFORD, 2000; MÜLLER-PREMRU & LEJKO-ZUPANC, 2002). Outros estudos descreveram um isolado resistente a quinolonas e imipenem, que foi obtido da urina de um paciente tratado com norfloxacina. Foram atribuídos a esse isolado, mecanismos de resistência relacionados com alterações na DNA girase (gene *nfxC*), perda da porina OprD (46 kDa) e aumento de proteína de 50kDa (MASUDA & OHYA, 1992; POOLE *et al.*, 1993; FUKUDA *et al.*, 1995).

1.2.3. Superexpressão de bombas de efluxo

A maioria dos mecanismos de proteção bacteriana contra o ingresso indesejado de moléculas prejudiciais à célula são realizados por meio de transporte ativo para o exterior celular através de um sistema denominado bomba de efluxo (SAIER *et al.*, 1998). Esses sistemas de expulsão são os responsáveis pela “impermeabilidade” à maioria dos antibióticos e desinfetantes em uma grande variedade de espécies bacterianas (BLAIR & PIDDOCK, 2009; LI & NIKAIDO, 2009; LI, *et al.*, 2000; LISTER *et al.*, 2009; PIDDOCK, 2006). A principal função das bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* é exportar substâncias tóxicas ou metabólitos secundários,

assim como a excreção de moléculas sinalizadoras que governam a comunicação celular (KRIENGKAUYKIAT, *et al.*, 2005; PEARSON, *et al.*, 1999). Os antibióticos estão entre esses compostos tóxicos, e a extrusão dos mesmos compromete a eficácia terapêutica. Muitos genes codificadores de bombas de efluxo para múltiplos antimicrobianos são expressos constitutivamente, conferindo resistência intrínseca aos mesmos (LOMOVSKAYA *et al.*, 2001).

Os sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* pertencem à família *resistance-nodulation-cell division* (RND) (LLANES *et al.*, 2004). Esses sistemas são baseados na abertura de um canal que atravessa as membranas interna e externa da bactéria, permitindo a remoção de moléculas para o exterior celular.

O genoma de *P. aeruginosa* contém genes que codificam, no mínimo, doze sistemas de efluxo da família RND denominados Mex (*Multidrug Efflux Pump*), dos quais dez já foram caracterizados: MexAB-OprM (POOLE *et al.*, 1993), MexCD-OprJ (POOLE *et al.*, 1996a), MexEF-OprN (KÖHLER *et al.*, 1997), MexXY-OprM (MINE *et al.*, 1999), MexGHI, OpmD (AEDEKERK *et al.*, 2002), MexVW-OprM (LI *et al.*, 2003a), MexPQ-OpmE (MIMA *et al.*, 2005), MexMN-OprM (MIMA *et al.*, 2005) e TriABC-OpmH (MIMA *et al.*, 2007). Esses sistemas são denominados MDR (*Multi-Drug Resistance*), pois são capazes de conferir resistência a um amplo espectro de quimioterápicos (KRIENGKAUYKIAT, *et al.*, 2005; PIDDOCK, 2006).

Dentre as bombas de efluxo caracterizadas em *P. aeruginosa*, a expressão de quatro sistemas (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) foi relatada entre isolados clínicos e relacionados à resistência a múltiplos antibióticos (Tabela 2) (LISTER *et al.*, 2009; AESCHLIMANN, 2003).

As bombas de efluxo de bactérias Gram negativas constituem um sistema tripartite de proteínas de transporte que se localizam ao longo da membrana interna (proteína constituída por uma bomba de transporte ativo, dependente de energia - MexB, MexD, MexF e MexY), periplasma (proteína transmembrana, que une os outros dois componentes - MexA, MexC, MexE e MexX) e membrana externa (proteína formadora de canal extrusor, também denominada porina - OprJ, OprM e OprN) (Figura 1).

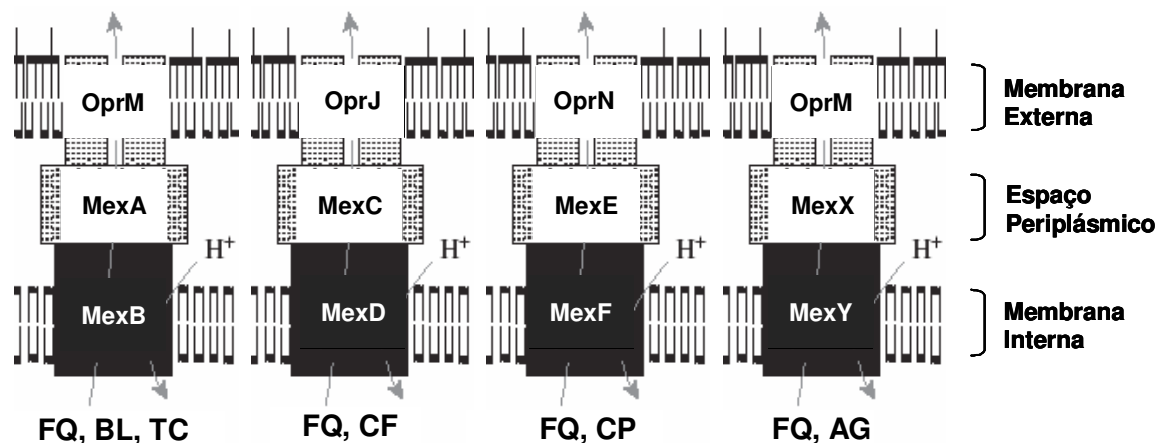


Figura 1: Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos. FQ, fluoroquinolona; BL, beta-lactâmico; TC, tetraciclina; CF, cefalosporina; CP, carbapenêmico; AG, aminoglicosídeo.

Fonte: Adaptação de AESCHLIMANN, 2003; POOLE, 2005.

A habilidade do sistema de efluxo em reconhecer um grande número de compostos é provavelmente devido à propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade, aromaticidade e o caráter ionizável (SAIER *et al.*, 1998). A maioria dos antibióticos são anfifílicos, possuindo características hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo facilmente reconhecidos por muitas bombas de efluxo (KAATZ, 2002), podendo, inclusive, agir como reguladores da expressão de alguns sistemas de efluxo, como no caso da ciprofloxacina (LIVERMORE, 2002).

Cada bomba tem afinidade por um substrato antimicrobiano (Tabela 2). As fluoroquinolonas são substratos universais para todas as bombas do tipo Mex e, conforme KRIENGAUYKIAT, *et al.*, 2005, a exposição a este grupo de antibióticos tem selecionado mutantes de *P. aeruginosa* com fenótipo multirresistente (MDR) via superexpressão das bombas de efluxo.

Tabela 2. Substratos antimicrobianos para diferentes sistemas de efluxo presentes em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa**

MexA-MexB-OprM	MexC-MexD-OprJ	MexE-MexF-OprN	MexX-MexY-OprM
Aztreonam	Cefepima	Cloranfenicol	Amicacina
Carbenicilina	Cefuroxima	Ciprofloxacina	Cefepima
Cefotaxima	Cloranfenicol	Clavulanato	Cefotaxima
Ceftazidima	Ciprofloxacina	IMIPENEM	Ciprofloxacina
Cefuroxima	Eritromicina	Levofloxacina	Eritromicina
Cloranfenicol	Levofloxacina	Norfloxacina	Gentamicina
Ciprofloxacina	Nafcillina	Sulbactam	Levofloxacina
Clavulanato	Norfloxacina	Trimetoprima	Tetraciclina
Faropenem	Tetraciclina		Tobramicina
Levofloxacina	Trovafloxacina		
MEROPENEM			
Nafcilina			
Norfloxacina			
Piperacilina			
Sulbactam			
Tetraciclina			
Trimetoprima			

* Adaptação de AESCHLIMANN, 2003.

Dentre os substratos preferenciais das bombas de efluxo presentes em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, os carbapenêmicos estão presentes nos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN.

MexAB-OprM foi a primeira bomba de efluxo da família RND caracterizada em *P. aeruginosa* (POOLE *et al.*, 1993). Este sistema compromete a ação de vários antibacterianos, inclusive meropenem, mas não inclui o imipenem devido a diferenças em sua estrutura molecular (LI *et al.*, 1994; LI, *et al.*, 2003b; KÖHLER *et al.*, 1999a;

LIVERMORE, 2002; MASEDA, 2000). A expressão desse sistema é regulada pela inserção da proteína MexR na região entre os genes *mexR* e *mexA* (região promotora) atuando assim, como repressora (Figura 2).

MexEF-OprN está relacionado à resistência ao imipenem, pois sua expressão é dependente da presença da proteína MexT (codificada pelo gene *mexT*), que atua como ativadora pós-transcricional (KÖHLER *et al.*, 1999b). Além de ativar a expressão do sistema, acredita-se que MexT possa atuar como repressora da expressão da proteína de membrana externa OprD, pois está envolvida na mutação que origina a perda desta porina (KÖHLER *et al.*, 1997). Além disso, esse sistema pode diminuir a expressão das bombas MexAB-OprM e MexXY-OprM, pois parece possuir atividade corregulatória sobre elas (MASEDA *et al.*, 2000; POOLE *et al.*, 1996b; POOLE *et al.*, 2000; SOBEL *et al.*, 2003).

As bombas de efluxo são codificadas por elementos genéticos localizados em cromossomos e em algumas espécies tem sido detectadas em plasmídeos (YAMANE *et al.*, 2007), o que pode facilitar a propagação dos genes de efluxo, contribuindo para a resistência intrínseca e adquirida, permitindo a bactéria sobreviver em ambientes hostis, como por exemplo, na presença de antibióticos e desinfetantes (BUTAYE *et al.*, 2003; POOLE, 2005).

A organização genética das bombas de efluxo da família RND em *P. aeruginosa* é governada por operons. Cada operon contém os genes que codificam os componentes dos sistemas de efluxo (proteína de membrana interna, proteína periplasmática e proteína de membrana externa), conforme demonstrado na Figura 2.

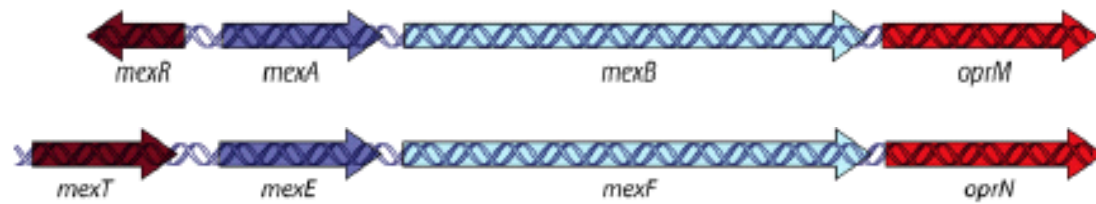


Figura 2: Contexto genético de genes codificadores de proteínas constituintes dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN em *P. aeruginosa*. Cada operon contém os genes que codificam os componentes dos sistemas de efluxo (proteínas de membrana interna, periplasmática e de membrana externa). Ambos sistemas são responsáveis por fenótipos carbapenem-resistentes na espécie estudada.

Fonte: Adaptação de AESCHLIMANN, 2003; LISTER, 2009.

O aumento da expressão das bombas de efluxo, ou superexpressão, pode ser mediado por mutações [em um gene regulador proximal (*mexR*, *mexT*) ou na região promotora do gene transportador (i.e., *mexB* e *mexF*)] ou por elementos de inserção localizados na região anterior ao gene transportador (PIDDOCK, 2006).

A presença de seqüências de inserção na região anterior aos genes codificadores de um componente estrutural do sistema de efluxo, ou inseridas no gene repressor, têm sido descritas em isolados que superexpressam bombas de efluxo que conferem multirresistência aos antibióticos (MDR) (KAATZ, 2002; PIDDOCK, 2006).

Os mecanismos envolvidos na superexpressão das bombas de efluxo têm sido pouco estudados, por serem difíceis de serem inferidos, *a priori*, pelos resultados dos testes de sensibilidade qualitativos, semiquantitativos ou quantitativos (i.e., disco difusão, sistemas automatizados e determinação da CIM).

Uma estratégia para a pesquisa laboratorial de bombas de efluxo tem sido baseada no uso de inibidores de sistemas de efluxo combinados a substratos antimicrobianos (DENNY *et al.*, 2005; LOMOVSKAYA *et al.*, 2001).

Os inibidores de bombas de efluxo geralmente são alcalóides de plantas. Dentre eles, podemos citar o CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone*), o DNP (*dinitrophenol*), a reserpina e o PAβN (*phenyl-arginine-beta-naphthylamide*). Esses inibidores são amplamente utilizados como ferramenta na detecção de bombas de efluxo (DENNY *et al.*, 2005; LOMOVSKAYA *et al.*, 2001; KRIENGKAUYKIAT, *et al.*, 2005).

Outra metodologia confiável e sensível para investigar os sistemas de efluxo é conhecida como PCR em tempo real. Através dessa técnica, é possível analisar quantitativamente a expressão dos genes a partir da obtenção do RNA mensageiro (necessário para a síntese protéica) e posterior produção do DNA complementar. Essa metodologia permite identificar o nível de expressão dos genes de interesse e tem sido empregada na detecção da expressão de sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* (MESAROS *et al.*, 2007).

1.3. Detecção da expressão gênica por PCR em Tempo Real

A reação de polimerase em cadeia, do inglês “*polymerase chain reaction*” (PCR) é uma técnica molecular específica e sensível e pode ser realizada a partir de qualquer amostra biológica, de acordo com metodologias específicas. A seleção dos *primers* e as condições de termociclagem são críticas tanto para a sensibilidade da PCR quanto para a especificidade. A PCR permite que seja realizada a síntese de material genético, *in vitro*, com amplificação de uma sequência específica de ácido desoxirribonucléico (DNA) utilizando a enzima DNA-polimerase, que é a responsável pela replicação do material genético nas células. Desse modo, ocorre a síntese de uma sequência complementar de DNA desde que um par de iniciadores ou *primers* se ligue à uma fita de DNA com orientações opostas (*primer forward* e *primer reverse*), flanqueando a sequência a ser amplificada. Os *primers* são fundamentais para que ocorra a replicação

da seqüência definida e o resultado final é a amplificação de uma determinada seqüência de DNA contendo bilhões de cópias (MULLIS, 1990).

Uma outra aplicabilidade da técnica de PCR é denominada PCR em Tempo Real, metodologia que possibilita quantificar o produto da PCR, e é utilizada para determinar a presença e o número de cópias de uma seqüência de DNA que está presente em uma amostra. Isso é possível porque a metodologia de PCR em tempo real utiliza um corante fluorescente, também denominado fluoróforo, que é capaz de absorver e emitir luz em um comprimento de onda específico, e a intensidade da resposta é diretamente proporcional à concentração do DNA alvo devido ao acúmulo do produto em cada ciclo de amplificação, portanto, a PCR em tempo real permite o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos, podendo ser usada para quantificação do DNA (HEID *et al.*, 1996; LIE & PETROPOULOS, 1998; ORLANDO *et al.*, 1998; WONG & MEDRANO, 2005).

O primeiro relato da utilização de PCR em tempo real ocorreu em 1992, quando HIGUCHI e colaboradores utilizaram brometo de etídio como intercalante durante a reação de PCR e, através de uma câmera adaptada acoplada a um termociclador modificado, as moléculas de DNA eram excitadas com luz UV sendo possível detectar a fluorescência resultante de cada ciclo da reação. Estudos posteriores substituíram o brometo de etídio, devido à sua alta toxicidade, e as metodologias mais utilizadas atualmente são as que utilizam o corante fluorescente SYBR Green I, os sistemas de hidrólise Taqman, as sondas MGB Eclipse, as sondas em forma de alça Molecular Beacons ou as sondas de hibridização (BERNARD & WITTEW, 2000; GINZINGER, 2002; WONG & MEDRANO, 2005).

O SYBR Green I é um corante fluorescente que se intercala à fita dupla de DNA, permitindo assim a detecção de qualquer DNA fita dupla gerado durante a PCR e, como a

quantidade de DNA aumenta a cada ciclo, a fluorescência também é aumentada (KESANOPOULOS *et al.*, 2005; ZIPPER *et al.*, 2004). O corante mantém-se estável durante toda a reação e sua fluorescência é captada através de filtros existentes no equipamento de PCR em tempo real, permitindo que seja desenhada uma curva de amplificação para cada amostra, podendo ser analisada posteriormente através de softwares desenvolvidos especificamente para esse fim.

A reação de PCR em tempo real é dividida em três fases: i) a linha basal (*baseline*), na qual os produtos da PCR e, conseqüentemente, a fluorescência emitida, não são suficientes para atingir o limiar de detecção (*threshold line*); ii) a fase exponencial, que inicia-se quando a emissão de fluorescência supera o limiar de detecção (nesta fase determina-se o valor arbitrário de C_T - *cycle threshold*, ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o *threshold line*) e iii) a fase platô, onde não há mais aumento no número de produtos de amplificação e a fluorescência fica estável.

1.4. Produção de metilases 16S RNAr e resistência aos aminoglicosídeos

Diferentemente das beta-lactamases, as enzimas que conferem resistência aos aminoglicosídeos agem modificando quimicamente a estrutura do antibiótico, antes que este se ligue ao seu alvo (subunidades do ribossomo). A modificação enzimática pode afetar tanto grupos aminas como hidroxilas mediante processos de *O*-fosforilação ou *O*-adenilação, por fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT) dependentes de ATP, ou mediante um processo de *N*-acetilação por acetiltransferases (AAC) dependentes de acetil CoA. Deste grupo de enzimas, aquelas citadas como AAC(6'), ANT(2''), e APH(3') têm sido as mais freqüentemente descritas em isolados de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos como gentamicina, tobramicina, amicacina e neomicina (DAVIES & WRIGHT, 1997).

Um outro grupo de enzimas que conferem resistência mediada pela metilação sítio-específica do RNA ribossômico 16S, são conhecidas como metilases 16S RNAr (YOKOYAMA *et al.*, 2003). Inicialmente, acreditava-se que este mecanismo de resistência não existia em espécies clínicas relevantes, porém, foram relatados isolados de *Pseudomonas aeruginosa* que produziam metilases 16S RNAr (GALIMAND *et al.*, 2005; DOI *et al.*, 2007a). Estas enzimas mostraram-se capazes de conferir um nível elevado de resistência a aminoglicosídeos utilizados clinicamente, como amicacina, tobramicina e gentamicina (DOI & ARAKAWA, 2007).

Existem relatos de cinco tipos de metilases 16S RNAr, até o momento: ArmA (*aminoglycoside resistance methyltransferase*) (GALIMAND *et al.*, 2005), RmtA (*ribosomal methyltransferase*) (YOKOYAMA *et al.*, 2003), RmtB (DOI *et al.*, 2004), RmtC (WACHINO *et al.*, 2006) e, mais recentemente, RmtD (DOI *et al.*, 2007a). Esta enzima foi encontrada em uma amostra clínica de *Pseudomonas aeruginosa* isolada no Brasil a qual também produzia a metalo-beta-lactamase SPM-1. Fenotipicamente, este isolado apresentou resistência a todos os beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e aminoglicosídeos.

Todos os genes das metilases 16S RNAr até hoje descritos estão associados com elementos genéticos móveis, como os transposons, denotando a sua capacidade de disseminação horizontal intra e inter espécies (DOI & ARAKAWA, 2007; DOI *et al.*, 2007a; DOI *et al.*, 2007b; YAMANE *et al.*, 2007).

1.5. Tipagem genotípica

Estudos epidemiológicos que possibilitam o estabelecimento do grau de similaridade entre isolados envolvidos em infecções hospitalares são muito importantes, pois contribuem para a análise do perfil clonal, possibilitando caracterizar surtos hospitalares, assim como avaliar possíveis fontes e mecanismos de transmissão, além do

modo de aquisição do agente em questão (OLIVE & BEAN, 1999; HARRIS *et al.*, 1999).

Dentre as técnicas moleculares utilizadas para avaliar a diversidade clonal entre microorganismos, o ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence*) consiste na amplificação de regiões conservadas do DNA, através da técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR). Esta metodologia apresenta boa capacidade discriminatória, reprodutibilidade, fácil interpretação, rapidez e baixo custo (PUJANA *et al.*, 1999; RENDERS *et al.*, 1996; SYRMIS *et al.*, 2004). Para tipagem de *P. aeruginosa* este método tem mostrado boa reprodutibilidade e poder discriminatório comparável com o PFGE (PELLEGRINO *et al.*, 2002; DOS ANJOS BORGES, *et al.*, 2003).

2 - OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar os mecanismos envolvidos na resistência a antibióticos carbapenêmicos (imipenem) e avaliar a diversidade genética de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cinco centros hospitalares do Estado de São Paulo.

2.1.1. Específicos

1. Avaliar o perfil de resistência dos isolados coletados determinando a CIM do imipenem.
2. Detectar a atividade de enzimas metalo-beta-lactamases através de testes fenotípicos e moleculares.
3. Determinar a sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco na detecção de MBL.
4. Investigar a presença de genes codificadores de metilases 16S RNAr e sua associação com fenótipos aminoglicosídeo resistentes.
5. Investigar a presença ou ausência do gene *oprD* por PCR e caracterizar alterações da permeabilidade por perda da OprD.
6. Investigar a presença dos genes associados às bombas de efluxo *mexA* e *mexE* através de PCR.
7. Realizar triagem fenotípica para expressão de bombas de efluxo por meio da determinação da CIM de quinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos na presença/ausência de inibidores específicos e realizar uma análise comparativa com o método de disco combinado.
8. Avaliar a expressão das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN através de PCR em tempo real.
9. Avaliar a diversidade genética dos isolados e relacioná-los aos mecanismos de resistência.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Foram selecionados a partir do isolamento de diversos espécimes clínicos, setenta e seis isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com perfil de resistência ao imipenem. Estes isolados foram provenientes de quatro centros hospitalares localizados no Estado de São Paulo, no período entre 2004 e 2007: Hospital das Clínicas de São Paulo (A) - 22 isolados; Instituto de Infectologia Emílio Ribas (B) - 11 isolados; Centro Infantil Boldrini (C) - 39 isolados e Laboratório Médico Análises Clínicas de São Paulo (D) - 4 isolados. A resistência ao imipenem foi previamente verificada nos centros médicos por Vitek (BioMérieux, Hazlewood, Mo.) e/ou através de série bioquímica convencional e o perfil de sensibilidade antibacteriana foi confirmado pela metodologia de dupla difusão do disco (Kirby-Bauer), seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (2006). Como controles, foram utilizadas as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* Pa01, cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Sílvia F. Costa (Laboratório de Bacteriologia, HC, FMUSP), *P. aeruginosa* 319 EPM (*bla_{IMP}* positiva), *P. aeruginosa* 48-1997A EPM (*bla_{SPM-1}* positiva) e *E. cloacae* CAZ 75-10433 EPM (*bla_{VIM}* positiva), cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Ana Gales (Laboratório ALERTA, UNIFESP/EPM).

3.2. Condições de cultivo

Os isolados e as cepas de referência foram semeadas em 2 ml de caldo BHI (Merck, Darmstad-Alemanha) e incubadas a 37°C durante 18 a 20 horas, sob agitação constante em agitador rotativo (modelo CT-712 RN, Cientec, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm. Em seguida, foram semeadas superficialmente em ágar Mac Conkey (Merck, Darmstad-Alemanha) e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica (modelo 002-

CB, Fanem, SP, Brasil) a 37°C. As colônias dessa semeadura foram utilizadas para extração de DNA e para preservação a -20°C e a -80°C em 20% de glicerol.

3.3. Preparo dos inóculos bacterianos

Inóculos bacterianos padronizados (1×10^8 UFC/mL) foram preparados a partir do cultivo dos isolados em 2 mL de caldo BHI, em agitador rotativo a 150 rpm, 37°C, durante 18 a 20 horas. Em seguida, 50 µL desse cultivo foram transferidos para 2 mL de caldo Müeller-Hinton (Acumedia, Lansing, MI - USA) e incubados a 37°C em agitador rotativo a 150 rpm, durante 4 a 5 horas, fase de crescimento exponencial da bactéria. A turbidez da cultura foi ajustada para a escala 0,5 de McFarland, confirmada através da leitura da absorbância entre 0,08 e 0,1 dos tubos contendo a suspensão bacteriana, em espectrofotômetro (modelo Spectronic 20, ThermoSpectronic, Rochester, NY - USA), a um comprimento de onda de 625 nm. Este método de cultivo foi utilizado para todos os testes fenotípicos.

3.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Foram realizados os antibiogramas utilizando o método de Kirby-Bauer, estabelecido pelo CLSI (2006), a fim de obter o perfil de resistência para os antibióticos imipenem (10µg), meropenem (10µg), ertapenem (10µg), ceftazidima (30µg), ampicilina (30µg), ciprofloxacino (5µg), aztreonam (30µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), cefepima (30µg), gentamicina (10µg) (OXOID, Cambridge, UK).

3.5. Concentração inibitória mínima do imipenem

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados pela técnica de diluição em ágar, seguindo as padronizações estabelecidas pelo CLSI para o imipenem (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) (CLSI, 2006). O antimicrobiano foi testado em concentrações decrescentes de 512µg/mL a 0,03µg/mL (diluição 1:2). Estas

diluições seriadas foram realizadas a partir de uma solução estoque, em tubos contendo 19 mL de ágar Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt-Alemanha) previamente esterilizados, e mantidos a uma temperatura entre 45°C a 50°C. Em seguida, 1 mL da solução do antimicrobiano com concentração 20 vezes superior para cada diluição testada, foi adicionada nos 19 mL de ágar Mueller-Hinton. Após homogeneização, o conteúdo foi depositado em placas de Petri de 90mm de diâmetro.

Os inóculos bacterianos (item 3.3), foram diluídos em caldo Mueller-Hinton na proporção 1:10, resultando em um inóculo de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL. A seguir, 300µL dessa suspensão foram transferidos para os poços do inoculador de Steers. Desse modo, 1 a 3 µL de cada isolado foi inoculado simultaneamente em cada placa de Petri, atingindo uma concentração final de 1×10^4 UFC/mL (CLSI 2010). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 18 a 20 horas.

A CIM para cada antimicrobiano foi definida como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento visível do isolado e foi interpretada de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (2008). Como controle foi utilizada a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.6. Confirmação fenotípica e molecular da produção de MBL

3.6.1. Investigação fenotípica da produção de MBL

Para confirmação fenotípica, os isolados imipenem resistentes foram submetidos à triagem para a produção de MBL, mediante ao emprego do teste de dupla difusão do disco, seguindo-se as recomendações do CLSI (2008) para os métodos de disco difusão. Foram utilizados discos de imipenem (10µg) e ceftazidima (30µg) como substratos, e como inibidores enzimáticos, discos de papel filtro contendo 0,5M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido 2-mercaptoacético (MAA) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) e 2-mercaptopropiônico (MPA) (Sigma-Aldrich, Stenheim,

Alemanha), ambos em solução não diluída (ARAKAWA *et al.*, 2000). Os inóculos bacterianos (item 3.3) foram semeados por espalhamento com o auxílio de um *swab* sobre uma placa Petri de 150mm de diâmetro contendo ágar Müeller-Hinton. Os discos de antibióticos e os discos de papel filtro previamente impregnados com os inibidores foram alinhados no centro da placa, mantendo-se uma distância de 2 cm entre eles, e esta foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C, sendo realizada a leitura dos resultados após 18 a 20 horas. A formação de uma zona de inibição de crescimento bacteriano (zona fantasma) entre os discos com substrato e os discos com inibidor, indicava a produção de MBL (ARAKAWA *et al.*, 2000).

A determinação da CIM também foi realizada para detecção da produção de MBL. Como inibidor, foi utilizado o quelante EDTA (Merck, Darmstad, Alemanha) em uma concentração fixa de 320 µg/mL, adicionado ao meio preparado para determinação da CIM do antibiótico imipenem (ARAKAWA *et al.*, 2000).

Adicionalmente, foi utilizado o método de E-Test MBL (AB Biodisk, Solna, Suécia), que consiste em uma fita contendo um gradiente de substrato (imipenem) em uma extremidade (IPM 4 - 256 µg/mL) e um gradiente de substrato combinado com o agente quelante EDTA (EDTA/IPM 1 - 64 µg/mL) em outra extremidade, onde uma redução ≥ 3 diluições na CIM do imipenem em presença de EDTA é um indicativo da produção de MBL (WALSH *et al.*, 2002; LUZZARO *et al.*, 2004).

3.6.2. Avaliação da presença dos genes codificadores de MBL

A confirmação molecular da produção de MBL foi realizada por PCR utilizando *primers* para amplificar os genes *bla*_{IMP}-like, *bla*_{VIM}-like e *bla*_{SPM-1} (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados para detecção de genes codificadores de MBL

Genes alvo	Primers	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho do amplicon	Referência
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM 1-F SPM 1-R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	648 bp	GALES <i>et al.</i> , 2003
<i>bla</i> _{VIM-like}	VIM -F VIM -R	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC GAGCAAKTCYAGACCGCCC	590 bp	BALSALOBRE, <i>et al.</i> , 2009
<i>bla</i> _{IMP-like}	IMP 1-F IMP 1-R	CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC GAACAACCAGTTTTGCCTTACC	587 bp	POIREL <i>et al.</i> , 2000
<i>bla</i> _{IMP-like}	IMP 2-F IMP 2-R	GTTTTATGTGTATGCTTCC AGCCTGTTCCCATGTAC	678 bp	NISHIO <i>et al.</i> , 2004

As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.6.3. Cálculo da sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco para triagem de MBL

Para avaliar a sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco como triagem para detecção de MBL, foi realizada análise estatística de acordo com MAUSNER & BAHN (1974), considerando a PCR como o padrão ouro no teste de detecção de MBL.

3.7. Extração de DNA bacteriano

Para extração do DNA total foi utilizado o método de fervura descrito por LINCOPAN, *et al.*, 2005. A partir de um inóculo bacteriano (item 3.3) semeado em caldo Müeller Hinton e mantido em agitador rotativo a 37°C por 18 a 20 horas a 150 rpm, alíquotas de 1 mL foram submetidas à centrifugação durante 1 minuto a 16.000 g (Eppendorf, 5415 R, USA). O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuspenso em 100 µL de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), estéril. As suspensões foram fervidas a 95°C, durante 10 minutos, em banho-maria (modelo 247, Nova Técnica, SP, Brasil). Após 5 minutos de centrifugação a 7.500 g (Eppendorf, 5415

R, USA), 100 µL de cada sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo estéril e congelados a - 20 °C.

Como controle interno da extração, as amostras de DNA obtidas foram submetidas à PCR utilizando-se os *primers*: 11E 5'- GAGGAAGGTGGGGATGACGT - 3' e 13B 5' - AGGCCCGGGAACGTATTCAC - 3' (233 bp), para pesquisa da subunidade de DNA ribossomal 16S (DA SILVA FILHO *et al.*, 2004). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min.

3.8. Avaliação da presença de genes codificadores de metilases 16S RNAr

Para detecção dos genes *armA* e *rmtA-D*, responsáveis pela produção de metilases 16S RNAr, foi realizada a técnica de PCR, utilizando os *primers* descritos na Tabela 4. As condições de ciclagem para o gene *armA* consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg e 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min. Para os genes *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD*, as demais condições foram mantidas, com exceção da temperatura de anelamento, que ocorreu a 52°C.

Tabela 4. Primers utilizados para detecção dos genes produtores de metilases

Genes alvo	Primers	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho do amplicon	Referência
<i>rmtA</i>	RMT A-F RMT A-R	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	635 bp	DOI & ARAKAWA, 2007
<i>rmtB</i>	RMT B-F RMT B-R	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA ATGCAATGCCGCGCTCGTAT	173 bp	DOI & ARAKAWA, 2007
<i>rmtC</i>	RMT C-F RMT C-R	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG ATCCCAACACTCCCACT	711 bp	DOI & ARAKAWA, 2007
<i>rmtD</i>	RMT D-F RMT D-R	CACGCGTCCACGCGCGAA CGTTTGAACCTTCTATACGC	901 bp	*
<i>armA</i>	ARM A-F ARM A-F	ATTCTGCCTATCCTAATTGG ACCTATACTTTATCGTCGTC	315 bp	DOI & ARAKAWA, 2007

* *Primers* desenhados a partir da sequência publicada no EMBL/GenBank/DDBJ databases accession number DQ914960.2.

3.9. Análise fenotípica de porina OprD de membrana externa

3.9.1 Extração de proteínas da membrana externa

O protocolo desenvolvido para realização das extrações das proteínas de membrana externa (OMP) foram adaptados segundo as metodologias descritas por ACHTMAN *et al.*, 1983 e FUNG-TOMC *et al.*, 1995. Os isolados foram semeados em 120 mL de caldo BHI e incubados por 18 a 20 horas em agitador rotativo a 37°C. Em seguida, as suspensões bacterianas foram concentradas por centrifugação a 5.000 g por 20 minutos (Sorvall, Superspeed RC2-B, USA). As células bacterianas foram inicialmente lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS), na concentração final de 10mM (pH 7,0) e, posteriormente, foram ressuspensas em 1,8 mL do mesmo tampão PBS 10mM, pH 7,0, acrescido do inibidor de protease fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha), na concentração de 1mM. As células foram rompidas a 0°C, em banho de gelo, com o auxílio de um sonicador (Sonifier 450, Bronson-USA), utilizando-se 3 pulsos de 1 minuto cada, com intervalos de 2 minutos de resfriamento a 0°C, entre cada pulso, para preservação das proteínas. Os restos celulares foram removidos através de centrifugação a 3.000 g durante 10 minutos (Eppendorf, 5415 R, USA) e o sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação a 20.000 g durante 120 minutos a 4°C (Sorvall, Ultraspeed Pro 80, USA) para que fossem coletadas as frações de membrana. O sedimento foi ressuspense em 150 µL de tampão PBS-PMSF, pH 7,0. Posteriormente, 100 µL do lisado foram tratados com 800 µL de solução de sarcosil a 2% (p/v) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as proteínas de membrana externa foram obtidas através de centrifugação a 11.000 g durante 60 minutos a 4°C (Eppendorf, 5415 R, USA). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspense em 50 µL de solução tampão PBS-PMSF, pH 7,0 e mantido sob refrigeração (4°C) durante 24 horas

para solubilização das proteínas. Posteriormente, as proteínas de membrana externa foram estocadas a -20°C para conservação e posterior análise por SDS-PAGE.

3.9.2. Avaliação da presença de porina OprD por SDS-PAGE

Para realizar a análise das porinas, as OMP obtidas anteriormente foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), para análise de proteínas em SDS-PAGE [solução-estoque de poliacrilamida: acrilamida 30% (p/v) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia); bisacrilamida 0,8% (p/v) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia); dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (p/v) (USB, Cleveland, USA)].

As proteínas foram adicionadas ao tampão de amostra [Tris-HCl 0,5M; SDS 10; glicerina 20%; azul de bromofenol 0,01%; beta-mercapto-etanol (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Merck, Darmstadt, Alemanha) pH 6,8] e aquecidas a 95°C por 10 minutos para completar o processo de desnaturação das proteínas (LAEMMLI, 1970).

A seguir, alíquotas de 10 μL das proteínas desnaturadas, foram adicionadas ao tampão de amostra e aplicadas nos géis de SDS, concentrados a 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 12% para o gel de separação, e submetidas à corrida eletroforética a 70V durante 30 minutos (tempo estimado de passagem pelo gel de empilhamento), sendo depois ajustado para 120V durante 90 minutos.

Após a eletroforese, os géis foram corados durante duas horas, com solução contendo 0,25% de coomassie blue R-250 (p/v) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, EUA), 25% de metanol e 5% de ácido acético, sendo descorados com solução contendo 10% de metanol e 5% de ácido acético, até o aparecimento das bandas.

Como controle foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (cepa portadora de porina OprD previamente conhecida como sensível ao imipenem). O peso molecular das respectivas proteínas de membrana externa foi estimado

empregando-se o padrão de massa molecular (SM0431 Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, Burlington, Canadá).

3.9.3. Avaliação da presença do gene *oprD*

A presença do gene *oprD*, no DNA cromossômico, foi verificada por PCR utilizando as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguidos de extensão final a 72°C por 5 min. Como controle positivo, empregou-se a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853. As seqüências dos iniciadores e o tamanho dos produtos são descritos na Tabela 5 e a esquematização das regiões flanqueadas pelos *primers* está na Figura 3.

Tabela 5. Primers utilizados para detecção do gene *oprD*

Genes alvo	Primers	Seqüência oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho do amplicon	Região de anelamento	Referência
<i>oprD</i>	oprDSeq F1 oprDSeq R1	CTACGCAGATGCGACATGC CCTTTATAGGCGCGTTGC	1586 bp	554/2139	YONEYAMA <i>et al.</i> , 1992
<i>oprD</i>	oprD Fwd oprDSeq R1	CTACGGCTACGGCGAGGAT CCTTTATAGGCGCGTTGC	262 bp	1877/2139	YONEYAMA <i>et al.</i> , 1992; QUALE <i>et al.</i> , 2006
<i>oprD</i>	oprD Fwd oprD Rev	CTACGGCTACGGCGAGGAT GACCGGACTGGACCACGTACT	71 bp	1877/1948	QUALE <i>et al.</i> , 2006
<i>oprD</i>	oprD F oprD R *	ATGAAAGTGATGAAGTGGAGC AGGTTATCGGTGATTGCGTA	659 bp	736/1394	PIRNAY <i>et al.</i> , 2002 *
<i>oprD</i>	oprD F oprD R2 *	ATGAAAGTGATGAAGTGGAGC TTACAGGATCGACAGCGG	1332 bp	736/2067	PIRNAY <i>et al.</i> , 2002 *

* *Primers* desenhados a partir da seqüência nucleotídica publicada no EMBL/GenBank/DDBJ databases accession number X63152.1IPAOPRD *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene

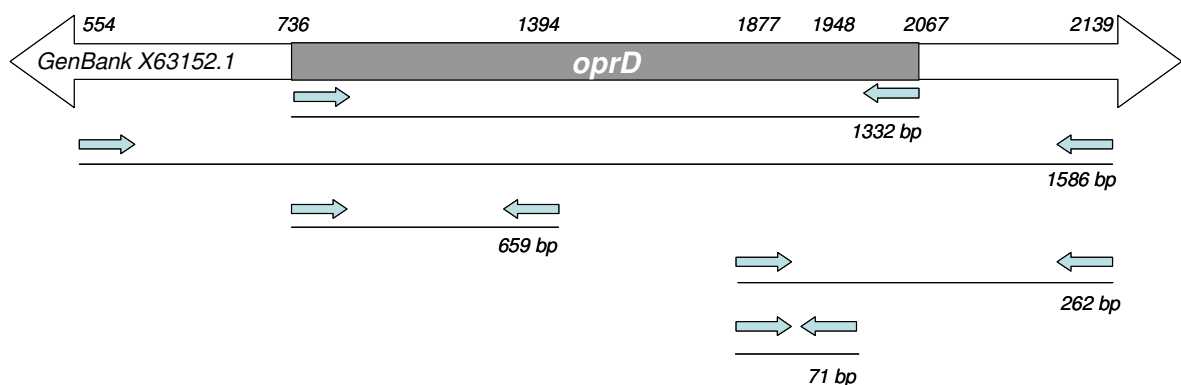


Figura 3. Esquematização dos *primers* desenhados de acordo com a seqüência obtida no GenBank (accession no. X63152.1IPAOPRD *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene)

3.10. Investigação molecular e fenotípica das bombas de efluxo

3.10.1. Investigação de genes codificadores de bombas de efluxo

Na investigação da presença de genes codificadores de bombas de efluxo os seguintes genes *mexA*, *mexB* e *mexE* foram amplificados por PCR, empregando-se os *primers* relacionados na Tabela 6.

Tabela 6. Primers utilizados para detecção dos genes *mex* codificadores de bombas de efluxo em *P. aeruginosa*

Genes alvo	Primers	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho do amplicon	Referência
<i>mexA</i>	Mex A-F	AAGGTGCTGTGCGCCGATC	120 bp	*1
	Mex A-R	GACGTAGATCGGGTCGAG		
<i>mexB</i>	Mex B-F	GTGTTTCGGCTCGCAGTACTC	244 bp	YONEDA <i>et al.</i> , 2005
	Mex B-R	AACCGTCGGGATTGACCTTG		
<i>mexE</i>	Mex E-F	CGCCTGAACCTGAGCTTC	113 bp	*2
	Mex E-R	AAGGGTGTTGAGCAGGTC		

* *Primers* desenhados a partir das sequências publicadas no EMBL/GenBank/DDBJ databases accession numbers (L11616.1)^{*1}, (X99514.1)^{*2}.

A condição de ciclagem para o gene *mexA* consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min. Para os genes *mexB* e *mexE* as condições de ciclagem foram mantidas, com exceção da temperatura de anelamento que ocorreu a 54°C.

3.10.2. Investigação fenotípica das bombas de efluxo

3.10.2.1. Método do disco combinado para detecção da produção de bombas de efluxo

Uma vez que não existem descrições de métodos de disco difusão aplicados à pesquisa de bombas de efluxo, procuramos encontrar um método que promovesse sinergia entre os inibidores específicos de efluxo, impregnados em disco, que pudessem agir a nível de gradiente de prótons (que fornece a energia necessária para a função de bomba - CCCP e PA β N) e a nível de inibição protéica (reserpina).

Para investigação fenotípica da produção de bombas de efluxo, as amostras bacterianas foram submetidas ao teste de disco combinado, utilizando como substrato os antibióticos imipenem (IPM) (10 μ g), meropenem (MEM) (10 μ g), ciprofloxacina (CIP) (5 μ g), aztreonam (ATM) (30 μ g) e levofloxacina (LEV) (5 μ g), contidos em discos comercialmente disponíveis (OXOID, Cambridge, UK) e como inibidores de efluxo, as substâncias químicas: i) reserpina (R0875, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ii) CCCP - *carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone* (C2759, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e iii) PA β N - *phenyl-arginine-beta-naphthylamide* (P4157, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), com algumas adaptações introduzidas aos métodos descritos por LOMOVSKAYA *et al.*, 2001 e DENNY *et al.*, 2005.

Inicialmente, caracterizamos os inibidores de efluxo em diferentes faixas de concentração para excluir a possibilidade de toxicidade desses compostos. Utilizamos os inibidores reserpina, CCCP e PA β N em um gradiente de 0,01 μ M a 2 μ M, aplicados em discos de papel filtro estéreis. Os inóculos bacterianos (item 3.3) foram semeados por espalhamento na superfície de placas de Petri de 150 mm contendo ágar Müeller-Hinton. Em seguida, os discos de papel filtro impregnados individualmente com os inibidores em diferentes concentrações foram depositados na superfície da placa de Petri, mantendo-se uma distância de 2 cm entre eles, e esta foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C, sendo realizada a leitura dos resultados após 24 horas. A não toxicidade dos compostos foi verificada pela ausência de halo de inibição ao redor dos discos impregnados com o inibidor específico, inclusive na maior concentração. De acordo com esses resultados, os ensaios de sinergia de disco foram realizados com as seguintes concentrações de inibidores: reserpina (200 μ g/mL), CCCP (2mM) e PA β N (2mM).

Para a realização dos ensaios de disco combinado, os inóculos (item 3.3) foram semeados por espalhamento na superfície de placas de Petri de 150 mm contendo ágar

Müller-Hinton. Em seguida, os discos de antibióticos (IPM, MEM, CIP, ATM e LEV) e os mesmos discos combinados individualmente aos inibidores (reserpina, CCCP e PA β N) foram posicionados na placa de Petri mantendo-se uma distância de 2 cm entre eles. Procedeu-se à incubação em estufa bacteriológica a 37°C, com a leitura dos resultados realizada após 24 horas. Um aumento \geq a 3 mm no diâmetro do halo de inibição foi um indicativo da produção de bomba de efluxo (POURNARAS *et al.*, 2005).

3.10.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para investigação da produção de bombas de efluxo

A confirmação da produção de bombas de efluxo foi realizada através da determinação da CIM (item 3.5) para os antibióticos meropenem, aztreonam e levofloxacina (Sigma-Aldrich, Stenheim, Alemanha) na ausência e na presença dos inibidores (reserpina, CCCP e PA β N, nas concentrações finais de 5 μ g/mL, 50 μ M e 50 μ M, respectivamente). Uma redução \geq 3 diluições na CIM do substrato combinado ao inibidor foi um indicativo da produção de bomba de efluxo (DENNY *et al.*, 2005; LOMOVSKAYA *et al.*, 2001; Pournaras *et al.*, 2005).

3.10.3. Avaliação da expressão de bombas de efluxo

3.10.3.1. Extração do RNA total

A partir de uma suspensão bacteriana 1×10^9 UFC/mL, a extração do RNA total foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo as instruções do fabricante. Após o processo de extração do RNA total, as amostras foram submetidas a tratamento para eliminação de DNA residual (etapa de digestão do DNA), sendo incubadas em estufa a 37°C (Fanem, SP, Brasil) por 30 minutos com solução de DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, Alemanha) contendo: 2 μ L de buffer RDD; 0,2 μ L de DNase I mix; 0,5 μ L de inibidor de RNase (Applied Biosystems, California, EUA), seguido de uma

etapa de incubação em termobloco a 65°C (modelo 0843, Ética Equipamentos Científicos, SP, Brasil) por 5 minutos para inativação das enzimas.

A fim de confirmar a ausência de DNA residual, foi realizada uma reação de PCR convencional para a pesquisa do gene constitutivo *rpsL* (Tabela 7) de cada amostra de RNA total obtida. As condições de ciclagem consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 30 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, seguidos de uma extensão final de 72°C por 8 min. Os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, posteriormente corado com brometo de etídio, e posteriormente visualizado em transluminador UV (modelo AlphaDigiDoc Pro, Alpha Innotech, CA, USA). A ausência de amplificação confirmava a ausência de DNA residual.

As amostras de RNA total foram então quantificadas em relação à sua concentração, expressa em ng/μL, através da medida de absorbância a 260nm em espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies INC, Wilmington, DE, EUA), concomitantemente, as amostras foram analisadas quanto à sua pureza, determinada pela razão 260/280nm. As amostras de RNA total que se situaram dentro do limiar entre 1,9 e 2,1 (WILFINGER *et al.*, 1997) foram consideradas puras e, portanto, armazenadas a - 80°C para posterior processamento e análise.

3.10.3.2. Síntese de cDNA

O DNA complementar foi sintetizado a partir de 1μg de RNA total (item 3.10.1) utilizando o Kit Omniscript RT (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. Acrescentou-se à reação 10μM de iniciador oligo d(T)₁₆ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 10 U de inibidor de RNase (Applied Biosystems,

California, EUA). As amostras foram incubadas em estufa a 37°C (Fanem, SP, Brasil) por 60 minutos e posteriormente estocadas a - 20°C.

3.10.3.3. PCR em Tempo Real para detecção de superexpressão de bombas de efluxo

A análise quantitativa da expressão dos genes de bombas de efluxo (*mexA* e *mexE*) foi realizada por PCR em tempo real a partir do cDNA gerado previamente (item 3.13.2).

Os *primers* descritos na Tabela 7 foram desenhados de acordo com as seqüências específicas para cada gene, obtidas no *GenBank*, e o software Primer Express (Applied Biosystems, California, EUA) foi empregado para verificação dos mesmos. Foi realizado um alinhamento dos *primers* obtidos utilizando o banco de genes da National Library of Medicine (*BLAST*) para constatação de especificidade.

Tabela 7. Primers utilizados na PCR em tempo real para avaliação da expressão de bombas de efluxo

Gene alvo	Primers	Seqüência oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho do amplicon	Referência
<i>rpsL</i>	rpsL-F	GCAACTATCAACCAGCTG	231 bp	WESTBROCK-WADMAN <i>et al.</i> , 1999
	rpsL-R	GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG		
<i>mexA</i>	mexA-F	AAGGTGCTGTCGCCGATC	120 bp	*1
	mexA-R	GACGTAGATCGGGTTCGAG		
<i>mexE</i>	mexE-F	CGCCTGAACCTGAGCTTC	113 bp	*2
	mexE-F	AAGGGTGGTGAGCAGGTC		

* *Primers* desenhados a partir das seqüências publicadas no EMBL/GenBank/DDBJ databases accession numbers (L11616.1)^{*1}, (X99514.1)^{*2}.

Inicialmente, para confirmar a presença de seus respectivos genes codificadores, os mesmos sistemas de efluxo a serem investigados quanto à sua expressão em *P. aeruginosa*, foram submetidos a PCR tradicional. As condições de ciclagem foram realizadas a partir de uma incubação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min. Após a análise dos produtos de amplificação e

a confirmação da presença dos fragmentos de tamanho esperado, os genes responsáveis pela codificação dos sistemas de efluxo tiveram seu nível de expressão determinado.

A análise quantitativa da expressão dos genes de bombas de efluxo (*mexA* e *mexE*) foi realizada por PCR em tempo real a partir do cDNA gerado previamente (3.13.2). A metodologia utilizada para preparar as reações de PCR em tempo real foi realizada de acordo com o manual do corante fluorescente SYBR Green utilizado (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, California, EUA). Cada reação foi composta por 1 µL de cDNA (200ng); 5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix; 0,5 µL de *primer* sense (100µM); 0,5 µL de *primer* antisense (100µM) e 3µL de água DEPC tratada, totalizando um volume final de 10µL.

As amplificações em tempo real foram realizadas no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, EUA). Como controle interno foi utilizado o par de *primers* que flanqueiam o gene *rpsL* (WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999), responsável pela codificação da subunidade 30S da proteína ribossomal S12. Como controles negativos, foram utilizadas água tratada com DEPC e amostras de RNA (para confirmar a ausência de contaminação por DNA residual) e a ausência de curva de amplificação confirmava a ausência de contaminantes.

As condições de termociclagem consistiram de incubação inicial a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, e anelamento, extensão e captura do sinal de fluorescência a 60°C por 1 min, de acordo com as recomendações estabelecidas pelo software e plataforma de instrumentação do fabricante do aparelho StepOnePlus (programa específico para SYBR Green). A curva de dissociação (curva de *melting*) foi determinada ao final da reação para garantir a especificidade dos *primers*

analisados, confirmada através da geração de um único pico resultante da reação de amplificação na temperatura esperada.

Para padronizar as reações de PCR em tempo real para cada gene, foram realizadas curvas-padrão de eficiência das reações, empregando-se diluição seriada (1:5) em 5 pontos, a partir da concentração inicial de 200ng/μL (200ng/μL a 0,36ng/μL).

Posteriormente, os produtos da reação de PCR em tempo real foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV, para confirmar a amplificação dos genes-alvo, verificada pela amplificação de produtos com pesos moleculares equivalentes aos esperados e a ausência de formação de produtos inespecíficos.

Para a análise da expressão, as curvas de amplificação foram verificadas individualmente, com o ajuste manual do limiar de detecção (*threshold*) para que os valores de C_T fossem obtidos na faixa de amplificação exponencial. Definiu-se, dessa maneira, um limiar de detecção distinto para cada gene testado: *rpsL* (0,237748), *mexA* (0,310962) e *mexE* (0,125656).

Para a obtenção da expressão relativa dos genes-alvo, os cálculos foram baseados no método do C_T comparativo, também denominado delta delta C_T ($\Delta\Delta C_T$), segundo PFAFFL, 2001 e LIVAK & SCHMITTGEN, 2001. Nesse modelo matemático, o valor de ΔC_T foi obtido pela subtração do valor de cada gene-alvo pelo valor da média de C_T do gene *rpsL* (controle interno); o valor de $\Delta\Delta C_T$ foi obtido pela subtração do valor da média de C_T da amostra desconhecida pelo valor da média de C_T da amostra referência; e elevação negativa do valor de $\Delta\Delta C_T$ na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Dessa maneira, o resultado da expressão relativa indica quantas vezes um gene é expresso em uma amostra, em relação à expressão desse mesmo gene, na cepa utilizada como referência.

Foram considerados positivos para superexpressão de bombas de efluxo, os isolados que apresentaram alterações na transcrição relativa de, no mínimo, duas vezes para o gene *mexA* (QUALE *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2009) e no mínimo 10 vezes para o gene *mexE* (KÖHLER *et al.*, 1999b), em comparação com a cepa controle Pa01.

3.11. Avaliação da relação genética entre os isolados

A diversidade genética foi estudada mediante a técnica de ERIC-PCR para tipagem genotípica, utilizando o *primer* único ERIC-2 5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3' segundo AYDIN *et al.*, 2007. As condições de ciclagem consistiram de desnaturação inicial de 94°C por 10 min, 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min e extensão a 72°C por 8 min), seguidos de uma extensão final a 72°C por 16 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, posteriormente corado com brometo de etídio, e visualizado em transluminador UV.

As porcentagens de similaridade genética, assim como os cálculos de *cluster* e a subsequente geração de dendrograma, foram realizadas com o auxílio do programa Bionumerics (Applied Mathematics, versão 5.0, Kortrijk, Bélgica), empregando-se o coeficiente de DICE (1945), utilizando uma tolerância de 3% e uma otimização de 1%, de acordo com o critério de análise baseado na similaridade dos isolados \geq a 90% (DOS ANJOS BORGES *et al.*, 2003).

4 – RESULTADOS

4.1. Antibiograma

Os antibióticos testados pelo método de Kirby-Bauer foram aqueles utilizados nos esquemas terapêuticos convencionais para casos de infecção por *P. aeruginosa*.

Na Tabela 8, são apresentadas as porcentagens de resistência encontradas nos isolados recuperados dos centros estudados.

Tabela 8. Porcentagem (%) de resistência dos isolados de *P. aeruginosa*, a antibióticos de uso habitual

n° isolados resistentes / n° isolados estudados (% resistência)					
Fonte dos isolados					
Antibiótico	A	B	C	D	Total
IPM	22/22 (100)	11/11 (100)	39/39 (100)	4/4 (100)	76/76 (100)
CAZ	3/22 (14)	11/11 (100)	39/39 (100)	1/4 (25)	54/76 (71)
MEM	9/22 (41)	11/11 (100)	38/39 (97)	4/4 (100)	62/76 (82)
AK	3/22 (14)	10/11 (91)	37/39 (95)	1/4 (25)	51/76 (67)
CIP	7/22 (32)	11/11 (100)	37/39 (95)	3/4 (75)	58/76 (76)

IPM, imipenem (10µg); CAZ, ceftazidima (30µg); MEM, meropenem (10µg); AK, ampicilina (30µg); CIP, ciprofloxacina (5µg); A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

4.2. Concentração inibitória mínima do imipenem

Para análise comparativa dos resultados obtidos a partir da determinação das CIMs, os valores foram expressos em termos de CIM₅₀ (CIM para 50% dos isolados) e CIM₉₀ (CIM para 90% dos isolados).

Como apresentado na Tabela 9, a CIM do imipenem para 50% e 90% dos isolados ficou acima do limiar que define um isolado como resistente (i.e., $\geq 16 \mu\text{g/mL}$) de acordo com o CLSI (2010).

Tabela 9. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do imipenem

CIM do imipenem		
Fonte dos isolados	n° isolados	CIM _{50/90} (µg/mL)
A	22	16/64
B	11	512/>512
C	39	256/>512
D	4	32/32
Total	76	32/>512

CIM, concentração inibitória mínima; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Com exceção dos isolados recuperados nos centros hospitalares A e D, todos os isolados exibiram um alto nível de resistência ao imipenem.

4.3. Confirmação fenotípica e molecular da produção de MBL

No método para investigação fenotípica da produção de MBL, realizado segundo ARAKAWA *et al.*, 2000 (CIM do imipenem na presença de EDTA), os isolados resistentes ao imipenem que apresentaram uma redução da CIM_{50/90} ≥ 3 diluições, foram considerados produtores de metalo-beta-lactamase (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados da confirmação fenotípica da produção de MBL através da determinação da CIM do imipenem na presença de EDTA

Fonte dos isolados	n° isolados testados	CIM (µg/mL)	
		CIM _{50/90}	
		IPM	IPM/EDTA
A	22	16/64	16/16
B	11	512/>512	16/16
C	39	256/>512	16/32
D	4	32/32	16/16
Total	76	32/>512	16/16

CIM, concentração inibitória mínima; IPM, imipenem; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Os resultados da CIM do imipenem na presença de EDTA foram confirmados através do método de E-Test MBL (AB Biodisk, Solna, Suécia).

Paralelamente à determinação da CIM na presença de EDTA e da confirmação desses resultados através do método E-Test, foi realizado o método de dupla difusão do disco, de forma similar ao utilizado para triagem de ESBL (ARAKAWA *et al.*, 2000), usando ceftazidima e imipenem como substratos e EDTA, MAA e MPA como inibidores enzimáticos. Os testes de sinergismo para determinar a melhor combinação inibidor/substrato a ser utilizada na indicação da produção de MBL, mostraram que a combinação de ácido mercaptoacético acompanhado pelo substrato ceftazidima apresentou uma maior representatividade que as demais combinações utilizadas (Tabela 11), resultando em 61% de positividade.

Tabela 11. Resultados do método de dupla difusão do disco para detecção de isolados produtores de MBL

Fonte dos isolados	Triagem MBL					
	nº de isolados positivos / nº de isolados testados (% positividade)					
	CAZ			IPM		
	EDTA	MAA	MPA	EDTA	MAA	MPA
A	2/22 (9)	3/22 (14)	2/22 (9)	3/22 (14)	1/22 (5)	0/22 (0)
B	6/11 (55)	9/11 (82)	8/11 (73)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)
C	24/39 (62)	34/39 (87)	12/39 (31)	3/39 (8)	18/39 (46)	1/39 (3)
D	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)
Total	32/76 (42)	46/76 (61)	22/76 (29)	6/76 (8)	19/76 (25)	1/76 (1)

MBL, metalo-beta-lactamase; CAZ, ceftazidima; IPM, imipenem; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; MAA, ácido mercaptoacético; MPA, ácido mercaptopropiônico; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Na Figura 4, são apresentadas as reações de positividade e negatividade ao método de dupla difusão do disco para detecção de isolados produtores da enzima MBL, bem como a confirmação da metodologia pelo método da fita E-Test.

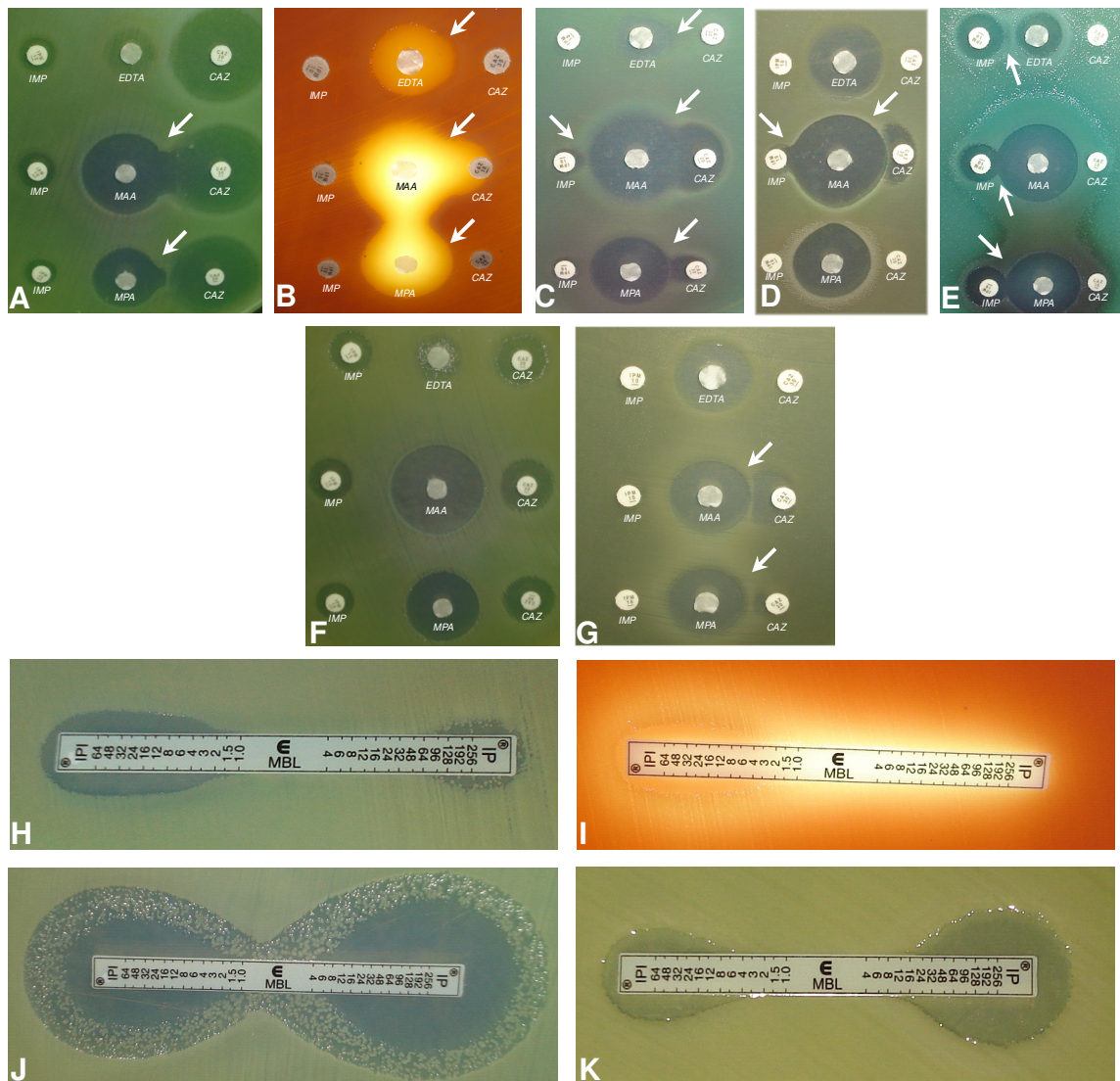


Figura 4. Método da dupla difusão do disco (A-G) e método E-Test MBL (H-K). (A) Positividade para MAA-CAZ e MPA-CAZ (formação de zona de inibição de crescimento bacteriano, indicada pelas setas); (B) Positividade para EDTA-CAZ, MAA-CAZ, MPA-CAZ; (C) Positividade para EDTA-CAZ, MAA-IMP, MAA-CAZ, MPA-CAZ; (D) Positividade para MAA-CAZ e MAA-IMP; (E) Positividade para EDTA-IMP, MAA-IMP, MPA-IMP; (F) Falsa negatividade das amostras devido à falha na metodologia (espaço entre os discos maior que 2 cm); (G) Distância adequada entre os discos (2 cm entre cada um) revelando positividade para MAA-CAZ e MPA-CAZ; (H) E-Test positivo em isolado SPM-1 (decréscimo do MIC de 96 $\mu\text{g/ml}$ para 2 $\mu\text{g/mL}$ na presença do EDTA); (I) E-Test positivo em isolado SPM-1 (decréscimo do MIC de >256 $\mu\text{g/ml}$ para 4 $\mu\text{g/mL}$ na presença do EDTA); (J) E-Test negativo (decréscimo do MIC de 4 $\mu\text{g/ml}$ para 2 $\mu\text{g/mL}$ na presença do EDTA); (K) E-Test positivo em isolado VIM (decréscimo do MIC de 16 $\mu\text{g/ml}$ para 4 $\mu\text{g/mL}$ na presença do EDTA). IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; MAA, ácido 2-mercaptopacético; MPA, ácido 2-mercaptopropiônico.

A confirmação molecular dos fenótipos MBL foi realizada através da técnica da reação de polimerização em cadeia (PCR) para detecção dos genes codificadores de MBL *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} e *bla*_{SPM-1}.

A presença de MBL foi confirmada em 74% (56/76) dos isolados, sendo que 62% (47/76) carregavam genes *bla*_{SPM-1} e 12% (9/76) carregavam genes *bla*_{VIM-like}, não sendo detectado isolado portador de *bla*_{IMP-like}.

Os resultados do percentual de positividade dos genes *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like} e *bla*_{SPM-1} são sumarizados na Tabela 12.

Tabela 12. Frequência de genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-like}, codificadores de MBL, em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte dos isolados	Genes codificadores de MBL		
	n° isolados detectados / n° isolados estudados (% positividade)		
	MBL		
	<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>bla</i> _{VIM-like}	Total de isolados MBL positivos
A	1/22 (5)	8/22 (36)	9/22 (41)
B	10/11 (91)	1/11 (9)	11/11 (100)
C	34/39 (87)	0/39 (0)	34/39 (87)
D	2/4(50)	0/4 (0)	2/4 (50)
Total	47/76 (62)	9/76 (12)	56/76 (74)

MBL, metalo-beta-lactamase; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

A maior positividade (100%) para genes produtores de MBL, foi encontrada nos isolados provenientes do local B.

Os controles positivos dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{IMP-like} foram amplificados e são apresentados na Figura 5, indicando, portanto, que se *bla*_{IMP-like} estivesse presente, ele teria sido detectado.

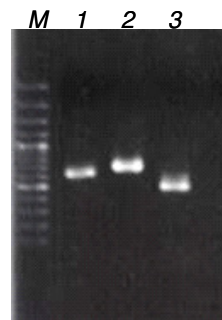


Figura 5. Amplificações das cepas controle para os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{IMP-like}. M, marcador de peso molecular 100 bp (SM0321, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá); Linhas 1, 2 e 3, produto de amplificação dos genes *bla*_{IMP-like} (~ 600 bp), *bla*_{SPM-1} (~ 650 bp) e *bla*_{VIM-like} (~ 590 bp), respectivamente. Gel de agarose 1% revelado com brometo de etídio.

Uma vez que a presença dos genes foi confirmada pela PCR, determinou-se a sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco, para a triagem de MBL em isolados de *P. aeruginosa*, com o intuito de estipular a combinação ideal de inibidor-substrato a ser usada na rotina laboratorial. Os resultados da análise são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos de dupla difusão do disco para detecção de MBL

Inibidor/Substrato	Sensibilidade e especificidade dos métodos de triagem para detecção de amostras MBL positivas			
	Total de isolados MBL positivos = 56			
	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>bla</i> _{VIM-like}	<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>bla</i> _{VIM-like}
	n = 47	n = 9	n = 47	n = 9
EDTA/IPM	6	22	90	94
EDTA/CAZ	64	11	93	52
MAA/IPM	41	n/d	97	72
MAA/CAZ	89	11	86	33
MPA/IPM	n/d	n/d	97	99
MPA/CAZ	40	11	90	69

IPM, imipenem; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; CAZ, ceftazidima; MAA, ácido mercaptoacético; MPA, ácido mercaptopropiônico; n/d, não detectado; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Para a triagem fenotípica de MBL, quando a produção foi associada à produção de SPM-1, a maior sensibilidade foi observada usando MAA como inibidor e ceftazidima como substrato (89%). Com relação à especificidade, a melhor combinação foi MAA e MPA combinado a IPM (97%).

Em relação à enzima VIM, o maior percentual de sensibilidade foi observado com a combinação inibidor-substrato EDTA-IPM (22%), porém, para especificidade, a melhor combinação demonstrou ser MPA-IPM (94%).

4.4. Avaliação da presença de genes codificadores de metilases 16S RNAr

Uma vez que os isolados estudados apresentaram um alto nível de resistência para aminoglicosídeos (67% de resistência para amicacina, Tabela 8), foi realizada a pesquisa de genes 16S RNAr através de PCR, de acordo com os *primers* descritos na Tabela 4. Do total de 76 isolados, 66% apresentaram o gene *rmtD*, sendo que tanto esse gene *rmtD* como o gene *bla_{SPM-1}* foram encontrados em 61% dos isolados estudados (Tabela 14), conferindo um fenótipo de multirresistência quase à totalidade dos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos testados (Tabela 15). A pesquisa para os demais genes produtores de metilases (*armA*, *rmtA*, *rmtB* e *rmtC*) foi negativa.

Tabela 14. Presença dos genes *bla_{SPM-1}* e *rmtD* codificadores de enzimas SPM-1 e metilase RmtD em *P. aeruginosa*, respectivamente

Percentual de positividade dos genes codificadores de SPM-1 e RmtD
n° isolados detectados / n° isolados estudados (%)

Fonte dos isolados	<i>bla_{SPM-1}</i>	<i>rmtD</i>	Total de isolados carregando ambos genes
A	1/22 (5)	3/22 (14)	1/22 (5)
B	10/11 (91)	10/11 (91)	10/11 (91)
C	34/39 (87)	36/39 (92)	34/39 (87)
D	2/4(50)	1/4 (25)	1/4 (25)
Total	47/76 (62)	50/76 (66)	46/76 (61)

A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Do total dos isolados co-produtores de MBL e metilase, 98% apresentaram resistência a amicacina e ao imipenem (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagem (%) de resistência dos isolados de *P. aeruginosa*, a antibióticos aminoglicosídeos e carbapenêmicos

Fonte dos isolados	Resistência antibacteriana			
	n° isolados resistentes / n° isolados estudados (% resistência)			
	AK	AK/ <i>bla</i> _{SPM-1} + <i>rmtD</i> positivos	IPM	IPM/ <i>bla</i> _{SPM-1} + <i>rmtD</i> positivos
A	3/22 (14)	1/1 (100)	22/22 (100)	1/1 (100)
B	10/11 (91)	10/10 (100)	11/11 (100)	10/10 (100)
C	37/39 (95)	33/34 (97)	39/39 (100)	34/34 (100)
D	1/4 (25)	0/1 (0)	4/4 (100)	1/1 (100)
Total	51/76 (67)	45/46 (98)	76/76 (100)	46/46 (100)

AK, amicacina; IPM, imipenem; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

4.5. Produção de porina OprD

4.5.1. Investigação fenotípica da produção de porina OprD

Dentre os 76 isolados analisados, 13 (17 %) apresentaram positividade para a banda correspondente à porina OprD de ~ 46 kDa e foi verificada a presença de bandas de tamanho equivalente a ~ 45 kDa em 3% (2/76) dos isolados e ~ 47 kDa em 9% (7/76) dos isolados (Figura 6), presentes em isolados MBL positivos e negativos, como é possível verificar nas Tabelas 16 e 17.

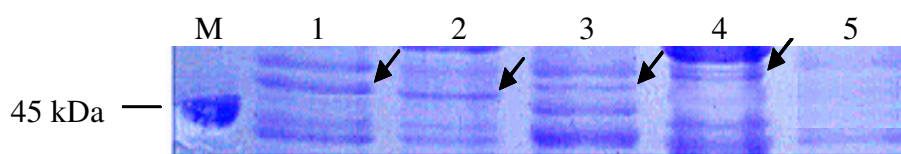


Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE de proteínas OprD de *P. aeruginosa* corado por coomassie blue R-250. M, padrão de peso molecular (SM0431, Fermentas, Burlington, Canadá); linha 1, cepa ATCC 27853 (portadora de porina OprD - 46 kDa); linha 2, isolado com porina de 45 kDa; linha 3, isolado com presença de porina de 46 kDa; linha 4, isolado com porina de 47 kDa; linha 5, isolado com ausência de porina de 45 a 47 kDa.

Tabela 16. Investigação de porina OprD em 56 isolados de *P. aeruginosa* MBL positivos de diferentes procedências, de acordo com a determinação fenotípica

Percentual (%) de positividade para a presença de porinas em isolados MBL positivos

Fonte dos isolados	CIM ₅₀ IPM/ CIM ₅₀ IPM + EDTA	Ausência de porinas/ Isolados MBL positivos (%)	Presença de porina ~ 45 kDa/ Isolados MBL positivos (%)	Presença de porina ~ 46 kDa/ Isolados MBL positivos (%)	Presença de porina ~ 47 kDa/ Isolados MBL positivos (%)
A	16/16	4/9 (44)	2/9 (22)	1/9 (11)	2/9 (22)
B	512/16	8/11 (73)	0/11 (0)	2/11 (18)	1/11 (9)
C	256/32	24/34 (71)	0/34 (0)	8/34 (22)	2/34 (6)
D	32/16	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)	1/2 (50)
Total	32/16	37/56 (66)	2/56 (4)	11/56 (20)	6/56 (11)

CIM, concentração inibitória mínima; IPM, imipenem; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; MBL, metalo-beta-lactamase; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

É interessante o fato de que 37/56 (66%) isolados MBL positivos não apresentaram porina (Tabela 16).

Tabela 17. Investigação de porina OprD em 20 isolados de *P. aeruginosa* MBL negativos de diferentes procedências, de acordo com a determinação fenotípica

Percentual (%) de positividade para a presença de porinas em isolados MBL negativos

Fonte dos isolados	CIM ₅₀ IPM/ CIM ₀ IPM + EDTA	Ausência de porinas/Isolados MBL negativos (%)	Presença de porina ~ 45 kDa/ Isolados MBL negativos (%)	Presença de porina ~ 46 kDa/ Isolados MBL negativos (%)	Presença de porina ~ 47 kDa/ Isolados MBL negativos (%)
A	16/16	12/13 (92)	0/13 (0)	1/13 (8)	0/13 (0)
B	-	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
C	32/16	4/5 (80)	0/5 (0)	0/5 (0)	1/5 (20)
D	32/16	1/2 (50)	0/2 (0)	1/2 (50)	0/2 (0)
Total	32/16	17/20 (85)	0/20 (0)	2/20 (10)	1/20 (5)

CIM, concentração inibitória mínima; IPM, imipenem; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; MBL, metalo-beta-lactamase; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

A alta taxa de ausência de porina (85%) em isolados MBL negativos (Tabela 17) confirma o mecanismo de impermeabilidade, traduzida pela resistência ao imipenem com uma CIM pouco acima do limiar característico dos isolados MBL negativos. A presença de porina OprD em 15% dos isolados MBL negativos indica a ocorrência de outros mecanismos relacionados à resistência.

4.5.2. Investigação da presença do gene codificador de porina *OprD*

A presença do gene *oprD*, codificador da porina OprD, foi investigada pela técnica de PCR nos 76 isolados imipenem resistentes. Como controle positivo da reação, foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Foram utilizados diferentes pares de *primers* (Tabela 5) que foram construídos tendo como seqüência de referência, a publicação X63152.1 do GenBank (*Pseudomonas aeruginosa oprD* gene).

As amplificações para a pesquisa do gene *oprD*, indicaram a presença de fragmentos em 87% (66/76) dos isolados analisados, quando foi considerada a região 554/2139 equivalente a 1586 bp.

Uma vez que *oprD* é considerado um gene estrutural, sua ausência em 10/76 (13%) isolados (Figura 7), foi sugestiva de um evento genético associado a seqüências de inserção e/ou presença de polimorfismos no gene.

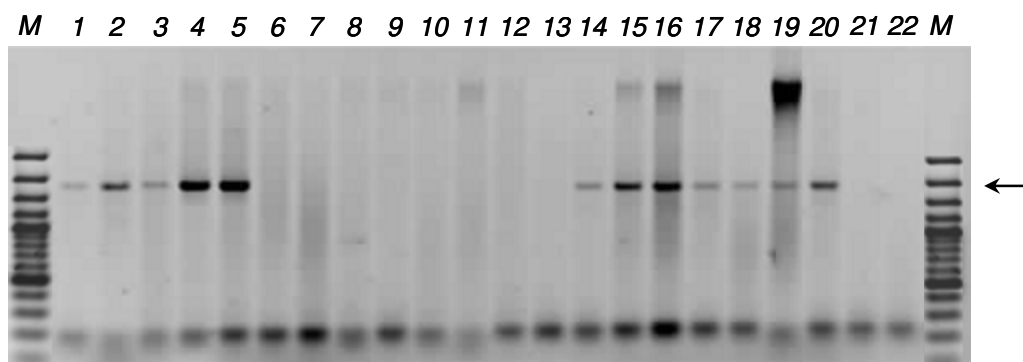


Figura 7. Amplificações do gene *oprD* região 554/2139 equivalente a 1586 bp, de isolados de *P. aeruginosa*. Como se nota nas linhas 6 a 13, e 21, 22, dez isolados não apresentaram amplificação de fragmentos. M, padrão de peso molecular 100 bp (SM0321, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá)

Assim, para confirmar este evento, foi utilizado um novo par de *primers* específicos para anelar em uma região próxima a 3' (1877 bp). Conforme a seqüência do gene *oprD* obtida no *GenBank* (Figura 3).

A amplificação de um novo fragmento de 262 bp gerado pelo *primer oprD* região 1877/2139 foi verificada em 9 isolados imipenem resistentes (Figura 8) que não haviam apresentado amplificação na região 554/2139 (Tabela 18), sugerindo-se assim a presença de uma sequência de inserção na região *upstream* a 1877.

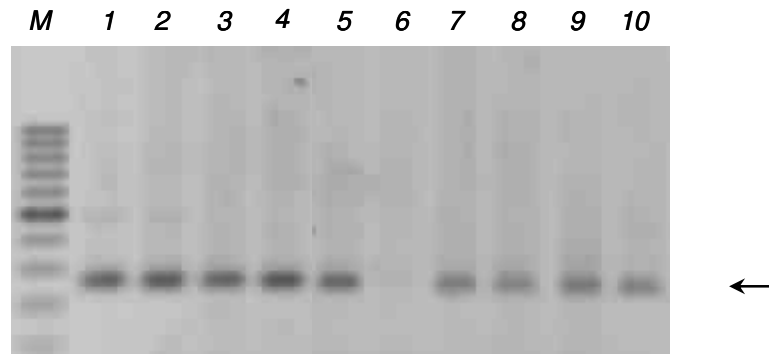


Figura 8. Amplificações do gene *oprD* região 1877/2139 de 262 bp dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* negativos para a amplificação do gene *oprD* região 554/2139. M, padrão de peso molecular 100 bp (SM0321, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá); linhas 1 a 5 e 7 a 10, amplificações positivas; linha 6, isolado 40 do local A, negativo para a amplificação do gene *oprD* região 1877/2139.

Devido ao resultado negativo para *oprD* mesmo utilizando os *primers* para amplificação de fragmentos das regiões 554/2139 e 1877/2139 em um único isolado, um *primer* foi utilizado para a detecção de fragmentos da região 1877/1948 e a amplificação foi positiva (Figura 9). Dessa forma, também foi sugerida a presença de uma sequência de inserção na região entre 1877 bp e 1948 bp.

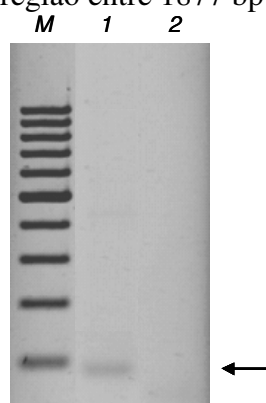


Figura 9. Amplificações do gene *oprD* região 1877/1948 equivalente a 71 bp do isolado clínico de *P. aeruginosa*, negativo para a amplificação dos genes *oprD* região 554/2139 e *oprD* região 1877/2139. M, padrão de peso molecular 100 bp (SM0321, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá); linha 1, isolado 40 (A); linha 2, controle negativo.

É interessante observar que a CIM do imipenem para estes isolados carregando possíveis seqüências de inserção dentro do gene *oprD*, variou entre 8 e 32 µg/mL e não houve queda da CIM na presença de EDTA (Tabela 18).

Tabela 18. Características fenotípicas de 17 isolados com ausência de amplificação de diferentes regiões do gene *oprD*

Isolados (Fonte)	CIM IPM/ IPM+EDTA	MBL	Pesquisa do gene <i>oprD</i>					SDS-PAGE	
			Região 554/2139 (1586 bp)	Região 1877/2139 (262 bp)	Região 1877/1948 (71 bp)	Região 736/2067 (1332 bp)	Região 736/1394 (659 bp)	Porina OprD (kDa)	Mecanismo de Resistência Inferido (IPM)
6 (A)	16/16	-	-	+	+	+	+	-	Imperm
7 (A)	16/16	-	-	+	+	+	+	-	Imperm
8 (A)	32/16	-	-	+	+	+	+	-	Imperm
10 (A)	16/16	VIM	-	+	+	+	+	-	Imperm
11 (A)	16/16	VIM	-	+	+	+	+	-	Imperm
20 (A)	16/16	-	-	+	+	+	-	-	Imperm
40 (A)	16/16	VIM	-	-	+	+	+	-	Imperm
33/34 (B)	>512/2	SPM	+	+	+	+	-	-	Imperm + MBL
5 (C)	128/16	SPM	+	+	+	+	-	47	MBL
6 (C)	64/16	-	+	+	+	+	-	47	MBL
8 (C)	256/32	SPM	+	+	+	+	-	47	MBL
9 (C)	64/16	SPM	+	+	+	+	-	-	Imperm + MBL
10 (C)	64/16	SPM	+	+	+	+	-	-	Imperm + MBL
11 (C)	>512/32	SPM	+	+	+	+	-	46	MBL
35 (C)	8/8	-	-	+	+	+	+	-	Imperm
73/84B (D)	32/16	-	-	+	+	+	-	-	Imperm
c916 (D)	32/16	-	-	+	+	+	+	46	MBL
ATCC 27853	S	-	+	+	+	+	+	46	-

IPM, imipenem; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; MBL, metalo-beta-lactamase; *oprD*, gene codificador de porina OprD; Imperm, impermeabilidade; (+) positivo / presente; (-) negativo / ausente.

Visando amplificar uma região íntegra do gene *oprD*, responsável pela expressão da porina OprD, de modo a identificar a localização de seqüências de inserção em isolados que previamente apresentaram uma PCR negativa ou possíveis polimorfismos, um novo par de *primers* foi desenhado para a região 736/2067 (Tabela 5, Figura 3). Os resultados destes novos experimentos revelaram amplificação de fragmentos específicos de 1332 bp em 100% das amostras analisadas (Tabela 19).

Tabela 19. Percentual (%) de ampliações positivas para a investigação do gene *oprD* nos isolados IPM resistentes provenientes de diversos hospitais

Fonte dos isolados	<i>oprD</i> 554/2139 (1586 bp) /isolados IPM resistentes (%)	<i>oprD</i> 1877/2139 (262 bp) /isolados IPM resistentes (%)	<i>oprD</i> 1877/1948 (71 bp) /isolados IPM resistentes (%)	<i>oprD</i> 736/2067 (1332 bp) /isolados IPM resistentes (%)	<i>oprD</i> 736/1394 (659 bp) /isolados IPM resistentes (%)
A	15/22 (68)	21/22 (95)	22/22 (100)	22/22 (100)	21/22 (95)
B	11/11 (100)	11/11 (100)	11/11 (100)	11/11 (100)	10/11 (91)
C	38/39 (97)	39/39 (100)	39/39 (100)	39/39 (100)	33/39 (85)
D	2/4 (50)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	3/4 (75)
Total	66/76 (87)	75/76 (99)	76/76 (100)	76/76 (100)	67/76 (88)

IPM, imipenem; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Uma nova PCR para amplificar a região 736/1394, equivalente a 659 bp, foi negativa em 12% das amostras (Tabela 19), sugerindo que nesses isolados esta ausência da porina OprD muito provavelmente estava associada com a presença de um polimorfismo localizado entre a região 736/1394, enquanto nos isolados onde não ocorreu amplificação para a região 1877/2139, provavelmente uma seqüência de inserção entre a região 554/1877 estava envolvida. Já nos isolados que apresentaram uma PCR negativa para as regiões 554/2139 e 736/1394 provavelmente ambos eventos podem ocorrer.

Os dados apresentados confirmam relatos prévios sobre resistência ao imipenem associada à impermeabilidade ocasionada pela ausência da porina OprD. Essa resistência se caracteriza, fenotipicamente, por uma CIM que se enquadra dentro de um limiar característico de um isolado com resistência intermediária (8 – 16 µg/ml) (Tabela 18), de acordo com o CLSI (2010).

Como observado na Tabela 18, nove isolados envolvidos com a presença de mutações e/ou polimorfismos em diferentes regiões do gene *oprD* apresentaram presença de MBL e a maioria dos isolados MBL positivos não apresentou decréscimo da CIM na presença de EDTA. O isolado de *P. aeruginosa* c916 (D), não apresentou uma queda da CIM do IPM na presença de EDTA característica da produção de MBL, e teve a presença da porina de 46 kDa confirmada por SDS-PAGE.

Os critérios de interpretação dos mecanismos fenotípicos de resistência ao imipenem podem ser inferidos a partir da determinação da CIM na presença e na ausência de EDTA, como observado na Tabela 20 (adaptação de LIVERMORE, 2002).

Tabela 20. Interpretação fenotípica de mecanismos de impermeabilidade associado à produção de metalo-beta-lactamase (MBL)

IPM	IPM/EDTA	Porina OprD	MBL
S	S	+	-
I/R	I/R	-	-
R	R	-	+
R	S	+	+

IPM, imipenem; MBL, metalo-beta-lactamase; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; R, resistente; I, intermediário; S, sensível; (+) positivo / presente; (-) negativo / ausente.

4.6. Investigação molecular e fenotípica da produção de bombas de efluxo

4.6.1. Investigação da presença de genes codificadores de bombas de efluxo

Em um total de 76 amostras analisadas quanto à presença dos genes *mex*, em 92% (70/76) houve amplificação do gene *mexA* e em 82% (62/76) houve amplificação do gene *mexE*. Os resultados detalhados dessa análise podem ser verificados na Tabela 21.

Tabela 21. Distribuição percentual (%) de genes codificadores de bombas efluxo em 76 amostras imipenem resistentes, de acordo com o local de isolamento

Pesquisa dos genes *mex* codificadores de proteínas do sistema de efluxo

Fonte dos isolados	Isolados positivos / Isolados investigados (%)		
	<i>mexA</i>	<i>mexB</i>	<i>mexE</i>
A	20/22 (91)	22/22 (100)	19/22 (86)
B	7/11 (64)	11/11 (100)	7/11 (64)
C	39/39 (100)	39/39 (100)	32/39 (82)
D	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)
Total	70/76 (92)	76/76 (100)	62/76 (82)

A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

4.6.2. Investigação fenotípica da produção de bombas de efluxo

A investigação foi focalizada para o estudo de 20 isolados imipenem resistentes, MBL negativos.

4.6.2.1. Método do disco combinado para detecção da produção de bombas de efluxo

Os ensaios de disco combinado para os experimentos de investigação de bombas de efluxo (Figura 10), foram realizados utilizando os inibidores (reserpina, CCCP e PA β N) e os substratos (imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina e aztreonam).

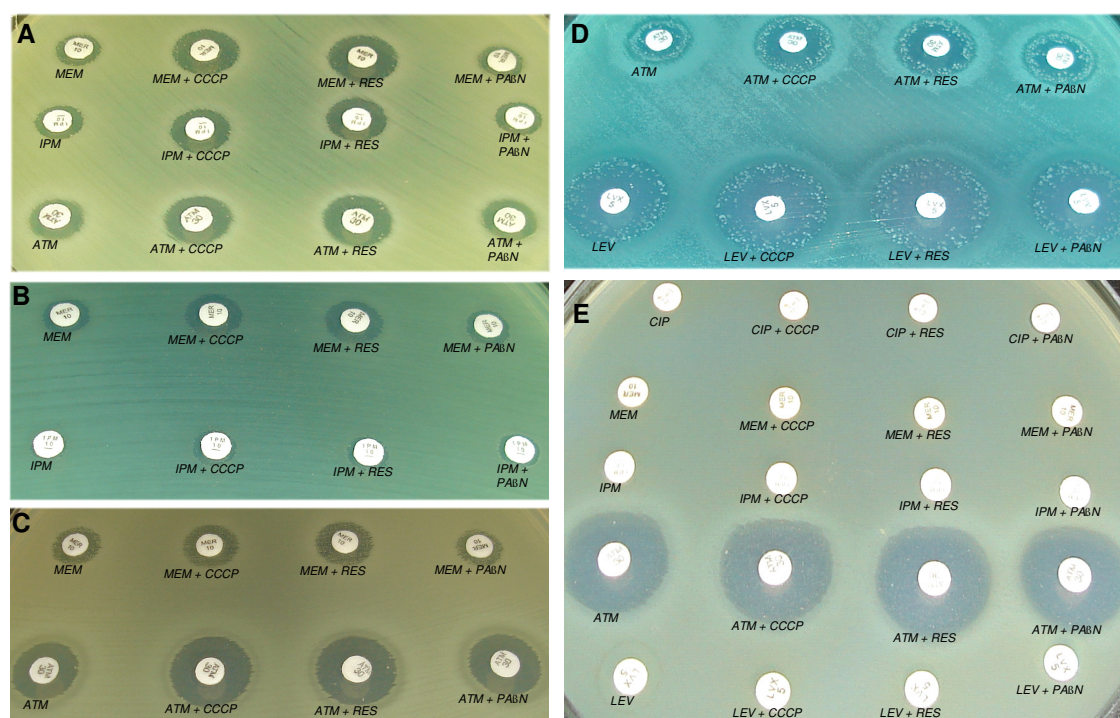


Figura 10. Método do disco combinado para avaliação fenotípica da presença de bombas de efluxo em *P. aeruginosa*. (A) Positividade para MEM-CCCP, MEM-RES, IPM-CCCP, IPM-RES, ATM-CCCP e ATM-RES; (B) Positividade para MEM-CCCP, MEM-RES e negatividade para IPM combinado a todos inibidores testados; (C) Positividade para MEM-CCCP, MEM-RES, ATM-CCCP, ATM-RES e ATM-PA β N; (D) Positividade para ATM-CCCP, ATM-RES, ATM-PA β N, LEV-CCCP, LEV-RES e LEV-PA β N; (E) Amostra negativa para todos os substratos (CIP, MEM, IPM, ATM e LEV) na presença de todos os inibidores testados (CCCP, RES e PA β N). CCCP, carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone; RES, reserpina; PA β N, phenyl-arginine-beta-naphthylamide; MEM, meropenem; IPM, imipenem; ATM, aztreonam LEV, levofloxacina; CIP, ciprofloxacina.

Em isolados imipenem resistentes MBL negativos, a combinação meropenem / reserpina revelou atividade sinérgica para 30% (6/20) dos isolados quando comparada às demais combinações (Tabela 22).

Tabela 22. Atividade sinérgica do inibidor de efluxo x antibióticos em isolados imipenem resistentes não produtores de metaloenzimas

Fonte dos isolados	Inibidor + Antibiótico / Amostras MBL negativas											
	CCCP				Reserpina				PAβN			
	MEM	IPM	LEV	ATM	MEM	IPM	LEV	ATM	MEM	IPM	LEV	ATM
A	3/13	0/13	2/13	0/13	5/13	0/13	4/13	2/13	3/13	0/13	1/13	0/13
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0/5
D	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Total	4/20	0/20	3/20	0/20	6/20	0/20	5/20	3/20	4/20	1/20	2/20	0/20

CCCP, carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone; RES, reserpina; PAβN, phenyl-arginine-beta-naphthylamide; LEV, levofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Além dos resultados percentuais para detecção, a reserpina foi o inibidor de efluxo que apresentou o maior diâmetro de inibição, geralmente acima de 4 mm, em combinação com os antibióticos testados (Figura 10).

O inibidor CCCP indicou sinergismo com os antibióticos meropenem e levofloxacina, a reserpina, com os antibióticos meropenem, levofloxacina e aztreonam e, finalmente, o PAβN, com os antibióticos meropenem, imipenem e levofloxacina. Não houve resultado positivo para nenhum inibidor combinado a ciprofloxacina. A média do diâmetro do halo de inibição nos isolados positivos para o ensaio foi de 4 mm. Dos 20 isolados MBL negativos, 12 (60%) apresentaram um aumento no halo de inibição na presença de um ou mais inibidores de bomba de efluxo (Anexo 2).

4.6.2.2. Concentração inibitória mínima para detecção da produção de bombas de efluxo

Um outro método fenotípico utilizado para avaliar o fenótipo da produção de bombas de efluxo foi a determinação da CIM com os substratos meropenem, levofloxacina e aztreonam, na presença dos mesmos inibidores utilizados (reserpina, CCCP e PAβN). Os resultados destes ensaios podem ser visualizados na Tabela 23.

Tabela 23. Concentração inibitória mínima do inibidor de efluxo x antibióticos em isolados imipenem resistentes não produtores de MBL

Fonte dos isolados	Redução positiva (≥ 3 diluições) na queda da CIM na presença de inibidores de bombas de efluxo								
	isolados positivos / isolados imipenem resistentes								
	CCCP			Reserpina			PAβN		
	LEV	MEM	ATM	LEV	MEM	ATM	LEV	MEM	ATM
A	0/13	1/13	0/13	0/13	0/13	0/13	4/13	0/13	0/13
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	2/5	0/5	1/5
D	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
Total	0/20	1/20	0/20	0/20	1/20	0/20	8/20	0/20	1/20

CCCP, carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone; RES, reserpina; PAβN, phenyl-arginine-beta-naphthylamide; LEV, levofloxacina; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

Uma queda da CIM na presença de PAβN foi confirmada em 40% (8/20) isolados imipenem resistentes quando se utilizou levofloxacina como substrato. Adicionalmente, um isolado apresentou um aumento na CIM para a combinação MEM / CCCP, outro para MEM / reserpina e um terceiro isolado para ATM/PAβN.

4.7. Detecção de superexpressão de bombas de efluxo por PCR em Tempo Real

Na análise da expressão dos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN, descritos previamente como sistemas associados à resistência aos carbapenêmicos (AESCHLIMANN, 2003), avaliamos especificamente a expressão dos genes *mexA* e *mexE* nos 76 isolados imipenem resistentes.

A análise da expressão dos genes codificadores de bombas de efluxo foi realizada utilizando-se como metodologia a quantificação relativa. Todos os ensaios para eficiência da reação foram realizados em triplicata, e em todos os casos, as curvas apresentaram valor de coeficiente de correlação (R^2 próximos a 0,99), inclinações da reta próximos a -3,2 e eficiência (E) próximos de 1.

A superexpressão do efluxo foi avaliada de acordo com o aumento da transcrição no mínimo duas vezes para o gene *mexA* (QUALE *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2009) e no mínimo 10 vezes para o gene *mexE* (KÖHLER *et al.*, 1999b), em comparação com a cepa controle Pa01.

Como observado na Tabela 24, a expressão dos genes *mexA* e *mexE* foi confirmada em 14/76 isolados imipenem resistentes (18%). Dentre esses isolados, 11/14 (79%) co-expressavam os sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN, sendo que 7/11 (64%) foram MBL negativos, 3/11 (27%) foram produtores de MBL do tipo SPM-1 e, 1/11 (9%) foi produtor de MBL do tipo VIM (Anexos 1, 3 e 4).

Tabela 24. Pesquisa de superexpressão das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, através de PCR em tempo real

Fonte dos isolados	Genes pesquisados por PCR em tempo real	
	isolados detectados / isolados pesquisados (%)	
	<i>mexA</i>	<i>mexE</i>
A	6/22 (27)	6/22 (27)
B	1/11 (9)	3/11 (27)
C	3/39 (8)	2/39 (5)
D	4/4 (100)	3/4 (75)
Total	14/76 (18)	14/76 (18)

A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras

Uma análise mais detalhada para validar a utilidade dos métodos fenotípicos utilizados na triagem da presença de bombas de efluxo pode ser deduzida a partir dos resultados de expressão dos genes *mexA* e *mexE* para os isolados imipenem resistentes não produtores de MBL (Tabela 25).

Tabela 25. Características fenotípicas e moleculares de 20 isolados imipenem resistentes MBL negativos

Isolado	Fonte de isolamento	Ano	Cluster	Perfis de resistência					CIM IPM	Porina (kDa)	Disco Combinado Antibiótico/Inibidor	CIM Efluxo Antibiótico/Inibidor	PCR mex	PCR Tempo Real	2 ^(-AACT) mexA/mexE	Mecanismo de Resistência Inferido (IPM)
				CAZ	IPM	MEM	AK	CIP								
14	A	2004	I	S	R	I	S	S	32	-	-	-	A, E	A, E	26,1/91,47	PORINA / EFLUXO
7	A	2004	I	S	R	S	S	S	16	-	MEM / CCCP, PAβN, RES LEV / CCCP, RES, PAβN	-	A, E	-	-	PORINA
20	A	2004	I	S	R	S	S	S	16	-	MEM / RES LEV / CCCP, RES ATM / RES	-	A, E	A, E	3,91/127,71	PORINA / EFLUXO
39	A	2004	I	I	R	R	R	R	16	-	-	LEV / PAβN	A	-	-	PORINA
47	A	2004	III	S	R	S	S	S	16	-	MEM / CCCP, PAβN, RES LEV / RES	-	A, E	-	-	PORINA
16	A	2004	IV	S	R	R	R	R	32	-	-	-	A, E	-	-	PORINA
17	A	2004	IV	I	R	I	S	S	32	-	ATM / RES	-	A, E	-	-	PORINA
12	A	2004	VI	S	R	I	S	S	16	-	-	-	A, E	A, E	13,52/13,41	PORINA / EFLUXO
73/84B	D	2007	VII	S	R	R	S	S	32	-	-	LEV / PAβN	A, E	A, E	10,32/54,59	PORINA / EFLUXO
c916	D	2007	VIII	S	R	R	S	R	32	46	-	LEV / PAβN	A, E	A, E	4,17/36,86	EFLUXO
49	A	2004	IX	S	R	S	S	S	8	-	LEV / RES	LEV / PAβN	-	-	-	PORINA
8	A	2004	IX	S	R	S	S	S	32	-	-	MEM / CCCP	A, E	-	-	PORINA
1	A	2004	X	S	R	S	S	S	8	-	MEM / CCCP, PAβN, RES	LEV / PAβN	A, E	A, E	14,84/22,93	PORINA / EFLUXO
35	C	2004	XI	R	R	R	R	I	8	-	IPM / PAβN	-	A, E	-	-	PORINA
6	A	2004	XII	R	R	R	S	S	16	-	-	-	A, E	-	-	PORINA
24	C	2004	XIV	R	R	R	R	R	64	-	-	LEV / PAβN	A	-	-	PORINA
25	C	2004	XIV	R	R	R	R	R	32	-	ATM / RES	LEV / PAβN	A	-	-	PORINA
27	C	2004	XV	R	R	R	S	S	8	-	LEV / CCCP, RES, PAβN	ATM / PAβN	A, E	-	-	PORINA
27	A	2004	XX	S	R	R	S	R	32	46	MEM / RES	LEV / PAβN	A, E	A, E	7,66/153,91	EFLUXO
6	C	2004	XXIII	R	R	R	S	S	64	47	MEM / CCCP, PAβN, RES	MEM / RES	A, E	-	-	

CAZ, ceftazidima; IPM, imipenem; MEM, meropenem; AK; amicacina; CIP; ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; CIM, concentração inibitória mínima; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone; PAβN, phenyl-arginine-beta-naphthylamide; RES, reserpina; (+) positivo / presente; (-) negativo / ausente; A, B, C e D, centros hospitalares fornecedores de amostras.

4.8. Avaliação da relação genética entre os isolados

Os perfis de similaridade genética foram analisados com auxílio do programa BioNumerics e, empregando-se o coeficiente de DICE (1945), com uma tolerância de 3% e uma otimização de 1%. Foram obtidos 24 *clusters* (denominados I a XXIII) de acordo com o critério de análise baseado na similaridade \geq que 90% (DOS ANJOS BORGES, *et al.*, 2003).

Na Figura 11 é apresentado o dendrograma relacionando a diversidade genética dos isolados provenientes de diversos centros médicos, período de isolamento, fenótipos de resistência, presença/ausência de porinas, e presença / ausência dos genes codificadores de MBL e metilases 16S RNAr.

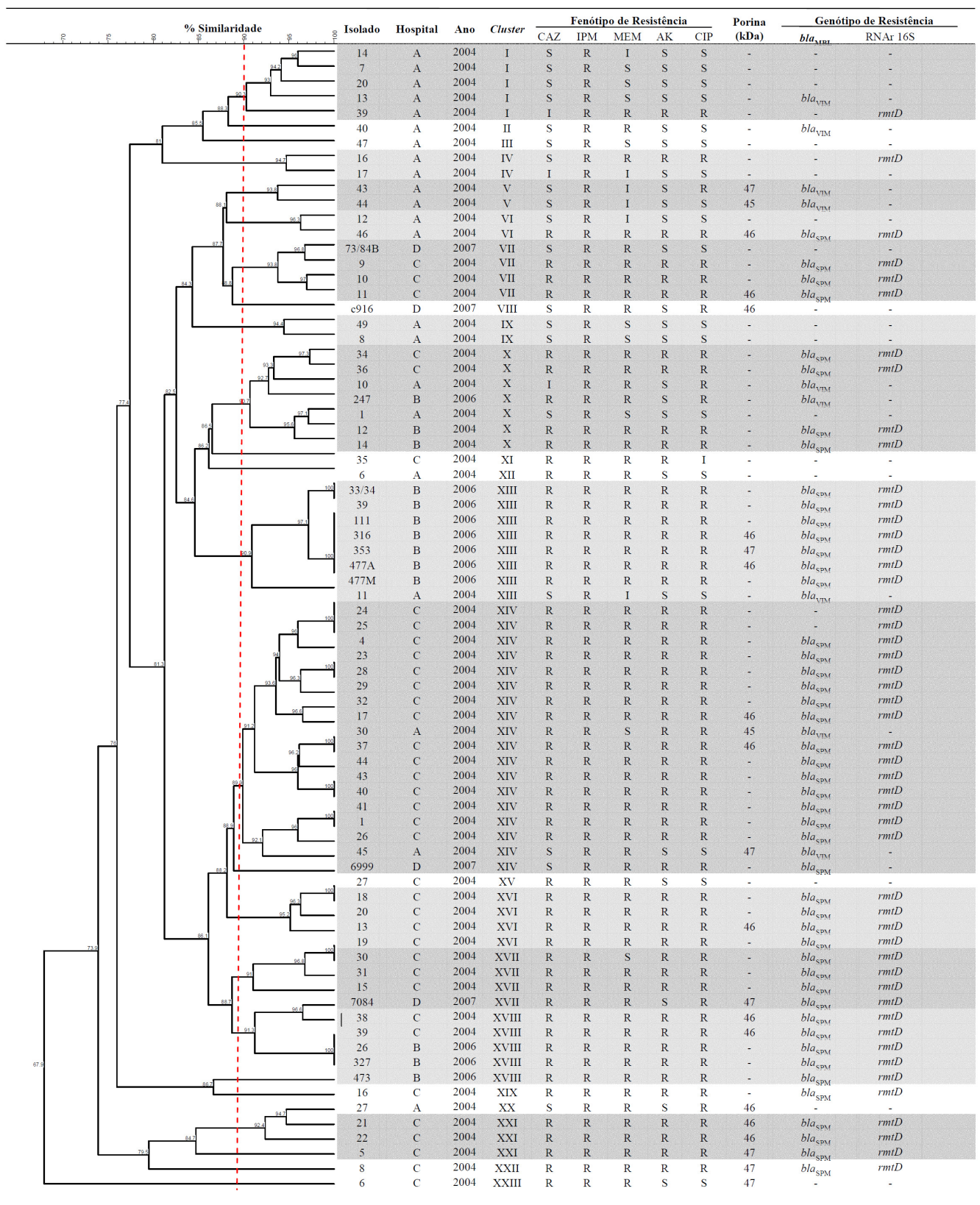


Figura 11: Perfis de similaridade genética, gerados por ERIC-PCR, com o auxílio do programa BioNumerics e coeficiente de Dice, de 76 isolados imipenem resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, relacionando os centros médicos, anos de isolamento, fenótipos de resistência, presença/ausência de porinas e PCR investigativo para presença dos genes codificadores de MBL e metilases 16S RNAr.

5 - DISCUSSÃO

Atualmente, como relatado por inúmeros estudos multicêntricos internacionais (GOOSSENS, 2003), o perfil de sensibilidade antibacteriana de *P. aeruginosa* têm mudado desfavoravelmente, comprometendo a terapêutica da infecção. Assim, elucidar os mecanismos de resistência é de vital importância para realizar um controle epidemiológico efetivo da disseminação deste tipo de isolado, contribuindo na instauração de políticas de uso racional de antibacterianos. Por outro lado, para a indústria farmacêutica, esta informação se traduz na pesquisa de novos agentes antibacterianos que consigam ultrapassar estas barreiras de resistência, assim como para procurar por novos alvos antibacterianos.

Especificamente, a resistência ao imipenem é uma urgência global, uma vez que este antibiótico é considerado o tratamento de escolha para isolados multirresistentes.

Embora estudos mundiais tenham determinado os principais mecanismos de resistência ao imipenem exibidos por *P. aeruginosa*, no Brasil os relatos sobre os mesmos de resistência têm sido restritos à produção de MBL. Mesmo com a ampla disseminação dessas enzimas (principalmente SPM-1) nos diferentes Estados brasileiros, e sua associação com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, não há consenso em relação à instauração de um método que permita identificar a presença destas enzimas na rotina laboratorial.

Para piorar este quadro, atualmente tem sido descrita a emergência de isolados produtores de metilases 16S RNAr, um novo mecanismo responsável pela resistência aos aminoglicosídeos (DOI & ARAKAWA, 2007).

Sem dúvida, a co-produção de ambas as enzimas deve ser considerada uma urgência clínica e epidemiológica, considerando que esquemas terapêuticos contra isolados de *P. aeruginosa* baseiam-se no uso de beta-lactâmicos de amplo espectro e/ou

aminoglicosídeos como amicacina. Mesmo em casos de infecção por isolados resistentes, a terapia se baseia na atividade sinérgica de ambos os tipos de antibióticos.

Em uma primeira etapa, caracterizamos a resistência ao imipenem em um contexto quantitativo, através da determinação da CIM, na presença e ausência de inibidores específicos de MBL. A seguir, a triagem para MBL foi investigada com mais detalhes, usando o ensaio de sinergismo, similar ao padronizado para detecção de ESBL, com a finalidade de avaliar um método econômico e de fácil execução e interpretação para a rotina laboratorial. A produção de metilases 16S RNAr, associada à resistência aos aminoglicosídeos foi também investigada, uma vez que isolados imipenem resistentes apresentam co-resistência aos aminoglicosídeos e são considerados um problema de impacto mundial.

Finalmente, a contribuição da impermeabilidade associada com a perda da porina OprD ou superexpressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN foi também avaliada.

Para este último mecanismo, foi realizada uma triagem empregando-se o método de disco combinado (avaliado pelo aumento do halo ≥ 3 mm) e a CIM de substratos antibióticos utilizando inibidores específicos (CCCP, reserpina e PA β N. Como padrão-ouro para a detecção de superexpressão de bombas de efluxo, utilizamos a PCR em tempo real.

5.1. Antibiograma qualitativo e quantitativo (CIM)

Inicialmente, o antibiograma dos isolados revelou fenótipos multirresistentes, os quais exibiram um elevado percentual de resistência a antibióticos usados rotineiramente nos esquemas terapêuticos para casos de infecção por *P. aeruginosa* (IPM, CAZ, MEM, AK, CIP). Os isolados recuperados dos centros hospitalares apresentaram um percentual de resistência elevado (Tabela 8). No caso do imipenem,

esses resultados foram confirmados quantitativamente pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), através da técnica de diluição em ágar, onde os isolados de todos os centros estudados apresentaram uma $CIM_{50} \geq 32 \mu\text{g/mL}$, em contraste com os isolados do Hospital A onde a CIM_{50} foi de $16 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 9). Para todos os isolados os valores da CIM estiveram acima do limiar que estabelece a resistência ao imipenem (CLSI, 2010).

5.2. Confirmação fenotípica da produção de MBL

Os altos níveis de resistência ao imipenem, exibidos pelos isolados ($CIM_{90} \geq 512 \mu\text{g/mL}$), foram sugestivos da expressão de um mecanismo enzimático (WALSH *et al.*, 2005). Inversamente, níveis baixos de resistência, próximos ao limiar, foram sugestivos da perda da permeabilidade da membrana (LIVERMORE, 2001).

Na triagem investigativa para avaliar a presença de MBL, utilizando-se a metodologia da determinação da CIM para imipenem na presença de EDTA, houve um decréscimo \geq a 4 diluições na CIM do imipenem ($CIM_{90} > 512 \mu\text{g/mL}$ para $CIM_{90} = 16 \mu\text{g/mL}$), indicando a produção de uma enzima MBL. Mais uma vez, os isolados do local A foram exceção, não exibindo alteração significativa na CIM do imipenem ($CIM_{90} = 64 \mu\text{g/mL}$) na presença de EDTA ($CIM_{90} = 16 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 10). Este fato sugere a impermeabilidade como fenômeno de co-resistência (LIVERMORE, 2001), porém é importante mencionar que alguns estudos têm mostrado que a expressão de enzimas MBL, do tipo VIM, resultam em um baixo nível de resistência ao imipenem, o que na prática clínica traz problemas na identificação laboratorial por métodos fenotípicos (WALSH *et al.*, 2005).

Partindo desses resultados, avaliamos o método de dupla difusão do disco para realizar a triagem de isolados produtores de MBL.

ARAKAWA *et al.*, 2000, estabeleceram um método conveniente de dupla difusão do disco para detecção de isolados produtores de MBL, apontando o MPA como agente quelante de maior sensibilidade, entre os inibidores de MBL utilizados (MAA, EDTA, CuCl₂ e FeCl₂), tendo CAZ como substrato. Posteriormente LEE *et al.*, 2003, através do teste de sinergismo com disco de EDTA, relataram que o EDTA em presença do substrato IPM apresentou maior sensibilidade para detecção de isolados produtores de MBL, dado que foi corroborado por OH *et al.*, 2003. MARCHIARO *et al.*, 2005 também relataram que o EDTA em baixas concentrações mostrou-se eficiente para indicar a presença de MBL, aumentando sua eficácia na presença dos substratos CAZ e MEM. Nestes estudos, é importante mencionar que os isolados utilizados, eram exclusivamente produtores de MBL do tipo VIM e IMP.

No presente trabalho, o teste de dupla difusão do disco, utilizando MAA como inibidor e CAZ como substrato, apresentou resultados positivos para uma maior quantidade de isolados 61% (46/76) recuperados de todos os centros estudados (Tabela 11).

A fim de confirmar a metodologia fenotípica, os isolados foram submetidos à PCR. Este estudo revelou uma positividade de 74% (56/76) para a presença de genes codificadores de MBL, predominando, na totalidade dos isolados estudados, a presença de *bla*_{SPM-1} (62% - 47/76), frente a 12% (9/76) de positividade para *bla*_{VIM-like}, não sendo detectado nenhum isolado positivo para *bla*_{IMP-like} (Tabela 12).

5.3. Avaliação da sensibilidade e especificidade do método de dupla difusão do disco para detecção de MBL

Considerando os estudos anteriormente descritos, e com a finalidade de indicar o melhor substrato e agente inibidor para identificação de isolados brasileiros de *P. aeruginosa* produtores de MBL, os inibidores EDTA, MPA e MAA foram avaliados na

presença dos substratos IPM e CAZ, quanto à especificidade e sensibilidade, a fim de determinar a melhor combinação inibidor-substrato a ser utilizada na triagem para a produção de enzimas MBL.

Nos cálculos da sensibilidade e especificidade (MAUSNER & BAHN, 1974), os isolados positivos para genes MBL confirmados pelo PCR foram considerados como o padrão-ouro de positividade para produção de MBL.

No ensaio de dupla difusão do disco, a combinação MAA-CAZ mostrou maior sensibilidade para detecção de isolados produtores de MBL associada à enzima SPM-1 (89%), enquanto que a especificidade foi maior quando foram usadas as combinações MAA-IPM e MPA-IPM (97%). Entretanto, a sensibilidade destas combinações foram muito baixas (41% e 0% respectivamente) (Tabela 13). A especificidade da combinação MAA-CAZ foi de 86% quando a enzima detectada foi SPM-1. Assim para SPM-1 a melhor combinação resultou ser MAA-CAZ, deixando claro que o uso de mais de um substrato na presença de mais de um inibidor resulta no aumento de ambos os índices.

Este resultado se contrapõe com estudos anteriormente descritos, revelando como melhor inibidor o MPA (PICÃO *et al.*, 2008). É importante ressaltar que neste estudo um número reduzido de amostras foram avaliadas, e quase a totalidade dos isolados identificados como MBL positivos carregaram o gene *bla*_{SPM-1}. Esta informação é importante de ser considerada uma vez que SPM-1 é a principal MBL produzida por isolados brasileiros de *P. aeruginosa*, enzima até o momento restrita ao Brasil. Estudos recentes, com enfoque estrutural e bioquímico da enzima, têm mostrado que SPM-1 tem um comportamento diferente de outras MBL, mostrando propriedades hidrolíticas totalmente diferentes (MURPHY *et al.*, 2006, WALSH *et al.*, 2005). Assim, por um lado, o alto nível de resistência ao imipenem observado nos isolados produtores de SPM-1 (CIM \geq 256 μ g/mL) (Anexo 1), e por outro lado, a maior sensibilidade ao

inibidor MAA, confirmam as propriedades únicas desta enzima quando comparada a VIM e IMP.

Este estudo é o primeiro relato que caracteriza a melhor combinação substrato-inibidor para a identificação fenotípica de MBL tipo SPM-1, pelo método de dupla difusão do disco. Revisando a literatura, só encontramos um único relato feito no Brasil, avaliando um método de triagem para a detecção de MBL (ANDRADE *et al.*, 2007), porém o estudo só incluiu um único isolado produtor de SPM-1, e o método utilizado foi o do disco combinado, onde 5 inibidores, incluindo os 3 relatados neste estudo, foram adicionados diretamente sobre o disco contendo o antibiótico (CAZ e IPM) observando-se mudanças em comparação ao halo de inibição para os discos antibióticos sem adição do inibidor (ANDRADE *et al.*, 2007).

Em relação aos isolados produtores de VIM, os resultados indicam que a melhor combinação inibidor-substrato é a EDTA/IPM (22%), enquanto a combinação de maior especificidade foi MPA-IPM (99%). Como observado na Tabela 12 houve um predomínio de isolados produtores de MBL tipo VIM dentre os isolados do local A (36% - 8/22). Observando a CIM₉₀ deste grupo de isolados (Anexo 1) na presença e ausência de EDTA é possível observar que embora tenha havido uma queda na CIM₉₀ de 64 para 16 µg/mL, a enzima MBL do tipo VIM parece conferir um baixo nível de resistência detectável. O fato dos isolados exibirem uma CIM₉₀ de 16 µg/mL na presença do EDTA permite deduzir que, mesmo na presença de *bla*_{VIM} um outro mecanismo, possivelmente associado à perda da porina OprD, possa ser o responsável pela resistência ao imipenem (WALSH *et al.*, 2005; LIVERMORE, 2001).

O principal problema associado a esta CIM₉₀ baixa é o resultado falso negativo obtido pelo método da dupla difusão do disco. De fato, isolados que foram VIM positivos apresentaram um halo de inibição para ceftazidima que visualmente poderia

ser considerado como sensível ou intermediário, dificultando a visualização de zonas de sinergismo entre os inibidores e o disco de CAZ.

Como relatado por outros autores, a expressão da enzima VIM pode ser tão baixa que mesmo no antibiograma os isolados mostram-se sensíveis, ou com sensibilidade intermediária ao imipenem (WALSH *et al.*, 2005; GIAKKOUPHI *et al.*, 2005; FRANKLIN *et al.*, 2006).

Em resumo, podemos sugerir que a melhor combinação inibidor-substrato envolve MAA e CAZ, pois apresentam boa sensibilidade e especificidade, sendo convenientes para triagem de rotina, uma vez que a análise por reação de polimerase em cadeia (PCR) e mesmo a metodologia do E-Test (AB Biodisk, Solna, Suécia) tem seu uso limitado em decorrência de seu custo elevado para um laboratório de rotina microbiológica do Brasil.

5.4. Avaliação da presença de genes codificadores de mMetilases 16S RNAr

Uma vez que a metilação do RNA ribossomal (RNAr) 16S tem sido relatada como um novo mecanismo de resistência contra aminoglicosídeos entre os patógenos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* isolada no Brasil (DOI & ARAKAWA, 2007; DOI *et al.*, 2007a; DOI *et al.*, 2007b; LINCOPAN *et al.*, 2010), resolvemos investigar a presença dos genes codificadores dessas enzimas. Isso porque a presença dessas enzimas confere alto nível de resistência a todos os aminoglicosídeos comumente utilizados no tratamento destas infecções.

Com relação a esquemas terapêuticos usando aminoglicosídeos, a monoterapia com esses antibióticos, como amicacina e gentamicina, raramente é utilizada. Alguns protocolos recomendam no tratamento de infecções graves por *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente no caso de bacteremia, a utilização combinada de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos para minimizar os riscos de falha no tratamento devido à

resistência (SAFDAR *et al.*, 2004). Porém, no Brasil, para ambos antibióticos os índices de resistência têm aumentado drasticamente nos últimos anos (Tabela 1), existindo relatos de isolados capazes de co-produzirem enzimas beta-lactamases de amplo espectro ou metalo-beta-lactamases (MBL), juntamente com a produção de metilases, contribuindo para o aparecimento de isolados multirresistentes (DOI & ARAKAWA, 2007; DOI *et al.*, 2007a; DOI *et al.*, 2007b). A emergência de isolados com essas características ocasiona um grande impacto clínico tendo em vista a escassez de terapias efetivas no tratamento de infecções por este patógeno.

Do total dos isolados analisados (n= 76), 66% carregavam o gene *rmtD* e destes, 61% apresentavam tanto o gene *rmtD* como o gene *bla*_{SPM-1} (Tabela 14). Esses resultados confirmam a disseminação de isolados co-produtores de RmtD e MBL (SPM-1) nos centros estudados, o que pode explicar os altos índices de resistência a aminoglicosídeos e carbapenêmicos relatados na literatura (DOI & ARAKAWA, 2007; DOI *et al.*, 2007a; DOI *et al.*, 2007b) e observados também em nosso trabalho, uma vez que 98% dos isolados co-produtores das enzimas RmtD e MBL SPM-1 apresentaram além de resistência ao imipenem, resistência à amicacina (Tabela 15).

É interessante destacar o fato de que muitos isolados imipenem resistentes apresentam uma resistência cruzada para outras classes de antibióticos, como por exemplo, quinolonas. Por outro lado, tem sido documentado o desenvolvimento de resistência ao imipenem durante a infecção e após a instauração de terapias antibacterianas (PEREIRA *et al.*, 2008). Assim, é possível lançar hipóteses sobre mecanismos mais abrangentes, principalmente relacionados à produção enzimática e impermeabilidade da membrana, que podem conferir a múltipla resistência. De fato, estudos recentes têm descrito a co-produção de metilases em isolados produtores de MBL do tipo SPM-1 (DOI *et al.*, 2007a), o que tem contribuído para a extensão da

resistência aos aminoglicosídeos, tornando inviável o uso de um esquema terapêutico sinérgico baseado na associação de um beta-lactâmico com um aminoglicosídeo, prática habitual em hospitais (DOI & ARAKAWA, 2007).

Embora tenha sido sugerida a existência de uma elevada incidência de isolados co-produtores de SPM-1 e metilases do tipo RmtD (DOI *et al.*, 2007a), no Brasil isto tem sido questionado devido à falta de estudos que englobem uma maior diversidade de hospitais e centros médicos (CASTANHEIRA *et al.*, 2008). Assim, nosso trabalho também foi direcionado à investigação da co-produção SPM-1/RmtD e sua variabilidade clonal. Como observado na Figura 11, a co-produção de SPM-1/RmtD é um fenótipo predominante em isolados imipenem resistentes; sem uma origem clonal comum, mesmo de um centro hospitalar comum, e embora pouco freqüente, existem isolados que carregam só um determinante genético (i.e., ou *rmtD* ou *bla_{SPM-1}*).

5.5. Porina OprD

5.5.1. Investigação fenotípica da produção de porina OprD

De um total de 76 isolados estudados, 13 (17%) destes apresentaram a banda correspondente à proteína OprD, de massa molecular correspondente a ~ 46 kDa, 2 isolados (3%) apresentaram a porina de ~ 45 kDa e 7 isolados (9%) ~ 47 kDa (Tabelas 16 e 17). Inicialmente, partiríamos da análise apenas das proteínas com ~ 46 kDa, mas dados da literatura indicaram que existem homólogos da proteína OprD, o que pode gerar produtos de expressão de tamanhos diferenciados (TAMBER *et al.*, 2006; TAMBER & HANCOCK, 2006), assim como existem citações de porina OprD de até 54 kDa por alguns autores (LIVERMORE, 1992). Partindo dessa premissa, adotamos a faixa de 45 a 47 kDa para considerar os isolados com presença de porinas. Essas proteínas foram observadas tanto em isolados MBL positivos quanto em MBL negativos (Tabelas 16 e 17).

Frente a esses resultados, é interessante notar na Tabela 16, que a maioria dos isolados MBL positivos não possuía porina (66%). Tais dados levam a crer que estes isolados apresentam uma sinergia entre os mecanismos de resistência relacionados à impermeabilidade e expressão de metaloenzimas.

No que diz respeito aos isolados MBL negativos (Tabela 17), a taxa de ausência de porinas foi marcante (85%), confirmando o mecanismo de impermeabilidade relacionado à resistência ao imipenem.

Por outro lado, a detecção da presença de porinas em 15% dos isolados MBL negativos sugere um terceiro mecanismo de resistência, possivelmente relacionado à superexpressão das bombas de efluxo, como já descrito na literatura (KÖHLER *et al.*, 1999a).

A deleção de porinas OprD em *P. aeruginosa*, tem sido associada com a resistência exclusiva para imipenem (FUNG-TOMC *et al.*, 1995; HUANG & HANCOCK, 1996; LIVERMORE, 2001; NIKAIDO *et al.*, 1991; YONEYAMA *et al.*, 1992; YONEYAMA *et al.*, 1995; YONEYAMA & NAKAE, 1993; YOSHIHARA *et al.*, 1996), porém não existe um consenso sobre a caracterização desta proteína com um determinado peso molecular. Assim, podemos encontrar relatos da ausência de proteínas de 42 até 54 kDa (MÜLLER-PREMRU & LEJKO-ZUPANC, 2002; YOSHIHARA *et al.*, 1996; UNCHALEE TATTAWASART *et al.*, 2000; NIKAIDO *et al.*, 1991; FUNG-TOMC *et al.*, 1995) com fenótipos imipenem resistentes.

A ausência de proteínas compatíveis com os pesos moleculares acima citados tem sido atribuída à presença de seqüências de inserção (WOLTER *et al.*, 2004).

5.5.2. Investigação da presença do gene codificador de porina OprD

A presença do gene *oprD* região 554/2139, conforme seqüência obtida no GenBank (*accession no.* X63152.1IPAOPRD *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene) foi

confirmada em 87% (66/76) dos isolados imipenem resistentes por meio da amplificação pela técnica de PCR (Tabela 19).

A presença de seqüências de inserção foi sugerida em dez isolados negativos para essa primeira análise, uma vez que a literatura descreve a resistência ao imipenem associada a alterações na porina OprD envolvendo três diferentes fenômenos (PIRNAY *et al.*, 2002; WOLTER *et al.*, 2004), tais como:

1. Alterações na transcrição do gene ou em genes reguladores da transcrição
2. Mutações no gene estrutural produzindo *stop codon*
3. Seqüências de inserção alojadas dentro do gene estrutural

Diante dos resultados negativos para a amplificação do gene *oprD* região 554/2139, suspeitamos que o evento mais provável seria a presença de seqüências de inserção dentro do gene estrutural, o que resultaria em fragmentos de tamanho maior (EVANS & SEGAL, 2007). Para comprovar essa teoria, foram utilizados *primers* para detectar fragmentos localizados dentro da região 554/2139 (Figura 3). Nove isolados amplificaram um fragmento correspondente a 262 bp referente à região 1877/2139 (Figura 8) e o isolado que não amplificou essa região indicou a presença de fragmentos da região 1877/1948 correspondente a 71 bp (Figura 9). Esses dados indicaram a presença de seqüências de inserção na região anterior a 1877 bp e também na região entre 1877 e 1948 bp, confirmando dados da literatura mencionando seqüências de inserção em diferentes localizações do gene *oprD* (WOLTER *et al.*, 2004).

Uma vez que resultados negativos para a amplificação do gene foram observados em alguns isolados imipenem resistentes, pode-se supor que o evento mais provável foi a inserção de seqüências dentro do gene estrutural, o que resultaria na produção de fragmentos de tamanho maior (i. e., 2400 bp) (EVANS & SEGAL, 2007). Assim, a condição padronizada para PCR a fim de detectar fragmentos de

aproximadamente 1500 bp não seria apropriada para amplificar fragmentos maiores. Menos provável seria a existência de mutação especificamente do sítio de pareamento do *primer* e, como relatado, 10 isolados (todos SPM-1 negativos e três produtores de VIM) não amplificaram com *primers* descritos na literatura (localizados na região cromossômica entre 554/2139), para caracterizar genes do tipo *oprD* (Tabela 18).

Como observado na Figura 3, os *primers* anteriormente utilizados amplificaram ou uma região *upstream* até próximo ao *stop codon* do gene *oprD* (região 1877/2139), ou uma região *downstream* até anterior do *stop codon* (região 1877/1948). Assim, para elucidar a presença e localização de uma suposta seqüência de inserção (SI), foram desenhados dois novos pares de *primers*, um para amplificar o gene *oprD* íntegro (736/2067), e outro para amplificar uma região inicial (*start codon* até uma região intermediária do gene *oprD* - 736/1394). Como observado na Tabela 18, todos os isolados (incluindo aqueles dez anteriormente não caracterizados pela PCR) tiveram um fragmento de 1332 bp amplificado, compatível com o tamanho do gene íntegro. Porém, utilizando o par de *primers* correspondente a 659 bp, sete isolados, incluindo dois dos dez previamente PCR negativos, não apresentaram a amplificação do produto esperado (Tabela 18). Estes resultados são compatíveis com dois fenômenos genéticos: 1) os dez isolados imipenem resistentes *bla*_{SPM-1} negativos (nove dos quais não apresentaram proteína OprD no SDS-PAGE), apresentam uma alteração na região *upstream* do gene, muito provavelmente na região promotora; ii) em nove isolados imipenem resistentes, incluindo os 3/10 isolados com suspeita de SI, a ausência de um produto de amplificação com o uso do *primer* 736/1394 pode ser explicada pela presença de polimorfismos ou mutações dentro do gene *oprD*, uma vez que estes isolados amplificaram um fragmento de tamanho compatível com o gene íntegro quando usou-se o *primer* 736/2067. Embora estes fenômenos sejam dignos de estudos mais profundos, a

priori, a presença de um possível polimorfismo poderia explicar em parte esta falta de consenso na literatura no que se refere ao tamanho exato de porinas OprD, as quais como citado, aparecem no SDS-PAGE com tamanhos variáveis que vão desde os 42 kDa até os 54 kDa, sendo possível a expressão de um outro tipo de porina OprD ou mesmo a deleção da própria.

Em relação aos parâmetros presuntivos para a impermeabilidade associada à ausência de porina OprD, foi possível observar que a concentração inibitória mínima do imipenem para estes isolados manteve-se entre 8 e 32 µg/mL com ausência de queda da CIM na presença de EDTA (Tabela 18). Esses dados coincidiram com relatos indicativos da resistência associada à impermeabilidade devido à ausência ou baixa expressão de porina OprD CLSI (2010) (NORDMANN & GUIBERT, 1998; LIVERMORE, 2001). Ainda na Tabela 18, observamos a presença de três isolados responsáveis pela produção de metaloenzimas tipo VIM e seis isolados responsáveis pela produção de metaloenzimas tipo SPM-1. Os primeiros não apresentaram um decréscimo \geq a 3 diluições na CIM do imipenem. Isso pode ser explicado pelo fato de que a expressão de metaloenzimas tipo VIM, como relatado em outros estudos, resultam em um nível baixo de resistência ao imipenem (WALSH *et al.*, 2005), dificultando a identificação da MBL através de métodos fenotípicos. Por outro lado, a presença de isolados SPM-1 positivos não apresentando a queda característica na presença de EDTA pode ser explicada pela co-existência de dois mecanismos responsáveis pela resistência ao imipenem: a impermeabilidade da membrana provocada pela ausência de porina e a expressão de enzimas, como podemos interpretar com auxílio da Tabela 20.

5.6. Investigação fenotípica das bombas de efluxo

Na maioria dos isolados, incluindo os não produtores de MBL, a resistência concomitante a imipenem e meropenem foi uma característica em comum (Anexo 2).

De fato, a ocorrência de dois mecanismos atuando conjuntamente têm sido documentada previamente (KÖHLER *et al.*, 1999a; MASEDA *et al.*, 2000; LIVERMORE, 2001), destacando-se a perda de porina OprD associada à superexpressão de MexAB-OprM e/ou a produção de metaloenzimas.

Nos isolados coletados, a presença da enzima SPM-1 foi uma característica predominante, o que foi um fator limitante para avaliar a contribuição das bombas de efluxo em um número maior de isolados.

Considerando a inexistência de dados nacionais sobre a contribuição dos sistemas de bomba de efluxo na resistência aos antibacterianos em *P. aeruginosa*, inicialmente realizamos a pesquisa dos genes associados a estes sistemas para verificar a presença intrínseca em isolados recuperados no Brasil. Nossa pesquisa foi direcionada à identificação de genes codificando as proteínas periplásmicas das bombas de efluxo (MexA e MexE). A estratégia de utilizar estes alvos foi baseada na natureza tripartite do sistema de efluxo, no sentido de que para o funcionamento do sistema, a presença da proteína periplásmica é fundamental, uma vez que fusiona as proteínas de membrana externa com as de membrana interna. Assim, embora seja descrito que alguns genes possam ser constitutivos, deve ser subentendido que nem sempre seja possível encontrar os três genes codificadores das proteínas do sistema em uma mesma proporção. De fato, recentemente tem sido descrita a promiscuidade da proteína MexB, indicando sua falta de exclusividade para o sistema MexAB-OprM (WELCH *et al.*, 2010, *in press*).

Os resultados da amplificação por PCR são sumarizados na Tabela 21. O gene *mexA* teve uma alta incidência (92% - 70/76), denotando a sua natureza intrínseca em isolados nacionais, confirmando relatos de outros países (LI *et al.*, 1995; NIKAIDO, 1994). Em relação ao gene codificador da proteína de membrana interna MexE, 82% (62/76) dos isolados apresentaram amplificação para o mesmo. Assim, podemos inferir

que muito provavelmente 92% dos isolados sejam capazes de expressar o sistema MexAB-OprM e 82% podem expressar o sistema MexEF-OprN.

Posteriormente, considerando o alto número de isolados produtores de SPM-1, a análise fenotípica dos testes de triagem para bomba de efluxo foi baseada no estudo de 20/76 isolados imipenem resistentes, não produtores de MBL. A análise dos sistemas de efluxo foi dividida em 2 partes: 1) avaliação da metodologia do disco combinado e determinação da CIM na presença de inibidores específicos e; 2) análise da expressão dos genes *mexA* e *mexE* por PCR em tempo real, sendo que a expressão foi avaliada nos 76 isolados imipenem resistentes.

Triagem fenotípica para detecção de bombas de efluxo

Metodologia do disco combinado e CIM na presença de inibidores de efluxo

Baseado na inespecificidade das bombas, os substratos utilizados para a detecção de bombas de efluxo foram imipenem, meropenem, ciprofloxacina e levofloxacina e os inibidores utilizados foram CCCP, reserpina e PA β N. Os inibidores e os substratos foram escolhidos de acordo com relatos anteriores de métodos fenotípicos para identificação de mecanismos de efluxo a partir da CIM, descritos por LOMOVSKAYA *et al.*, 2001 e DENNY *et al.*, 2005. A ação da reserpina, um alcalóide obtido de plantas, tem sido associada com a interação direta com alguns aminoácidos (PIDDOCK, 2006) o que resulta na inibição de proteínas de bombas de efluxo da família RND (RICCI & PIDDOCK, 2003). Os inibidores CCCP (LOMOVSKAYA *et al.*, 2001) e PA β N (também denominado MC-207,110, o primeiro inibidor específico para bombas de efluxo do tipo RND descrito em *P. aeruginosa*) (UEDA *et al.*, 2005) agem inibindo a força motriz de prótons, eliminando a fonte de energia necessária para o funcionamento da bomba de efluxo.

5.7. Detecção de superexpressão de bombas de efluxo por PCR em tempo real

Para realizar a detecção e quantificação relativa da expressão de RNAm dos genes específicos para bombas efluxo (*mexA* e *mexE*) de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizamos a técnica de PCR em tempo real com SYBR Green como fluoróforo.

De acordo com os resultados obtidos, ambos genes estudados (*mexA* e *mexE*), apresentaram um percentual de 18% (14/76) (Tabela 24) na análise por PCR em tempo real, indicando assim, que não existe diferença entre o predomínio de um sistema ou outro (MexAB-OprM ou MexEF-OprN).

Detecção de superexpressão em MBL positivos

Quando avaliamos os isolados produtores de MBL do tipo SPM-1 (62% - 47/76), a análise dos sistemas de efluxo por PCR em tempo real indicou a existência de superexpressão em 19% (9/47) dos isolados, sendo 33% (3/9) responsáveis pela superexpressão concomitante dos dois sistemas estudados (MexAB-OprM e MexEF-OprN) e 67% (6/9) responsáveis pela superexpressão de apenas um ou outro sistema (Anexos 1, 3 e 4). Esse baixo número de isolados (19%) sugere que o sistema de efluxo não interfere no fenótipo da resistência ao imipenem para produtores de MBL do tipo SPM-1. No caso de MBL do tipo VIM, apenas 1 isolado apresentou superexpressão de efluxo mediada pelos dois sistemas (MexAB-OprM e MexEF-OprN), indicando que o mecanismo de efluxo também não ocasionou influência considerável na resistência (Anexo 1).

Resumindo, quando existe produção de MBL, sejam dos tipos SPM-1 ou VIM, os mecanismos enzimáticos (responsáveis pela hidrólise dos antibacterianos) são os principais envolvidos na resistência ao imipenem, não havendo relevância da atuação de

mecanismos de efluxo. Isso muito provavelmente ocorre devido às bombas não possuírem especificidade de substratos (AESCHLIMANN, 2003) e, quando existe superexpressão nos isolados MBL positivos, é possível que a atuação das bombas seja direcionada a outros antibióticos.

Deteção de superexpressão em MBL negativos e correlação com os métodos de triagem

No que diz respeito aos isolados MBL negativos, em 35% (7/20) dos isolados foi documentada a superexpressão conjunta de ambos sistemas de efluxo (MexAB-OprM e MexEF-OprN).

A superexpressão dos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN como único mecanismo de resistência ao meropenem e ao imipenem foi confirmada em 10% (2/20) dos isolados MBL negativos.

Fenotipicamente, não foi possível identificar isolados que efetivamente expressavam sistemas de efluxo. No caso do disco combinado 40% (8/20) dos isolados apresentaram resultados falso-positivos em diferentes combinações inibidor-substrato (Tabela 25) e 57% (4/7) dos isolados responsáveis pela superexpressão de efluxo detectada por PCR em tempo real, apresentaram resultados falso-negativos. Em relação à CIM para triagem de efluxo, 35% (7/20) dos isolados, apresentaram falso-positivos e 43% (3/7) apresentaram falso-negativos (Tabela 25). Além disso, um isolado utilizando o efluxo provavelmente como único mecanismo de resistência ao imipenem (c916 - local D), apresentou um resultado falso-positivo para o método do disco combinado (Tabela 25), confirmando a falta de sensibilidade dos métodos de triagem de bombas de efluxo.

Na análise de superexpressão dos genes *mexA* e *mexE*, os resultados não mostraram uma clara correlação com os resultados obtidos a partir do teste do disco

combinado e aumento da CIM de substratos antibióticos na presença de inibidores de bomba de efluxo (Tabela 25), fato que pode ser explicado pela inespecificidade dos substratos utilizados pelas bombas.

Em alguns casos, a superexpressão de ambas as bombas não correspondeu ao perfil de sensibilidade demonstrado pelo antibiótico meropenem (Tabela 25). Neste caso, existem relatos sobre a capacidade que MexEF-OprN possui para diminuir a expressão das bombas MexAB-OprM, pois parecem exercer uma atividade corre regulatória sobre elas (MASEDA *et al.*, 2000; POOLE *et al.*, 1996b; POOLE *et al.*, 2000; SOBEL *et al.*, 2003). Isso poderia explicar o fato de que, embora a maioria de nossos isolados estivessem superexpressando as duas bombas, o nível de expressão para MexEF-OprN geralmente era mais elevado do que MexAB-OprM (Tabela 25).

Em resumo, nossos dados indicam que os padrões de resistência aos carbapenêmicos não podem ser totalmente explicados pelos mecanismos de impermeabilidade, confirmando o estudo de EL AMIN *et al.*, 2005.

Com relação às bombas de efluxo, os isolados nacionais podem ter um comportamento diferente do demonstrado em relatos internacionais, assim a contribuição dos sistemas para *P. aeruginosa* no Brasil pode ser insignificante para carbapenêmicos (KRIENGKAUYKIAT, *et al.*, 2005; TOHIDPUR *et al.*, 2009).

5.8. Avaliação da relação genética entre os isolados

Os diversos mecanismos de resistência apresentados pelos isolados e as suas possíveis interações nos levaram a questionar se existiria diversidade clonal de acordo com o tipo de resistência verificada. Para tanto, foi realizada a tipagem por ERIC-PCR, uma técnica de fácil execução, rápida, cuja reprodutibilidade e poder discriminatório tem sido comparável com a técnica de PFGE na tipagem para *P. aeruginosa*

(PELLEGRINO *et al.*, 2002), incluindo produtores de SPM-1 (PELLEGRINO *et al.*, 2006; PELLEGRINO *et al.*, 2008). Posteriormente foi construído o dendrograma com análise de *clusters* pelo coeficiente de DICE (1945).

Os isolados imipenem resistentes caracterizaram-se por apresentar resistência adicional para ciprofloxacina e amicacina. Com relação à resistência para ceftazidima e carbapenêmicos, o principal mecanismo identificado foi a produção de MBL do tipo SMP-1. Neste sentido, a presença de isolados carregando o gene *bla*_{SPM-1} foi confirmada nos 4 centros estudados. Surpreendentemente, diferentes *clusters bla*_{SPM-1} foram encontrados nos centros estudados, sendo que em alguns centros houve a presença de mais de um *cluster* (i.e., hospital C = 10 *clusters*). O predomínio de isolados produtores de SPM-1 tem sido previamente relatado (MARTINS *et al.*, 2007). Outros autores têm publicado que a presença de SPM-1 possui uma origem clonal (CIPRIANO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2006). O trabalho realizado por CIPRIANO *et al.*, 2007, envolveu diferentes hospitais de São Luís, Maranhão no período entre 2000 e 2003. Um segundo trabalho, realizado no Rio de Janeiro com amostras obtidas de um mesmo centro médico, coletadas entre 1999 e 2001 também relata a presença de isolados clonalmente relacionados caracterizados por PFGE e técnicas de PCR que se mostraram equivalentes quanto à discriminação de *clusters* (PELLEGRINO *et al.*, 2008). Entre março e agosto de 2002, foi realizado o primeiro trabalho que indicou a presença de cepas endêmicas em diferentes hospitais brasileiros, envolvendo 5 estados (GALES *et al.*, 2003). Em contrapartida, o presente trabalho mostra uma variabilidade clonal em diferentes hospitais de São Paulo, o que poderia ser uma tendência nacional, se consideramos que as amostras aqui estudadas correspondem a isolados recuperados durante 2004 - 2007. No futuro, seria interessante realizar estudos com isolados mais recentes de diferentes Estados para confirmar esta variabilidade clonal que poderia refletir na transferência

horizontal do gene *bla*_{SPM-1}. Um outro ponto importante de mencionar, é que a primeira cepa produtora de SPM-1 isolada no Brasil (48-1997 A) por TOLEMAN *et al.*, 2002, foi de fato agrupada dentro do *cluster* encontrado em 2 hospitais (*cluster* XIV), o qual foi predominante no centro médico C.

Com relação à presença da rRNA metilase RmtD, o gene codificador foi encontrado em isolados co-produzindo SPM-1. Por outro lado, é interessante ressaltar que o gene *rmtD* foi encontrado em 4 isolados *bla*_{SPM-1} negativos recuperados de dois centros hospitalares (isolados 39A, 16A, 24C e 25C), sendo que os isolados do centro médico C foram clonalmente relacionados. Independente da presença ou ausência do gene *bla*_{SPM-1}, todos os isolados carregando o gene *rmtD* foram resistentes à amicacina, com exceção do isolado 7084 (D), que foi sensível à amicacina apesar de carregar este gene. Três isolados foram negativos para RNAr metilases, entretanto, todos foram resistentes à amicacina. CASTANHEIRA *et al.*, 2008, examinaram a presença do gene *rmtD* em isolados de *P. aeruginosa* epidemiologicamente não relacionadas, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Esta publicação relatou uma baixa incidência de *rmtD* (15,4%), enquanto que uma publicação prévia relatou uma incidência de 51,0% (DOI *et al.*, 2007b). Esta controvérsia tem sido explicada por alguns fatores como: i) ambos estudos foram realizados com isolados recuperados em locais e datas diferentes [de fato, no trabalho de CASTANHEIRA *et al.*, 2008, os 26 isolados produtores de SPM-1 incluídos foram coletados em 2002, provenientes de 10 cidades brasileiras (9 estados), enquanto o estudo de DOI *et al.*, 2007b, foi baseado em isolados recuperados, entre 2005-2006, de um único hospital terciário de São Paulo]; ii) as amostras de CASTANHEIRA *et al.*, 2008, foram previamente selecionadas para incluir isolados não clonalmente relacionados, enquanto que no estudo de DOI *et al.*, 2007b, os isolados estudados pertenceram a um único clone endêmico que foi co-

produtor de SPM-1 e RmtD. Um outro fato interessante é que DOI *et al.*, 2007b, encontraram isolados imipenem resistentes em grupos clonais diferentes que produziram RmtD mas não SPM-1.

Nossos resultados apresentam dados de isolados recuperados em diferentes hospitais de São Paulo, e representam uma transição dos trabalhos representados por estes dois grupos de pesquisa mencionados, devido ao encontro de alta incidência de RmtD nos isolados IPM/AK resistentes (98%) clonalmente diferentes (Figura 11). Esta alta incidência foi associada à co-produção de SPM-1, porém esta co-produção não teve uma origem clonal comum. Entretanto, 4/76 isolados carregaram somente o gene *rmtD* sugerindo uma transferência independente de cada gene. Por outro lado, em 2/76 isolados IPM/AK resistentes, só foi documentada a presença do gene *bla*_{SPM-1} sugerindo outros mecanismos de resistência. De fato, CARVALHO *et al.*, 2006, relataram que 13 isolados de *P. aeruginosa* SPM-1 positivos, recuperados do Rio de Janeiro, carregavam integrons de classe 1 (In163) contendo os genes *aacA4* e *aadA7* responsáveis pela resistência aos aminoglicosídeos. Finalmente, o fato de que um isolado, aqui relatado (7084 - centro D), carregando genes *rmtD* e *bla*_{SPM-1} seja resistente ao imipenem e sensível à amicacina, sugere que maiores estudos devem ser realizados para verificar a real importância do gene codificador da metilase RmtD. Seria necessário ainda caracterizar a presença dos genes *aac* (acetiltransferases), *ant* (nucleotidiltransferases) e *aph* (fosfotransferases), em isolados produtores de SPM-1 que apresentem resistência adicional aos aminoglicosídeos (DAVIES & WRIGHT, 1997).

Em resumo, a convergência de múltiplos mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* parece ser um evento favorável para a seleção de clones endêmicos multirresistentes disseminados na região Sudeste do Brasil.

6 - CONCLUSÕES

1. Dentre os isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem estudados (n=76, CIM₅₀ e CIM₉₀ = 32 µg/mL e > 512 µg/mL, respectivamente) 82% apresentaram um fenótipo de multirresistência.
2. O principal mecanismo de resistência ao imipenem foi a produção de MBL, detectada em 74% dos isolados, e destes, 62% carregavam o gene *bla*_{SPM-1} e 12% carregavam o gene *bla*_{VIM-like}.
3. O método de dupla difusão do disco identificou a produção de MBL em 61% dos isolados. A combinação CAZ/MAA apresentou maior sensibilidade na detecção de MBL associada à SPM-1 (89%), mostrando uma especificidade de 86%. Para melhorar a sensibilidade e especificidade do método de triagem é necessário utilizar CAZ e IMP como substratos e EDTA e MAA como inibidores.
4. A presença do gene *rmtD* foi confirmada em 66% das amostras resistentes aos aminoglicosídeos, sendo que a presença concomitante do gene *rmtD* e do gene *bla*_{SPM-1} foi confirmada em 61% dos isolados.
5. A deleção da porina OprD foi observada em 71% dos isolados. Dentre os isolados MBL positivos, 66% apresentaram ausência desta porina e, dentre as amostras MBL negativas, 85% não apresentaram OprD. Assim, para a resistência ao imipenem foi confirmada a contribuição de dois mecanismos, mediados pela presença de MBL e ausência de porina OprD.
6. Em 13% (10/76) isolados, a deleção da porina OprD esteve associada à presença de seqüências de inserção (SI) em uma região anterior ao gene *oprD*. Por outro lado, a ausência de amplificação da região 736/1394 do gene *oprD*, em 11% (9/76) dos isolados, sugeriu a presença de polimorfismos.
7. O gene *mexA* esteve presente em 92% dos isolados, enquanto que o gene *mexE* esteve presente em 82% dos isolados.
8. A triagem de bombas de efluxo por disco combinado e análise da CIM na presença de reserpina, CCCP e PAβN, utilizando levofloxacina, meropenem, aztreonam, imipenem ou levofloxacina, não teve correlação com a superexpressão dos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN. Ambos os métodos careceram de especificidade e sensibilidade quando comparados ao PCR em tempo real.
9. A superexpressão dos sistemas *mexA* e *mexE* foi confirmada em 35% (7/20) isolados MBL negativos, enquanto que 11% (6/56) isolados MBL positivos apresentaram superexpressão do gene *mexA* ou *mexE*, sendo que 7% (4/56) isolados MBL positivos superexpressaram ambos os genes.
10. A superexpressão dos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN como único mecanismo de resistência ao meropenem e imipenem foi confirmada em 10% (2/20) dos isolados MBL negativos.
11. Nos 76 isolados, a tipagem genotípica por ERIC-PCR, identificou a presença de 24 *clusters* (considerando 90% de similaridade na análise do dendrograma).
12. A convergência de múltiplos mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* parece ser um evento favorável para a seleção de clones endêmicos multirresistentes disseminados na região Sudeste do Brasil.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M.; MERCER, A.; KUSECEK, B.; HEUZENROEDER, M.; POHL, A.; AARONSON, W.; SUTTON, A.; SILVER, P.R. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* 39: 315-335, 1983.

AEDEKERK, S.; Ghysels, B.; Cornelis, P.; Baysse, C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology.* 148: 2371-2381, 2002.

AESCHLIMANN, J. R. The Role of Multidrug Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-negative Bacteria. *Pharmacotherapy.* 23(7): 916-924, 2003.

AIRES, J. R.; KÖHLER, T.; NIKAIDO.; PLÉSIAT, P. Involvement of an Active Efflux System in the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(11): 2624-2628, 1999.

ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SADER, H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother.* v.52, n.1, p. 140-1, 2003.

ANDRADE, S. S.; PICAPO, R. C.; CAMPANA, E. H.; NICOLETTI, A. G.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Influence of Disk Preparation on Detection of Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates by the Combined Disk Assay. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2058-2060, 2007.

ARAKAWA, Y., SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38: 40-43, 2000.

AYDIN, F.; GUMUŞSOY, K.S.; ATABAY, H.I.; IÇA, T.; ABAY, S. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *J Appl Microbiol.* 103(1):27-35, 2007.v.103, n.1, p.27-35, 2007.

BALSALOBRE, L. C.; DROPA, M.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M.H. Detection of metallo-beta-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. *Lett Appl Microbiol.* 49(1):142-5, 2009.

BERNARD, P. S.; WITTEWER, C.T. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clinical Chemistry.* 46(2): 147-148, 2000.

BLAIR, J.; M. A; PIDDOCK, L. J. V. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*. v.12, n.5, p.512-519, 2009.

BONFIGLIO, G.; LAKSAI, Y.; FRANCHINO, L.; AMICOSANTE, G.; NICOLETTI G. Mechanisms of beta-lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 697-702, 1998.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*.22(3): 205-10, 2003.

CARVALHO, A.P.; ALBANO, R.M.; DE OLIVEIRA, D.N.; CIDADE, D.A.; TEIXEIRA, L.M.; MARQUES, E.A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist.* 12(2): 103-8, 2006.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.; JONES, R.; SCHMIDT, F.; WALSH, T. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo-beta-Lactamase *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* . 48(12): 4654-4661, 2004.

CASTANHEIRA M, FRITSCHER TR, SADER HS, JONES RN. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated spm-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(4): 1587-8, 2008.

CHEN, H.Y.; YUAN, M.; LIVERMORE, D.M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.* 43: 300-309, 1995.

CHO, D.; BLAIS, J.; TANGEN, K.; FORD, K.; LEE, A.; LOMOVSKAYA, O.; CHAMBERLAND, S.; MILLER, G. Prevalence of efflux mechanisms among clinical isolates of fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *39th Interscience Conference for Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco, 1999.

CIPRIANO, R.; VIEIRA, V.V.; FONSECA, E.L.; RANGEL, K.; FREITAS, F.S.; VICENTE, A.C. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*SPM clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microb Drug Resist.* 13(2): 142-6, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 7th edn, approved standard *M7-A7*. Wayne, PA: *CLSI*; 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved standard *M100-S18*. Wayne, PA: *CLSI*; 2008.

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. *M100-S20-U*, Wayne, PA: *CLSI*; 2010.
- DA SILVA FILHO, L.V.; TATENO, A.F.; VELLOSO, L. DE F.; LEVI, J.E.; FERNANDES, S.; BENTO, C.N.; RODRIGUES, J.C.; RAMOS, S.R. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatr. Pulmonol.* 37: 537-47, 2004.
- DAVIES, J.; WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 5: 234-240, 1997.
- DE FREITAS, A.L. & BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Braz J Infect Dis.* Feb; 6(1): 1-7, 2002.
- DENNY, B.J.; NOVOTNY, L.; WEST, P.W.J.; BLESOVA, M.; ZAMOCKA, J. Antimicrobial Activity of a Series of 1-Alkyl-2-(4-Pyridyl)Pyridinium Bromides against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Med. Princ. Pract.* 14: 377-381, 2005.
- DICE, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26: 297-302, 1945.
- DOI, Y.; YOKOYAMA, K.; YAMANE, K.; WACHINO, J.; SHIBATA, N.; YAGI, T.; SHIBAYAMA, K.; KATO, H.; ARAKAWA Y. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2): 491-6, 2004.
- DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 45: 88-94, 2007.
- DOI, Y.; GHILARDI, A.C.R.; ADAMS, J.; GARCIA, D.O.; PATERSON, D.L. Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase RmtD and Metallo- β -lactamase SPM-1 in a Panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(3): 852-856, 2007a.
- DOI, Y.; GHILARDI, A.C.R.; ADAMS, J. GARCIA, D.O.; PATERSON, D.L. High Prevalence of Metallo-beta-lactamase and 16S ribosomal RNA Methylase Co-production among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(9): 3388-3390, 2007b.
- DOS ANJOS BORGES, L. G.; DALLA VECHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiol Ecol.* 45(2):173-80, 2003.

- EL AMIN, N.; GISKE, C.G.; JALAL, S.; KEIJSER, B.; KRONVALL, G.; WRETLIND, B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*, 113(3):187-96, 2005.
- EL SALABI, A.; TOLEMAN, M.; WALSH, T. R. Novel subclass of a group B1 metallo-beta-lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. *49th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. San Francisco, CA, USA. Set 12-15, 2009. Poster C1-1365.
- EPP, S.F.; KÖHLER, T. PLÉSIAT, P.; MICHÉA-HAMZEHPOUR, M.; FREY, J.; PECHÈRE, J.C. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(6): 1780-7, 2001.
- EVANS, J. C.; SEGAL, H. A novel insertion sequence, ISPa25, in oprD of *Pseudomonas aeruginosa* associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(10): 3776-3777, 2007.
- FIGUEIREDO-MENDES, C.M.; SINTO, S.; MELLO-SAMPAIO, J.L.; CARDOSO-LEAO, S.; OPLUSTIL, C.P.; TURNER, P.; VEIGA-KIFFER, C.R. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Aug-Sep; 23(7): 402-405, 2005.
- FRANKLIN, C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A.Y. Phenotypic Detection of Carbapenem-Susceptible Metallo-β-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3139-3144, 2006.
- FUKUDA, H.; HOSAKA, M.; HIRAI, K.; IYOBE, S. New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1757-1761, 1990.
- FUKUDA, H.; HOSAKA, M.; IYOBE, S.; GOTOH, N.; NISHINO, T.; HIRAI, K. *nfxC*-Type Quinolone Resistance in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3): 790-792, 1995.
- FUNG-TOMC, J.C.; GRADELSKI, E.; KOLEK, B.; MINASSIAN, B.; PUCCI, M.; KESSLER, R.E.; BONNER, D.P. Activity of Carbapenem BMS-181139 against *Pseudomonas aeruginosa* Is Not Dependent on Porin Protein D2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 386-393, 1995.
- FURTADO, G. H.; D'AZEVEDO, P. A.; SANTOS, A. F.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C.; MEDEIROS, E. A. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30: 315-319, 2007.

- GAINES, J.M.; CARTY, N.L.; TIBURZI, F.; DAVINIC, M.; VISCA, P.; COLMER-HAMOOD, J.A.; HAMOOD, A.N. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor PvdS under reduced levels of oxygen. *Microbiology*. 153: 4219-4233, 2007.
- GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 45: 77-79, 2003.
- GALES, A.C.; TORRES, P.L.; VILARINHO, D.S.; MELO, R.S.; SILVA, C.F.; CEREDA, R.F. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. *Braz J Infect Dis*. Aug; 8(4): 267-71, 2004.
- GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2565-2571, 2005.
- GIAKKOUPI, P.; TZOUVELEKIS, L.S.; DAIKOS, G.L.; MIRIAGOU, V.; PETRIKKOS, G.; LEGAKIS, N.J.; VATOPOULOS, A.C. Discrepancies and interpretation problems in susceptibility testing of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol*. 43: 494-496, 2005.
- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the main. *Exp Hematol*. 30: 503-512, 2002.
- GISKE, C.G.; BUARO, L.; SUNDSFJORD, A.; WRETLIND, B. Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. 14(1): 23-30, 2008.
- GONÇALVES, D.C.; LIMA, A.B.; LEÃO, L.S.; FILHO JR, PIMENTA, F.C.; VIEIRA, J.D. Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Goiânia, State of Goiás. *Rev Soc Bras Med*. 42(4): 411-414, 2009.
- GOOSSENS, H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. *Clin. Microbiol. Infect*. 9: 980-983, 2003.
- GOTOH, N.; TSUJIMOTO, H.; TSUDA, M.; OKAMOTO, K.; NOMURA, A.; WADA, T.; NAKAHASHI, M.; NISHINO, T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ Multidrug Efflux System in *mexA-mexB-oprM* Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42(8): 1938-1943, 1998.
- HARRIS, A.; VIEIRA, T. C.; VENKATARAMAN, L.; DeGIROLAMI, P.; SAMORE, M.; CARMELI, Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 28: 1128-1133, 1999.

- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real-time quantitative PCR. *Genome Research*.6: 986-994, 1996.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10: 413-417, 1992.
- HIRAI, K.; SUZUE, S.; IRIKURA, T.; IYOBE, S.; MITSUHASHI, S. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 31: 582-586, 1987.
- HUANG, H.; HANCOCK, R. E. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 178: 3085-3090, 1996.
- JAKICS, E.B.; IYOBE, S.; HIRAI, K.; FUKUDA, H.; HASHIMOTO, H. Occurrence of the nfxB type mutation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 36: 2562-2565, 1992.
- JALAL, S.; WRETLIND, B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist*. 4: 257-261, 1998.
- KAATZ, G.W. Inhibition of bacterial efflux pumps: a new strategy to combat increasing antimicrobial agent resistance. *Expert Opin Emerg Drugs*, 7(2): 223-233, 2002.
- KESANOPOULOS, K.; TZANAKAKI, G.; LEVIDIOTOU, S.; BLACKWELL, C.; KREMASTINO, J. Evaluation of touch-down real-time PCR based on SYBR Green I fluorescent dye for the detection of *Neisseria meningitidis* in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* , 43: 419-424, 2005.
- KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis*. Jun; 9(3): 216-224, 2005.
- KÖHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPUR, M.; PESIAT, P.; KAHR, A.L.; PECHERE, J.C. Differential selection of multidrug efflux system by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 2540-2543, 1997.
- KÖHLER, T.; HAMZEHPUR, M.M.; SIMONE, F.; PECHERE, J.C. Carbapenem Activities against *Pseudomonas aeruginosa*: Respective Contributions of OprD and Efflux Systems. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 424-427, 1999a.
- KÖHLER, T.; EPP, S.F.; CURTY, L.K.; PECHÈRE, J.C. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 181(20): 6300-5, 1999b.

KOKIS, V.M.; MOREIRA, B.M.; PELLEGRINO, F.L.; SILVA, M.G.; LONG, J.B.; BASTOS, C.C.; SANTOS, K.R. Identification of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro. *J Hosp Infect.* 60(1): 19-26, 2005.

KRIENGKAUYKIAT, J.; PORTER, E.; LOMOVSKAYA, O.; WONG-BERINGER, A. Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 565-570, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.

LAURETTI, L; RICCIO, M.L; MAZZARIOL, A; CORNAGLIA, G; AMICOSANTE, G; FONTANA, R; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-B-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1584-1590, 1999.

LEE, K.; LIM, Y.S.; YONG, D.; YUM, J.H.; CHONG, Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo-B-lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4623-4629, 2003.

LEE, K., YUM, J. H.; YONG, D.; LEE, H. M.; KIM, H. D.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.

LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENCO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, S.F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* May; 28(5): 1008-1011, 1999.

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

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

LI, X.; ZHANG, L.; POOLE, K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 45: 433-436, 2000.

LI, Y.; MIMA, T.; KOMORI, Y.; MORITA, Y.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:572-575, 2003a.

- LI, X.; POOLE, K.; NIKAIDO, H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 27-33, 2003b.
- LI, X.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria An Update. *Drugs.* v. 69, n.12, p.1555-1623, 2009.
- LIE, Y.S. & PETROPOULOS, C.J. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinion in Biotechnology.* 9: 43-48, 1998.
- LINARES, J.F., LÓPEZ, J.A.; CAMAFEITA, E.; ALBAR, J.P.; ROJO, F.; MARTINEZ, J.L. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 187: 1384-1391, 2005.
- LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol.* Jan; 43(1): 516-519, 2005.
- LINCOPAN, N., TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa* In: TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2008. p. 369-381.
- LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis.* 14(4): e344-7, 2010.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 22(4):582-610, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods.* 25(4):402-8, 2001.
- LIVERMORE, D.M. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36(9): 2046-2048, 1992.
- LIVERMORE, D. M.; N. WOODFORD. Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology.* 3:489-495, 2000.
- LIVERMORE, D. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and Carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 47: 247-250, 2001.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst Nightmare? *Clin Infect Dis.* 34: 634-640, 2002.

LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clin. Infect. Dis.* 36(Suppl 1): S11-23, 2003.

LLANES, C.; HOCQUET, D.; VOGNE, C.; BENALI-BAITICH, D.; NEUWIRTH, C.; PLÉSIAT, P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 1797-1802, 2004.

LOMOVSKAYA, O.; WARREN, M.S.; LEE, A.; GALAZZO, J.; FRONKO, R.; LEE, M.; BLAIS, J.; CHO, D.; CHAMBERLAND, S.; RENAULT, T.; LEGER, R.; HECKER, S.; WATKINS, W.; HOSHINO, K.; ISHIDA, H.; LEE, V.J. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan; 45(1): 105-116, 2001.

LOWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, (60): 2286-2295, 1994.

LUZZARO, F.; ENDIMIANI, A.; DOCQUIER, J.D.; MUGNAIOLI, C.; BONSIGNORI, M.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M.; TONIOLO, A. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Feb; 48(2): 131-5, 2004.

MARCHIARO, P.; MUSSI, M.; BALLERINI, V.; PARSTERÁN, F.; VIALE, A.; VILA, A.; LIMANSKY, A.S. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 43: 5648-52, 2005.

MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; BARTH, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* 35(6): 457-60, 2007.

MASEDA, H.; YONEYAMA, H.; NAKAE, T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 658-664, 2000.

MASUDA, N. & OHYA, S. Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36(9): 1847-1851, 1992.

MASUDA, N.; SAKAGAWA, E.; OHYA, S.; GOTOH, N.; TSUJIMOTO, T.; NISHINO, T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-

OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 3322-3327, 2000.

MAUSNER, J.; BAHN, A. Epidemiology. Philadelphia, WB Saunders, 1974.

MENDES, R.E., CASTANHEIRA, M., PIGNATARI, A. C. C., GALES, A. C. Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med Lab.* 42(2): 103-113, 2006.

MESAROS, N.; GLUPCZYNSKI, Y.; AVRAN, L.; CACERES, N. E.; TULKENS, P. M.; VAN BAMBEKE, F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 59: 378-386, 2007.

MIMA, T.; SEKIYA, H.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, 49:999–1002, 2005.

MIMA, T.; JOSHI, S.; GOMEZ-ESCALADA, M.; SCHWEIZER, H. P. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J Bacteriol.* 189: 7600–7609, 2007.

MINE, T.; MORITA, Y.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 415-417, 1999.

MORITA Y, MURATA T, MIMA T, SHIOTA S, KURODA T, MIZUSHIMA T, GOTOH N, NISHINO T, TSUCHIYA T. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Antimicrob Chemother.* Apr;51(4):991-4. 2003

MORSHED, S.R.; LEI, Y.; YONEYAMA, H.; NAKAE, T. Expression of genes associated with antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 210: 356-362, 1995.

MOYA, B.; DÖTSCH, A.; JUAN, C.; BLÁZQUEZ, J.; ZAMORANO, L.; HAUSSLER, S.; OLIVER, A. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* 5(3): e1000353, 2009.

MÜLLER-PREMRU, M.; LEJKO-ZUPANC, T. Epidemiological typing of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 20: 380-383, 2002.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48(8): 579-582, 1990.

- MURPHY, T. A.; CATTO, L. E.; , HALFORD, S. E.; HADFIELD, A. T.; MINOR, W.; WALSH, T. R.; SPENCER, J. Crystal Structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 Provides Insights into Variable Zinc Affinity of Metallo- β -lactamases. *Journal of Molecular Biology*. 357: 890-903, 2006.
- NEVES, P.R.; SILVA, M. T. N.; GONÇALVEZ, T.; LINCOPAN,N.; MAMIZUKA, E.M. Multirresistência mediada por metalo-beta-lactamases, porinas, bombas de efluxo e metilases, em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. In: XI Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Rio de Janeiro. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v.12, p. 30, 2008.
- NIKAIDO, H.; NIKAIDO, K.; HARAYAMA, S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem*. 266: 770-779, 1991.
- NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem*. 269: 3905-3908, 1994.
- NISHIO H, KOMATSU M, SHIBATA N, SHIMAKAWA K, SUEYOSHI N, URA T, SATOH K, TOYOKAWA M, NAKAMURA T, WADA Y, ORITA T, KOFUKU T, YAMASAKI K, SAKAMOTO M, KINOSHITA S, AIHARA M, ARAKAWA Y. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol*. Nov;42(11):5256-63, 2004.
- NORDMANN, P.; GUILBERT, M. Extended-spectrum beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 42: 128-131, 1998.
- OCHIS, M.; MCCUSKER, M.; BAINS, M.; HANCOCK, R. Negative Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 1085-1090, 1999.
- OH, E. J.; LEE, S.; PARK, Y. J.; PARK, J. J.; PARK, K.; KIM, S. I.; KANG, M. W.; KIM, B. K.. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. *J. Microbiol. Methods*. 54: 411-418, 2003.
- OLIVE, D. M. & BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 37: 1661-1669, 1999.
- ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 36: 255-269, 1998.
- PAGÈS, J. M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 6(12):893-903, 2008.

- PEARSON, J. P.; VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B.H. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *J Bacteriol.* 181(4): 1203-1210, 1999.
- PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, MD. MDA. G.; ARANHA NOUER, S.; PINTO DE OLIVEIRA, M.; MELLO SAMPAIO, J.L.; D'AVILA FREITAS, A.; FERREIRA, A.L.; AMORIM, ED. EDE. L.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* Jul; 40(7): 2420-2424, 2002.
- PELLEGRINO, F.L.; CASALI, N.; DOS SANTOS, K.R.; NOUÉR, S.A.; SCHEIDEGGER, E.M.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. *J Chemother.* 18(2): 151-6, 2006.
- PELLEGRINO, F.L.; CASALI, N.; NOUÉR, S.A.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. A carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain carrying the bla(SPM) gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 61(2): 214-6, 2008.
- PEREIRA, G.H.; LEVIN, A.S.; OLIVEIRA, H.B.; MORETTI, M.L. Controlling the clonal spread of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 29(6): 549-552, 2008.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45, 2001.
- PICÃO, R.C.; ANDRADE, S.S.; NICOLETTI, A.G.; CAMPANA, E.H.; MORAES, G.C.; MENDES, R.E.; GALES, A.C. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol.* 46(6): 2028-37, 2008.
- PIDDOCK, L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* Apr; 19(2): 382-402, 2006.
- PIRNAY, J. P.; DE VOS, D.; MOSSIALOS, D.; VANDERKELEN, A.; CORNELIS, P.; ZIZI, M. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. *Environmental Microbiology.* 4: 872-882, 2002.
- POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase from a Nosocomial Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis.* 6(1): 84-85, 2000.
- POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. Characterization of bla_{DIM-1}, a novel integron-located metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Helsinki, Finlândia. Maio 16-19, 2009 Pôster O309.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56: 20-51, 2005.

POOLE, K.; KREBES, K.; MCNALLY, C.; NESHAT, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* 175(22): 7363-7372, 1993.

POOLE, K.; GOTOH, N.; TSUJIMOTO, H.; ZHAO, Q.; WADA, A.; YAMASAKI, T.; NESHAT, S.; YAMAGISHI, J.; LI, X.Z.; NISHINO, T. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 21(4): 713-24, 1996a.

POOLE, K.; TETRO, K.; ZHAO, Q.; NESHAT, S.; HEINRICHS, D.; BLANCO, N. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2021-2028, 1996b.

POOLE, K.; SRIKUMAR, R.; PAUL, C. Influence of Mutations in mexR Repressor Gene on Expression of the Mex A-MexB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 182: 1410-1414, 2000.

POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P.T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N.J.; MANIATIS, A.N. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. *J Antimicrob Chemother.* Oct;56(4):761-4. 2005.

POURNARAS, S., MARKOGIANNAKIS, A., IKONOMIDIS, A., KONDYLI, L., BETHIMOUTI, K., MANIATIS, A. N., LEGAKIS, N.J., TSAKRIS, A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:557-561, 2006.

PUJANA, I.; GALLEGO, L.; MARTIN, G.; LOPEZ, F.; CANDUELA, J.; CISTERNA, R. Epidemiological Analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronic Bronchiectasis Patients without Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 37(6): 2071-2073, 1999.

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* May;50(5):1633-41. 2006

RÅDBERG, G.; NILSSON, L.E.; SVENSSON, S. Development of quinolone-imipenem cross resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during exposure to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(11): 2142-7, 1990.

RENDERS, N.; RÖMLING, U.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUN, A. Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments. *J Clin Microbiol*, 34(12): 3190-3195, 1996.

RICCI, V.; L. PIDDOCK. Accumulation of garenoxacin by *Bacteroides fragilis* compared with that of five fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 605-609, 2003.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ JM, POIREL L, NORDMANN P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(11):4783-8, 2009.

RUPP, M.E.; FEY, P.D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs.* 63: 353-365, 2003.

SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C.; LEME, I.L.; BURATTINI, M.N.; TANCRESI, R.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Jul; 17(1): 13-18, 1993.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* Aug; 5(4): 200-214, 2001.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect.* Jan; 11(1): 73-76, 2005.

SAFDAR, N.; HANDELSMAN, J.; MAKI, D.G. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 4:519-527, 2004.

SAIER, M. H. JR.; PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K.; PAO, S. S.; SKURRAY, R. A.; NIKAIIDO, H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12: 265-274, 1998.

SEKIGUCHI, J. I.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKASAKI, M.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(11): 4194 – 4197, 2008.

- SOBEL, M.L.; MCKAY, G.A.; POOLE, K. Contribution of the MexXY Multidrug Transporter to Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(10): 3202-3207, 2003
- SYRMIS, M. W.; O'CARROLL, M. R.; SLOOTS, T. P.; COULTER, C.; WAINWRIGHT, C. E.; BELL, S. C. NISSEN, M. D. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol*, 53: 1089-1096, 2004.
- TAMBER, S.; HANCOCK, R. E. W. Involvement of two related Porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 260: 23-29, 2006.
- TAMBER, S.; OCHS, M. M.; HANCOCK, R. E. W. Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 188(1): 45-54, 2006.
- TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 50(5): 673-9, 2002.
- TOHIDPOUR, A.; NAJAR PEERAYEH, S.; MEHRABADI, J. F.; REZAEI YAZDI, H. Determination of the efflux pump-mediated resistance prevalence in *Pseudomonas aeruginosa*, using an efflux pump inhibitor. *Curr Microbiol*, 59(3):352-5, 2009.
- UEDA, O.; WEXLER, H.M.; HIRAI, K.; SHIBATA, Y.; YOSHIMURA, F.; FUJIMURA, S. Sixteen homologs of the mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(7): 2807-15, 2005.
- UNCHALEE TATTAWASART, J.Y.; MAILLARD, J.R.; FURR, A.D.; RUSSELL. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16(3): 233-238, 2000.
- VILA, J. & MARCO, F. Interpretative reading of the non-fermenting Gram negative bacilliantibiogram. *Enfermage Infectious Microbiology Clinical*. 20: 304-310, 2002.
- WACHINO, J.; YAMANE, K.; KIMURA, K.; SHIBATA, N.; SUZUKI, S.; IKE, Y.; ARAKAWA Y. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by ISEcp1. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(9): 3212-5, 2006.
- WALSH, T. R.; BOLMSTRÖM, A.; QWÄRNSTRÖM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol*. 40: 2755-2759, 2002.

- WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 306-325, 2005.
- WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 147-151, 1991.
- WELCH, A.; AWAH, C.U.; JING, S.; VAN VEEN, H.W.; VENTER, H. Promiscuous partnering and independent activity of MexB, the multidrug transporter protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J.* 2010 Jun 28. [Epub ahead of print]
- WESTBROCK-WADMAN, S.; SHERMAN, D.R.; HICKEY, M. J.; COULTER, S. N.; ZHU, Y. Q.; WARRENER, P.; NGUYEN, L. Y.; SHAWAR, R. M.; FOLGER, K. R.; STOVER C. K. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 2975-2983, 1999.
- WILFINGER, W. W.; MACKEY, M. AND CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22, 474, 1997.
- WOLTER, D. J.; HANSON, N. D.; LISTER, P. D. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *Fems Microbiology.* 236: 137-143, 2004.
- WONG, M.L. & MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 39: 75-85, 2005.
- YAMANE, K.; WACHIN, J.; SUZUKI, S.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, KIMURA, K.; KAI, K.; ISHIKAWA, S.; OZAWA, Y.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. 16S rRNA Methylase-producing, Gram-negative Pathogens, Japan. *Emerging Infectious Diseases.* 13:642-646, 2007.
- YOKOYAMA, K.; DOI, Y.; YAMANE, K. Acquisition of 16S r RNA methylase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 362:1888-1893, 2003.
- YONEDA, K.; CHIKUMI, H.; MURATA, T.; GOTOH, N.; YAMAMOTO, H.; FUJIWARA, H.; NISHINO, T.; SHIMIZU, E.. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 243: 125-131, 2005.
- YONEYAMA, H.; YOSHIHARA, E.; NAKAE, T.. Nucleotide Sequence of the protein D2 gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 1791-1793, 1992.

- YONEYAMA, H.; NAKAE, T. Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 2385-2390, 1993.
- YONEYAMA, H.; YAMANO, Y.; NAKAE, T. Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 213: 88-95, 1995.
- YONEYAMA, H.; OCAKTAN, A.; TSUDA, M.; NAKAE, T. The role of mex-gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 233: 611-618, 1997.
- YONG, D.; BELL, J. M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A Novel Sub-Group Metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 Emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. *47th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. Chicago, IL, USA. Set, 17-20, 2007. Poster C1-539.
- YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S. SUNDMAN, K.; LEE, K. WALSH, T. R. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(12): 5046-5054, 2009.
- YOSHIHARA, E.; GOTOH, N.; NISHINO, T.; NAKAE, T. Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity. *FEBS Letters.* 394: 179-182, 1996.
- ZAVASCKI, A.P.; CRUZ, R.P.; GOLDANI, L.Z. High rate of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 25(10): 805-807, 2004.
- ZIHA-ZARIFI, I.; LLANES, C.; KÖHLER, T.; PECHERE, J.C.; PLESIAT, P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 287-291, 1999.
- ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications". *Nucleic acids research.* 32(12): e103, 2004.

* Referências segundo Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR6023/2002

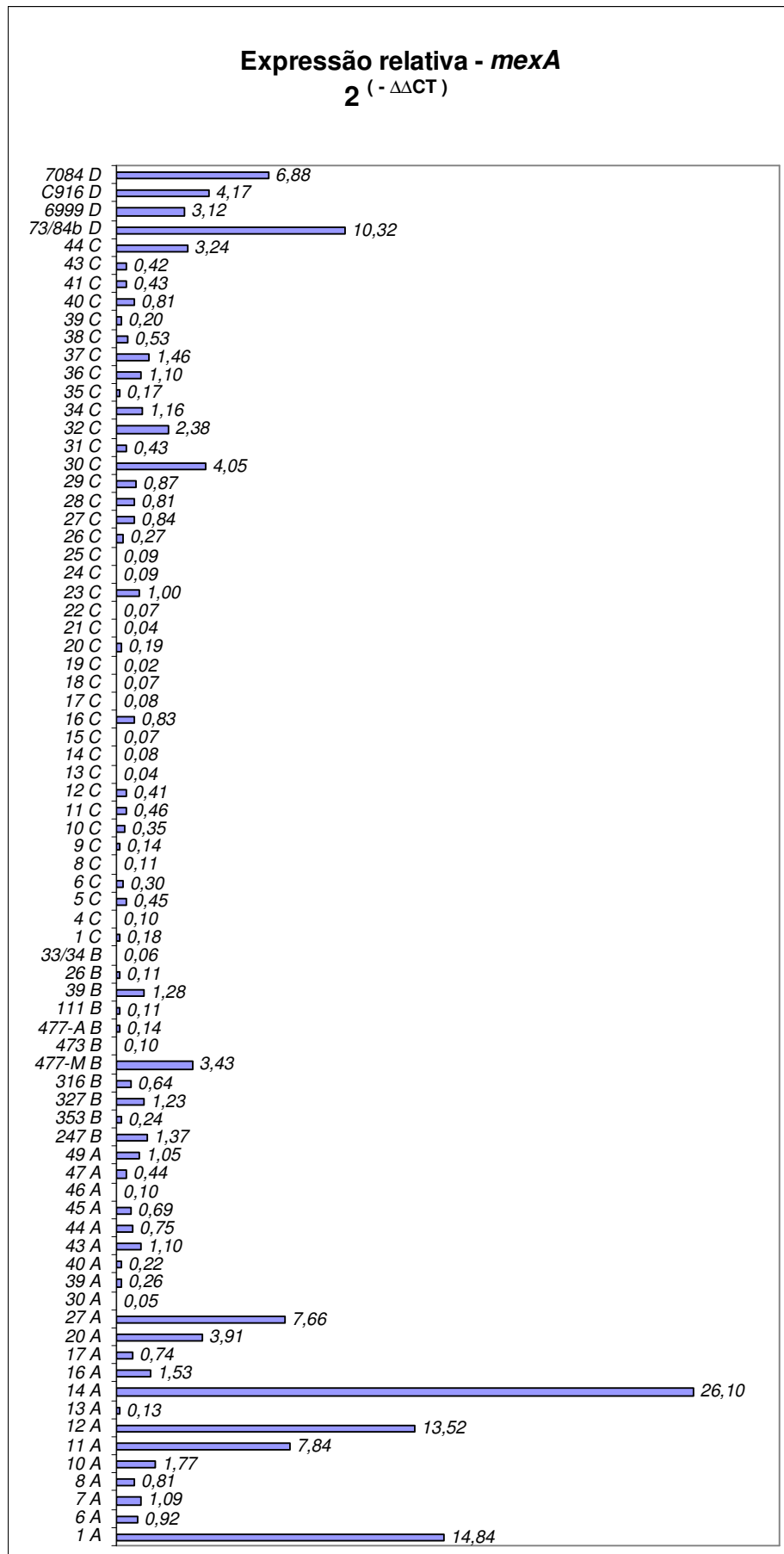
8 -ANEXOS

Anexo 1

FONTE / ISOLADO	Perfil de resistência					PCR							MIC (µg/mL)		Porina (kDa)			
						MBL		rmt-D	opr-D(bp)	mex	Tempo Real	IPM	IPM,EDTA	SDS-PAGE				
	CAZ	IPM	MEM	AK	CIP	VIM	SPM								MIC (µg/mL)	Porina (kDa)		
A																		
1	S	R	S	S	S	-	-	-	+	+	+	A, E	A, E	8	8	-	-	-
6	R	R	R	S	S	-	-	-	-1589	+	+	A, E	-	16	16	-	-	-
7	S	R	S	S	S	-	-	-	-1589	+	+	A, E	-	16	16	-	-	-
8	S	R	S	S	S	-	-	-	-1589	+	+	A, E	-	32	16	-	-	-
10	I	R	R	S	R	+	-	-	-1589	+	+	A, E	-	16	16	-	-	-
11	S	R	I	S	S	+	-	-	-1589	+	+	A, E	A, E	16	16	-	-	-
12	S	R	I	S	S	-	-	-	+	+	+	A, E	A, E	16	16	-	-	-
13	S	R	S	S	S	+	-	-	+	+	+	A, E	-	32	16	-	-	-
14	S	R	I	S	S	-	-	-	+	+	+	A, E	A, E	32	16	-	-	-
16	S	R	R	R	R	-	-	+	+	+	+	A, E	-	32	16	-	-	-
17	I	R	I	S	S	-	-	-	+	+	+	A, E	-	32	16	-	-	-
20	S	R	S	S	S	-	-	-	-1589	+	-659	A, E	A, E	16	16	-	-	-
27	S	R	R	S	R	-	-	-	+	+	+	A, E	A, E	32	16	-	-	-
30	R	R	R	S	R	+	-	-	+	+	+	A, E	-	32	16	-	-	45
39	I	R	R	R	R	-	-	+	+	+	+	A	-	16	16	-	-	-
40	S	R	R	S	S	+	-	-	-1589	-262	+	A, E	-	16	16	-	-	-
43	S	R	I	S	R	+	-	-	+	+	+	A, E	-	16	16	-	-	47
44	S	R	I	S	S	+	-	-	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	45
45	S	R	R	S	S	+	-	-	+	+	+	-	-	8	16	-	-	47
46	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	46
47	S	R	S	S	S	-	-	-	+	+	+	A, E	-	16	16	-	-	-
49	S	R	S	S	S	-	-	-	+	+	+	-	-	8	8	-	-	-
B																		
247	R	R	R	S	R	+	-	-	+	+	+	-	-	128	16	-	-	-
353	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	-	-	512	16	-	-	47
327	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	E	> 512	16	-	-	-
316	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	E	E	512	16	-	-	46
477-M	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	A, E	512	16	-	-	-
473	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	256	8	-	-	-
477-A	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	-	-	512	8	-	-	46
111	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	16	-	-	-
39	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	16	-	-	-
26	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	16	-	-	-
33/34	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	-659	A, E	-	> 512	16	-	-	-
C																		
1	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	-
4	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	-
5	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	-659	A, E	-	128	16	-	-	47
6	R	R	R	S	S	-	-	-	+	+	-659	A, E	-	64	16	-	-	47
8	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	-659	A, E	-	256	32	-	-	47
9	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	-659	A, E	E	64	16	-	-	-
10	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	-659	A, E	-	64	16	-	-	-
11	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	-659	A, E	-	> 512	32	-	-	46
12	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	256	16	-	-	-
13	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	32	-	-	46
14	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	256	16	-	-	-
15	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A	-	128	16	-	-	-
16	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	256	32	-	-	-
17	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	32	-	-	46
18	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	-
19	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	-
20	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A	-	64	16	-	-	-
21	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A	-	64	16	-	-	46
22	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	256	32	-	-	46
23	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	64	16	-	-	-
24	R	R	R	R	R	-	-	+	+	+	+	A	-	64	8	-	-	-
25	R	R	R	R	R	-	-	+	+	+	+	A	-	32	16	-	-	-
26	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	8	-	-	-
27	R	R	R	S	S	-	-	-	+	+	+	A, E	-	8	4	-	-	-
28	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	8	-	-	-
29	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	8	-	-	-
30	R	R	S	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	A	> 512	8	-	-	-
31	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	8	-	-	-
32	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	A	512	8	-	-	-
34	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	8	-	-	-
35	R	R	R	R	I	-	-	-	-1589	+	+	A, E	-	8	8	-	-	-
36	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	512	8	-	-	-
37	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	8	-	-	46
38	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	128	16	-	-	46
39	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	256	8	-	-	46
40	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	8	-	-	-
41	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	-	> 512	8	-	-	-
43	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A	-	> 512	8	-	-	-
44	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	A, E	A, E	> 512	8	-	-	-
D																		
73/84B	S	R	R	S	S	-	-	-	-1589	+	-659	A, E	A, E	32	16	-	-	-
6999	S	R	R	R	R	-	+	-	+	+	+	A, E	A, E	32	16	-	-	-
c916	S	R	R	S	R	-	-	-	-1589	+	+	A, E	A, E	32	16	-	-	46
7084	R	R	R	S	R	-	+	+	+	+	+	A, E	A	16	16	-	-	47

CAZ, ceftazidima; IPM, imipenem; MEM, meropenem; AK, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; MBL, metalo-beta-lactamase; CIM, concentração inibitória mínima; EDTA, ácido etilendiamino tetra-acético; R, resistente; I, intermediário; S, sensível; (+) positivo / presença; (-) negativo / ausência

Anexo 3



Anexo 4

