

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Prevalência de beta-lactamases de amplo espectro e metilases RNAr
16S em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes
recuperados em diferentes hospitais de São Paulo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa.: Elsa Masae Mamizuka

São Paulo

2009

Mariama Tomaz Nogueira da Silva

Prevalência de beta-lactamases de amplo espectro e
metilases RNAr 16S em isolados clínicos de *Pseudomonas*
aeruginosa multirresistentes recuperados em diferentes hospitais de
São Paulo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Aos meus pais.
Por acreditarem tanto em mim e lutarem comigo para a
realização dos meus objetivos e sonhos.
Amor incondicional indescritível.
Amor, respeito e admiração eternos.*

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Elsa Masae Mamizuka, por me receber no laboratório de Microbiologia Clínica da FCF, pelo apoio, pela compreensão, pelas contribuições teóricas, pelos conselhos e pela paciência;

Ao Prof. Nilton Lincopan, pela idéia do projeto, pelo apoio dado durante toda a sua realização, pela disposição, pela atenção dispensada, pelos ensinamentos, pelos momentos de reflexão e pelo incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho;

À agência de fomento FAPESP pelo apoio financeiro;

Aos colegas e amigos que passaram ou ainda estão no laboratório e de alguma forma participaram da elaboração deste trabalho, seja com cooperação, com dicas, com momentos de lazer, com ajuda direta ou indireta: Andyara, Charline, Franciele, John, Lara, Lilian, Mónica, Patrícia e Tainá.

À Prof. Marina Baquerizo Martinez e seus alunos, em especial, Ana Carolina, Beth e Lucas, pela convivência no laboratório durante tanto tempo, pelas dicas, pelos empréstimos, pelos bons momentos compartilhados;

Aos colegas e professores dos demais laboratórios do Departamento que muitas vezes emprestaram seu espaço, equipamento e até mesmo seus conhecimentos para a realização deste trabalho;

Aos professores Sandro de Almeida e Soraya Andrade pelas contribuições feitas durante o Exame de Qualificação que ajudaram a melhorar a finalização deste trabalho;

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que viabilizam o trabalho do dia-a-dia;

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas que colaboram de diversas formas para o andamento e realização do trabalho;

Às duas pessoas que sobremaneira me auxiliam acadêmica, profissional, financeira e, principalmente, afetivamente, acreditando sempre no meu potencial e me fazendo sentir especial, minha mãe Maria Das Dores e meu pai Valdir;

Ao meu irmão, Odair, pelo carinho, apoio, amor que sempre teve comigo e por me tratar como irmã preferida;

Aos meus avós, aos meus tios e aos meus primos pelo apoio incondicional e por acreditarem tanto em mim;

Às minhas amigas e aos meus amigos que tanto amo, que tanto demonstram o verdadeiro sentido da amizade, em especial aos que acompanharam de perto a minha trajetória pelo mestrado: Alan, Aline, Carol, Desmame, Fanga, Gisela, Giselle, Guilherme, Joseph, Leandro, Lina, Mariane, Marina, Nane, Natália, Nayara e Suzana.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que esse trabalho se tornasse real, muito obrigada.

*Que o mel é doce é coisa que nego a afirmar,
mas que parece doce eu afirmo plenamente.*

(Raul Seixas)

Resumo

Introdução e objetivos: A produção de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs) tem sido restrita a espécies do gênero *Klebsiella* spp. e *E. coli*, sendo associada a altos índices de resistência, morbidade e mortalidade. Uma vez que os determinantes genéticos para ESBLs (genes bla_{ESBL}) são mediados por plasmídios, a sua disseminação para outras espécies de importância médica é considerada uma urgência epidemiológica. Os genes que codificam para ESBLs são mais comumente encontrados em membros da família *Enterobacteriaceae*, porém, plasmídeos, integrons, e sequências de inserção têm contribuído para o aumento da incidência de genes bla_{ESBL} entre outras bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Infelizmente, uma das maiores dificuldades associada à identificação precoce da produção de ESBL em agentes de infecção hospitalar como *Pseudomonas aeruginosa* tem sido a padronização de métodos fenotípicos, os quais são afetados por resultados falso-negativos, decorrentes de mecanismos intrínsecos que mascaram a presença destas enzimas (i.e., produção de beta-lactamase AmpC de origem cromossômica). O presente estudo teve como objetivo caracterizar fenotípicamente e genotipicamente a produção de ESBLs em isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de diferentes hospitais do Estado de São Paulo durante o período de 2004-2008.

Materiais e métodos: 35 amostras de *P. aeruginosa* provenientes de 4 diferentes centros médicos de São Paulo, com perfil de resistência às cefalosporinas de terceira geração, foram submetidas à triagem fenotípica para a produção de ESBL na presença e ausência de inibidores específicos (ácido clavulânico e cloxacilina). A confirmação genotípica foi realizada por PCR e sequenciamento, usando *iniciadores* para pesquisa dos genes bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{OXA} , bla_{PER} e bla_{GES} , e para o mapeamento de integron Classe 1. A diversidade genética das amostras foi realizada com auxílio do método de ERIC PCR e o índice de similaridade calculado empregando-se o coeficiente de Dice.

Resultados e conclusão: Os métodos fenotípicos identificaram 3 cepas produtoras de ESBL, porém, a presença dos genes bla_{CTX-M} e bla_{OXA-10} foi confirmada em 9 (33%) e 2 (7%) cepas de *P. aeruginosa*, respectivamente, recuperadas em 3 centros. O mapeamento e sequenciamento do integron classe 1 encontrado revelou que duas cepas carregam 2 diferentes integrons classe 1 com genes $bla_{CTX-M-2}$, $aac6$, e $aadA6$ de resistência para as cefalosporinas de terceira geração e para aminoglicosídeos. A transferência horizontal dos genes bla_{ESBL} não foi confirmada por transformação. Este estudo descreve que o aparecimento e disseminação de genes bla_{CTX-M} em isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Brasil teve sua origem a partir de 2005. Uma vez que ESBLs do tipo CTX-M têm sido amplamente descritas em Enterobactérias, a identificação destes genes em isolados de *P. aeruginosa* é alarmante e mostra que a mobilização horizontal do gene bla_{CTX-M} entre diferentes gêneros e espécies é uma realidade no Brasil. Os genes que conferem resistência às metilases 16s RNAr não estavam relacionados a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* produtores da enzima ESBL isoladas nas amostras de São Paulo. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* do presente estudo mostraram vários elementos de mobilização genéticos, como integrons e sequências de inserção, que podem estar participando na disseminação de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL, metilases, resistência, antibióticos

Abstract

Prevalence of Extended-spectrum β -lactamase and 16S rRNA methylases in clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from different hospitals in São Paulo

Introduction and aim: The production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) has been restricted to *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*, being associated with high rates of resistance, morbidity and mortality. Since genetic determinants for ESBLs (*bla*ESBL genes) are mediated by plasmids, the spread to other medical important species is considered an epidemiological urgency. These genes encoding ESBLs are commonly found in members of the *Enterobacteriaceae* however, plasmids, integrons, and insertion sequences have contributed to the increase in the incidence of *bla*ESBL genes among other gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*. Unfortunately, one of the biggest difficulties associated with the early identification of the production of ESBL in nosocomial agents as *Pseudomonas aeruginosa* has been the standardization of phenotypic methods, which are affected by false-negative results stemming from intrinsic mechanisms which can mask the presence of these enzymes (i.e., production of chromosomal beta-lactamase AmpC). The aim of this study is to characterize phenotypical and genotypical ESBL production in clinical isolates of *P. aeruginosa* recovered in different hospitals in São Paulo during the period of 2004 to 2008.

Materials and methods: 35 *P. aeruginosa* isolates intermediately resistant or resistant to third generation cephalosporin were phenotypically analyzed for the presence of ESBL with and without inhibitors (clavulanic acid and cloxacilin). Genotypic confirmation with specific primers for *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{PER} and *bla*_{GES} and the characterization of the genetic environment of *bla*_{CTX-M} was performed by PCR and DNA sequencing. The random amplified polymorphism DNA technique with primer ERIC-2 was carried out for the isolates genotyping and the similarity index calculated with coefficient of Dice.

Results and conclusion: the phenotypic methods identified 3 ESBL producing strains, however, the presence of genes *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA-10} has been confirmed in 9 (33%) and 2 (7%) strains of *P. aeruginosa*, respectively, from 3 medical centers. The mapping and sequencing of integron class 1 revealed that two strains harbored two different class 1 integrons with *aadA6*-like, *aac6* gene and *bla*_{CTX-M-2}-like genes conferring resistance to aminoglycosides and third generation cephalosporins. The *bla*ESBL horizontal transference has not been confirmed by transformation. This study describes that the emergence and spread of genes *bla*_{CTX-M} in clinical isolates of *P. aeruginosa* in Brazil had its origin from 2005. Since CTX-M type ESBLs have been widely described in *Enterobacteriaceae*, the identification of these genes in *P. aeruginosa* is alarming and shows that the *bla*_{CTX-M} horizontal mobilization among different genus and species is a reality in Brazil. The genes that confer resistance to 16S rRNA methylases are not related to ESBL positive *Pseudomonas aeruginosa* strains in samples of São Paulo. The *Pseudomonas aeruginosa* strains of this study showed several genetic mobilization elements, such as integrons and insertion sequences, which may be participating in the spread of resistance to broad spectrum betalactams.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL, methylases, resistance, antibiotics

Sumário

1) Introdução.....	03
1.1) Beta-lactamases de espectro ampliado em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05
1.2) Produção de metilases 16S RNAr em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	06
2) Revisão da Literatura.....	09
2.1) Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09
2.2) Resistência aos Beta-lactâmicos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.3) Produção de Beta-lactamases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.4) Beta-lactamases de espectro ampliado.....	14
2.4.1) Enzimas do tipo TEM.....	17
2.4.2. Enzimas do tipo SHV.....	18
2.4.3) Enzima do tipo PER.....	19
2.4.4) Enzimas do tipo GES.....	19
2.4.5) Enzimas do tipo OXA.....	20
2.4.6) Enzimas do Grupo VEB.....	21
2.4.7) Enzimas do tipo CTX-M.....	22
2.5) Detecção de beta-lactamases de espectro ampliado.....	24
2.6) Medidas de controle.....	25
2.7) Disseminação horizontal de genes de ESBL.....	26
2.7.1) Elementos genéticos móveis.....	26
2.7.2) Ambiente genético de ESBLs.....	29
3) Justificativa.....	31

4) Objetivos.....	32
5) Materiais e métodos	33
5.1) Amostras bacterianas.....	33
5.2) Condições de cultura.....	33
5.3) Extração do DNA total.....	33
5.4) Extração do DNA plasmidial.....	34
5.5) Perfil de sensibilidade antibacteriana.....	34
5.6) Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	34
5.7) Determinação fenotípica da produção de ESBLs.....	35
5.7.1) Teste de Sinergismo de Duplo Disco (DDST).....	35
5.7.2) Efeito sinérgico entre Ceftazidima e Imipenem.....	35
5.7.3) E-Test.....	36
5.8) Determinação fenotípica da produção de metilases 16S RNAr.....	36
5.9) Confirmação genotípica.....	37
5.9.1) Confirmação genotípica da produção de ESBLs.....	37
5.9.2) Confirmação genotípica da produção de metilases 16s RNAr.....	39
5.10) Padronização de PCR <i>Multiplex</i>	40
5.11) Estudo do ambiente genético de <i>bla</i> _{ESBL} positivas.....	41
5.12) Estudo da mobilidade dos genes de resistência.....	42
5.13) Tipagem genotípica.....	42
6) Resultados.....	43
7) Discussão.....	54
8) Conclusões.....	62
9) Referências bibliográficas.....	63

Lista de Abreviaturas

SENTRY	Programa de vigilância epidemiológica
MYSTIC	Meropenem <i>Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
PBP	Proteínas ligadoras de Penicilina
<i>bla</i>	Gene β -lactamases
MBL	Metallo- β -lactamases
ISCR	Seqüência de inserção de regiões comuns
CS	Regiões conservadas
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM 50	Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
CIM 90	Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
UFC	Unidade Formadora de Colônia
LB	Luria-Bertani
MR	Multiresistência
DNA	Acido desoxirribonucléico
Tn	Transposons
IS	Seqüência de inserção
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ATCC	American Type Culture Collection
UV	Luz ultravioleta
HU	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas de São Paulo
ER	Instituto de Infectologia Emilio Ribas
HBP	Hospita da Beneficência Portuguesa de São Paulo
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemoterapy Methodology

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Índice de resistência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no Brasil p. 04
- Tabela 2.** Primers para a identificação de genes ESBLs. p. 38
- Tabela 3.** Primers para a identificação de genes RNAr 16S p. 39
- Tabela 4.** Primers para a identificação e caracterização de integrons e seus genes cassette p. 41
- Tabela 5.** Perfil de resistência das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* p. 45
- Tabela 6.** Valores da Concentração inibitória mínima (CIM) de Ceftazidima, Aztreonam, Amicacina e Gentamicina do total de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* p. 47

Lista de quadros

- Quadro 1** Características dos principais grupos de beta-lactamases p. 16
- Quadro 2** Controles positivos para detecção dos genes *bla* e *rmtD* p. 40
- Quadro 3** Características clínicas dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* p. 44

Lista de figuras

- Figura 1** Disseminação dos grupos da enzima CTX-M pelo mundo. Adaptado de Cantón et al, 2006. p. 23
- Figura 2** Representação esquemática de integron de classe 1. p. 28
- Figura 3** Sinergismo positivo para a presença de ESBL em *Pseudomonas aeruginosa* p. 48
- Figura 4** Perfil de eletroforese dos isolados *bla*CTX-M positivos p. 49
- Figura 5** Perfil de eletroforese dos isolados *bla*OXA positivos p. 49
- Figura 6** Perfil de eletroforese do PCR multiplex p. 50
- Figura 7** Perfil de eletroforese do mapeamento de integron de classe 1 p. 51
- Figura 8** Representação esquemática dos integrons de classe 1 encontrados nas cepas de *Pseudomonas aeruginosa bla*CTX-M-2 positivas p. 52
- Figura 9** Similaridade genética das cepas de *pseudomonas aeruginosa bla*ESBL p. 53
- Figura 10** Representação esquemática da estrutura genética relacionada à aquisição de genes *bla*CTX-M. Adaptado de Poirel, 2008. p. 61

1) INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram negativo não fermentador da glicose que pode ser isolado do solo, da água, das plantas e mesmo dos animais (Trabulsi, 2008). Este microrganismo é versátil devido a sua baixa necessidade de nutrientes para o crescimento, sua tolerância a uma série de condições físicas adversas, sua resistência a agentes antimicrobianos e desinfetantes de uso habitual (Young *et al*, 1984).

Considerado oportunista, raramente é causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis, porém é um dos principais agentes de infecção em indivíduos com defesas diminuídas, prevalecendo nas infecções hospitalares. As infecções causadas por *P. aeruginosa* podem variar desde infecções superficiais da pele a septicemia grave, podendo causar infecção aguda pela produção de toxinas e infecção crônica pela ação da camada espessa que consiste no seu biofilme, e ainda, pode resultar no somatório dos tipos de infecção pela ação concomitante desses componentes.

Epidemiologicamente, no Brasil, entre os anos de 2003 e 2008, *Pseudomonas aeruginosa* foi a causa mais freqüente de infecções do trato respiratório, a segunda causa mais freqüente de infecções urinárias e infecções de ferida cirúrgica e o quinto patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea (Pfaller *et al*, 1998; Sader *et al*, 2004, Andrade *et al*, 2008).

A importância clínica de *P. aeruginosa* está baseada na sua erradicação difícil desde processos infecciosos e contínuos fracassos terapêuticos (Yoneda *et al.*, 2005). A espécie citada possui resistência natural às diversas classes de antibióticos e possui a habilidade de adquirir resistência cujos, mecanismos de resistência são expressos de

forma individual ou combinada. As opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por este microrganismo são, portanto, limitadas e incluem os beta-lactâmicos como penicilinas com atividade antipseudomonas, cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam, carbapenens, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Carmeli *et al*, 1999; Doi *et al*, 2006; Bassetti *et al*, 2008). Infelizmente, o amplo uso destes compostos tem selecionado um alto índice de resistência. O principal problema tem sido o constante aparecimento de cepas multirresistentes (MRS). Assim, o tratamento de escolha tem se baseado na atividade sinérgica da combinação aminoglicosídeo/beta-lactâmico, porém, no Brasil, os índices de resistência para ambos antibióticos têm aumentado drasticamente nos últimos anos, conforme mostrado em estudos multicêntricos, sejam do SENTRY, MISTYC, ou grupos de pesquisas independentes (Tabela 1).

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

Antibióticos	Resistência (%)						
	SENTRY BRASIL	Gales <i>et al.</i> , 2001	Barth <i>et al.</i> , 2001	Pellegrino <i>et al</i> , 2002	Zavascki <i>et al.</i> , 2004	MYSTIC BRASIL	SENTRY BRASIL
		Sader <i>et al.</i> , 2001				Kiffer <i>et al.</i> , 2005	Andrade <i>et al.</i> , 2008
Ceftazidima	34,3	37,4	40,5	36,5	48,7	36,0	30,9
Imipenem	30,2	28,0	30,2	38,3	58,9	36,6	26,3
Amicacina	30,5	29,9	37,9	35,6	57,6	33,8	28,7
Gentamicina	37,7	41,6	44,4	48,0	-	44,3	-

1.1 - Betalactamases de amplo espectro em *Pseudomonas aeruginosa*

Diferentes mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos são descritos em *Pseudomonas aeruginosa*: perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, conhecidas como porinas; hiperexpressão de bombas de efluxo; alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e produção de beta-lactamases intrínsecas e/ou adquiridas (Poirel *et al.*, 2000).

Na clínica, durante as últimas décadas, houve aumento do uso de cefalosporinas de última geração para o tratamento de infecções hospitalares e este acontecimento vem sendo acompanhado pelo aparecimento de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de beta-lactamases de amplo espectro, conhecidas como ESBLs (Carmeli *et al.*, 1998; Carmeli *et al.*, 1999; Castanheira *et al.*, 2004;). Amostras produtoras destas enzimas são resistentes às cefalosporinas de amplo espectro, como a ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e a outros agentes da classe dos beta-lactâmicos (Carmeli *et al.*, 1998; Carmeli *et al.* 1999)

As beta-lactamases são enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico dos antibióticos, desta maneira destroem o sítio ativo do antibiótico e impedem sua atividade. Caracterizam-se por sua capacidade de inibir determinados subgrupos de beta-lactâmicos e é por isso que algumas subclassificações as denominam penicilinases, cefalosporinases ou carbapenemases, dependendo da família de beta-lactâmicos que tenha maior suscetibilidade de ser atacada pela enzima. (Gales *et al.*, 2003; Lincopan *et al.*, 2005; Sader *et al.*, 2005). As ESBLs foram identificadas em membros da família *Enterobacteriaceae* desde a década de 1980, e recentemente vêm sendo descritas em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. As ESBLs encontradas em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* são as da classe A de Ambler, TEM e SHV, freqüentes em

membros das enterobactérias; PER, provenientes principalmente da Turquia; VEB, encontradas em amostras do sul da Ásia; GES e IBC originários da França, Grécia e Sul da África e a da classe D de Ambler, OXA (Nordman *et al*, 1998; Weldhagen *et al*, 2003). Devido aos genes que codificam estas enzimas terem sido encontrados em um número limitado de regiões geográficas, acredita-se que esses genes tenham um nicho ecológico específico (Waldhagen *et al*, 2003).

Estas enzimas são pouco relacionadas geneticamente, porém, compartilham características hidrolíticas similares. Entre elas, a mais comumente encontrada em *Pseudomonas aeruginosa* é a enzima do tipo OXA. Diferentemente das enzimas da classe A, este tipo é fracamente inibido pelo ácido clavulânico e é dificilmente identificada em laboratórios clínicos por meio de métodos de detecção fenotípica (Yan *et al*, 2006). Embora, a presença de ESBLs em *Pseudomonas aeruginosa* possa ser inferida pelo perfil fenotípico de resistência à ceftazidima, a sua confirmação por métodos convencionais de sinergismo, utilizando-se clavulanato e cefalosporinas de amplo espectro é afetada pelas características intrínsecas deste microrganismo (i.e., produção da enzima codificada por gene cromossômico AmpC) (Weldhagen *et al*, 2003). Assim, quando há suspeita de cepa produtora de ESBL, técnicas moleculares baseadas em PCR ou hibridação, poderiam ser mais apropriadas para confirmar o diagnóstico.

1.2 – Produção de metilases 16S RNAr em *Pseudomonas aeruginosa*

Aminoglicosídeos são produzidos por espécies de actinomicetos, as quais são intrinsecamente resistentes a estes metabólitos secundários produzidos. Assim como para os β -lactâmicos, a presença de enzimas também pode conferir resistência aos aminoglicosídeos. Diferentemente das β -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 por fosfotransferases (APH) ou *O*-adenilação, por nucleotidiltransferases (ANT) dependentes de ATP, ou mediante um processo de *N*-acetilação por acetiltransferases (AAC) dependentes de acetil CoA. Deste grupo de enzimas, denominadas AAC(6'), ANT(2''), e APH(3') têm sido as mais frequentemente descritas em isolados de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos como gentamicina, tobramicina, amicacina e neomicina (Doi *et al*, 2007).

Recentemente, foi descrito um novo mecanismo de resistência associada com a metilação sítio-específica do RNA ribossômico 16S, mediada por um novo grupo de enzimas conhecidas como metilases 16S RNAr. (Dói *et al.*, 2007). Até há pouco tempo acreditava-se que este mecanismo de resistência não existia em espécies clínicas relevantes, porém, em 2003 foram relatadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* que produziam metilases 16S RNAr (Galimand *et al*, 2003; Yokoyama *et al*,2003). Estas enzimas mostraram a capacidade de conferir um extraordinário nível de resistência a aminoglicosídeos, utilizados na clínica tais como amicacina, tobramicina e gentamicina (Doi *et al*, 2007)

A monoterapia com aminoglicosídeos como amicacina e gentamicina raramente é utilizada. Alguns protocolos recomendam para o tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* a combinação de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos para minimizar os riscos de falha terapêutica devido à emergência de resistência. Porém, foram relatadas cepas capazes de co-produzirem enzimas beta-lactamases de amplo espectro ou metalo-beta-lactamases, juntamente com a produção de metilases, ou seja, contribuindo para um fenótipo multidroga-resistente (Doi, 2006; Lincopan *et al.*, 2009). A emergência de cepas com essas características tem um grande impacto clínico tendo

em vista a escassez de terapias efetivas no tratamento de infecções causadas por este patógeno.

Em 2002, na Polônia, um gene que codificava uma metilase 16S RNAr, posteriormente designada como ArmA, foi depositado como parte da sequência de um plasmídeo de *Citrobacter freundii*. Em 2003, uma cepa resistente a aminoglicosídeos de *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada no Japão e descrita como produtora de metilase 16S RNAr. Esta nova enzima foi chamada de RmtA e mostrava uma semelhança de 35% com metilases 16S RNAr de vários actinomicetos, sugerindo que os genes são adquiridos horizontalmente de microrganismos não patogênicos. Também no Japão, foram identificadas as enzimas RmtB em *Serratia marcescens*, muito relacionada à RmtA, compartilhando 82% dos aminoácidos e RmtC em uma amostra de *Proteus mirabilis*. A metilase 16S RNAr mais recentemente encontrada foi a RmtD. Esta enzima foi encontrada em uma amostra clínica de *Pseudomonas aeruginosa* do Brasil que também produzia a metalo-beta-lactamase SPM-1. Esta cepa era fortemente resistente a carbapens assim como a aminoglicosídeos (Dói, 2006).

Todos os genes das metilases 16S RNAr até hoje descritos estão associados com elementos genéticos móveis, como os transposons, aumentando a sua capacidade de disseminação horizontal intra e inter espécies. Além do mais, estes microrganismos têm mostrado uma alta capacidade de desenvolver resistência à múltiplas classes de antimicrobianos, especialmente pela aquisição de vários genes codificadoras de beta-lactamases. Estudos realizados em um hospital universitário de Taiwan mostraram que entre 35 isolados clínicos positivos para as metilases 16S RNAr ArmA e RmtB, 33 produziam também as beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) CTX-M ou SHV. Observações semelhantes também foram feitas na Coreia do Sul. Como citado anteriormente, a primeira metilase 16S RNAr RmtD, descrita no Brasil, foi identificada

em uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que também produzia a metalo-beta-lactamase SPM-1 (Doi *et al*, 2006; Doi *et al*, 2007a; Doi *et al*, 2007b; Yamane *et al*, 2007; Yamane *et al*, 2008)

2.) Revisão da Literatura

2.1. Características de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram negativo não fermentador da glicose, aeróbio estrito, não formador de esporos e móvel que pode ser isolado do solo da água, das plantas e mesmo dos animais, incluindo os seres humanos (Trabulsi *et al*, 2006). No ambiente hospitalar colonizam pias, torneiras, soluções anti-sépticas (desinfetantes e de uso terapêutico) e equipamentos respiratórios que lhe servem de reservatório devido à sua habilidade de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos (Iglewski, 1996; Moolenaar *et al.*, 2000). Fatores como a habilidade de utilizar uma grande variedade de substratos orgânicos como fontes de carbono, a habilidade de colonizar nichos ecológicos diversos, e a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos contribuem para as características apresentadas pelas amostras de *P. aeruginosa* (Pollack, 1984).

P. aeruginosa é facilmente reconhecida nos meios de isolamento primário com base na sua morfologia colonial característica, produção de pigmento e odor adocicado semelhante ao de uvas. As colônias são geralmente planas e espalhadas com bordas irregulares e brilho metálico. Podem apresentar-se com outras morfologias, incluindo lisas, mucóides e anãs (Blondel-Hill *et al.*, 2007).

Esse microrganismo produz várias substâncias que podem contribuir para aumentar a colonização e infecção do tecido hospedeiro. Uma variedade de fatores de virulência incluindo lipopolissacarídeos (LPS), exotoxina A, leucocidina, alginato, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas, fazem de *P. aeruginosa* a bactéria de maior significância clínica entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (Win, Jr. *et al.*, 2006).

Conhecida há muitos anos por ser causadora de infecções cirúrgicas e de ferimentos graves, geralmente, considerada um invasor secundário ou oportunista e não causa de infecções primárias em tecidos saudáveis. *P. aeruginosa* tem emergido como um dos principais patógenos nosocomiais em imunocomprometidos e pacientes debilitados, bem como em pacientes com fibrose cística (Pier *et al.*, 2005). Os dados do programa SENTRY mostraram que, no Brasil, *P. aeruginosa* foi o patógeno mais freqüente em isolados de pneumonia hospitalar, o segundo em infecções do trato urinário e infecções de ferida cirúrgica e o sétimo patógeno mais freqüente em infecções da corrente sangüínea, nos hospitais avaliados pelo programa (Sader *et al.*, 2001). Foi considerado também o segundo patógeno mais freqüente em infecções de pacientes queimados (Santucci *et al.*, 2003). A alta incidência de *P. aeruginosa* pode ser atribuída a diversas propriedades como a fácil adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade, e a sua capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos (Favero *et al.*, 1971).

2.2. Resistência aos Beta-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*

O aumento da resistência aos antimicrobianos entre as bactérias Gram negativas é um exemplo notável de como as bactérias podem manter e expressar novas informações genéticas que conferem resistência a uma ou a várias drogas (WALSH *et al.*, 2005). A alta resistência de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos e desinfetantes,

resultante de mecanismos intrínsecos e adquiridos, tornou bastante limitada a possibilidade de escolha de agentes efetivos para tratar estas infecções (Hancock, 1998). Um grupo importante de antimicrobianos que atua na síntese da parede celular é o grupo dos beta-lactâmicos, que constituem uma família de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico heterocíclico azetidiona denominado anel betalactâmico, responsável pela atividade antimicrobiana desses compostos (Livermore, 1995). Ao grupo dos betalactâmicos pertencem duas das mais importantes classes de antibióticos: as penicilinas e as cefalosporinas. Entre os últimos antibióticos beta-lactâmicos descritos destacam-se as cefamicinas e os carbapenêmicos (Hancock, 1998).

Diferentes mecanismos de resistência aos betalactâmicos são descritos em *Pseudomonas aeruginosa*, como: perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa (porinas), alteração nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs, penicillin-binding proteins), super expressão de bombas de efluxo, ou ainda, produção de enzimas beta-lactamases.

As proteínas de membrana externa dos microrganismos Gram-negativos, também chamadas de porinas, são proteínas capazes de formar canais constituídos de água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1994). A perda ou a diminuição da expressão dos genes que codificam as OMPs causam a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do antimicrobiano, o que pode conferir resistência aos betalactâmicos (Quinn *et al*, 1988).

As proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) são carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática que atuam catalisando a transpeptidação entre duas subunidades de mureína na etapa de estruturação do peptidoglicano, constituinte essencial da parede celular bacteriana. (Spratt *et al*, 1988). As PBPs são os sítios-alvo

para a atividade dos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos. Estes ligam-se covalentemente às PBPs impedindo a formação da parede celular e causando a lise osmótica da célula. A resistência aos beta-lactâmicos, devido a alterações nas PBPs, é mais comum em microrganismos Gram-positivos que em Gram-negativos (Lincopan & Mamizuka, 2007).

As bombas de efluxo são complexos enzimáticos de membrana que expulsam da célula detergentes, as substâncias anfipáticas que poderiam destruir a bactéria. Estes sistemas ativos de expulsão são os responsáveis pela “impermeabilidade” à maioria dos antibióticos (Li *et al.*, 2000; Piddock, 2006). Os genes que codificam as bombas de efluxo são constituintes normais do genoma bacteriano e, portanto, fornecem para o microrganismo o potencial intrínseco de desenvolver um fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos sem a aquisição de novos genes (Hasdemir *et al.*, 2004). Esses sistemas de efluxo contribuem para a resistência intrínseca e adquirida de *Pseudomonas aeruginosa* através da extrusão de vários antimicrobianos como tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, eritromicina e betalactâmicos (Li *et al.*, 1994). Alguns desses sistemas conferem também resistência a compostos quaternários de amônio e desinfetantes (Nikaido, 1998). A energia para este transporte é obtida através do gradiente de prótons presentes na membrana externa.

Dentre os diferentes mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*, a produção de enzima beta-lactamases é o mecanismo prevalente e mais importante (Laraki *et al.*, 1999). Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens podem ser hidrolisados por este grupo de enzimas, e a interação entre essas enzimas e seus substratos resulta em compostos inativos que permitem a sobrevivência da célula bacteriana (Bush, 2001).

2.3. Produção de Beta-lactamases em *Pseudomonas aeruginosa*

Entre as amostras de *P. aeruginosa*, a produção aumentada de AmpC, as ESBLs e as metalo-beta-lactamases desempenham papéis importantes na resistência à antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por este agente. (Jacoby *et al*, 2005).

Diferentes tipos de beta-lactamases foram descritos e inúmeras tentativas de estabelecer um sistema de classificação para estas enzimas foram propostas ao longo dos anos. Os sistemas mais utilizados hoje para classificar estas enzimas beta-lactamases são os de Ambler e o de Bush.

Segundo o esquema de Ambler, as ESBLs podem ser divididas em 4 classes evolucionárias distintas: A) Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), penicilinases e carbenicilinases; B) metalo-beta-lactamases; C) cefalosporinases cromossomais e; D) oxacilinases. As beta-lactamases SHV- e TEM- são pertencentes à classe A, Já as OXA- derivadas são pertencentes à classe D (oxacilinases). Ambas classes possuem uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo. (Ambler *et al*, 1991).

O esquema de Bush classifica as enzimas segundo o perfil do substrato e características físicas como peso molecular e ponto isoelétrico. Neste, as ESBLs são divididas em dois subgrupos: 2be (TEM- e SHV-) e 2d (OXA-). Em geral, estes dois subgrupos são inibidos pelo ácido clavulânico (Bush, 1995).

No quadro 1 estão apresentadas as características funcionais e moleculares dos principais grupos de beta-lactamases (adaptado de Bush, 2001)

2.4. Beta-lactamases de espectro ampliado - ESBL

As beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs) pertencem em sua maioria à classe A de AMBLER e estão distribuídas no grupo 2 de BUSH-JACOBY-MEDEIROS. São inibidas pelo ácido clavulânico e conferem resistência a diversas cefalosporinas de amplo espectro. Desde o início da década de 1980 essas enzimas passaram a ser frequentemente identificadas em membros da família das Enterobacteriáceas, no entanto apenas recentemente as ESBLs vêm sendo descritas em amostras de *P. aeruginosa* (Medeiros, 1997; Celenza *et al* 2006; Picão *et al* 2009).

Primeiramente descritas na Alemanha e na França entre o gênero *Klebsiella*, as ESBLs existem em todas as regiões do globo e disseminado entre as enterobactérias e, mais atualmente em membros do grupo dos não fermentadores. A enzima CTX-M é hoje a mais encontrada em enterobactérias, enquanto as enzimas dos tipos PER e OXA são mais comuns em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* Novas enzimas estão sendo descobertas e, por enquanto, estas parecem possuir um nicho, restrito a apenas algumas regiões do globo (Livermore, 1995; Bush, 2001; Shah, 2002; Rodriguez-Bano, 2004; Helfand, 2006).

Quadro 1 - Características dos principais grupos de beta-lactamases.

Classificação de BUSH -JACOBY-MEDEIROS, 1995	Classificação de AMBLER, 1989	Características funcionais
Grupo Funcional	Classe Molecular	
1	C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais dos Gram-negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto carbapenens. Não são inibidas pelo ácido clavulânico
2	A, D	Grande maioria das enzimas; inibidas por ácido clavulânico
2a	A	Penicilinasas produzidas por <i>Staphylococcus spp.</i> e <i>Enterococcus spp.</i> Conferem altos níveis de resistência às penicilinas
2b	A	Beta-lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram-negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1
2be	A	Beta-lactamases de espectro ampliado conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos
2br	A	Beta-lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de B-lactamases (IRT)
2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina
2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); pouco inibidas pelo ácido clavulânico
2e	A	Cefalosporinasas inibidas pelo ácido clavulânico
2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico
3	B	Metallo-beta-lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico
4	Não Determinada	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos

Adaptado de Bush, 2001

A maioria das ESBLs são derivadas das enzimas TEM e SHV. Existem mais de 150 tipos de enzimas derivadas da beta-lactamase TEM e mais de 100 tipos derivadas de SHV (<http://www.lahey.org/studies/>). Em ambos os grupos de enzimas, algum ponto de mutação no gene, leva a um fenótipo de espectro ampliado (Jaccoby, 1991; Bush *et al*, 1995).

2.4.1. Enzimas do tipo TEM

TEM-1 é a beta-lactamase mais encontrada nas bactérias Gram-negativas. Mais de 90% da resistência a ampicilina em *E. coli* é relacionada à produção de TEM-1. TEM-1 é capaz de hidrolizar penicilinas e cefalosporinas de 1º geração. TEM-2, a primeira derivada de TEM-1, difere da original por uma simples substituição de aminoácidos, porém, não capaz de alterar o perfil do substrato. TEM-3 é conhecida por ser a primeira beta-lactamase a apresentar o fenótipo ESBL. Nos anos posteriores, mais de 90 enzimas derivadas de TEM foram descritas, a maioria com fenótipo ESBL (Livermore, 1995; Braddford, 2001).

As combinações de substituições de aminoácidos que ocorrem na enzima TEM, resultam em alterações do fenótipo, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas como ceftazidima e cefotaxima. (Mugnier *et al*, 1996; Marchandin *et al*, 2000).

Um estudo de vigilância na França indica que menos de 2% do total de isolados de *P.aeruginosa* são produtores de beta-lactamases do tipo TEM (Weldhagen *et al* 2003, Braddford *et al*, 2001)

2.4.2. Enzimas do tipo SHV

As enzimas beta-lactamases do tipo SHV são mais comumente encontradas em *Klebsiella pneumoniae* e está ligada a mais de 20% da resistência a ampicilina, mediada por plasmídeos encontrados nesta espécie. Em muitas cepas de *K.pneumoniae*, o gene bla_{SHV-1} está integrado no cromossomo bacteriano. Embora tenha sido sugerido que o gene que codifica SHV-1 possa existir como parte de um elemento de transposição, isto nunca foi provado. Diferente das enzimas do tipo TEM, existem poucos derivados das enzimas do tipo SHV. A maioria das variantes SHV que possuem fenótipo ESBL é caracterizada por uma substituição de uma serina por uma glicina na posição 238. Esta substituição é crítica para a eficiente hidrólise da ceftazidima (Jacoby *et al*, 1991; Poirel *et al*, 2004; Braddford *et al*, 2001).

As enzimas do tipo SHV foram identificadas em poucos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. A SHV-2 foi encontrada na França e, SHV-5 e SHV-12 foram encontradas na Tailândia. Estes isolados eram, em sua maioria, isolados nosocomiais. (Naas *et al*, 1999; Yan *et al*, 2001; Poirel *et al*, 2004). A análise das sequências de DNA adjacente ao gene que codifica SHV-2 encontrado em *Pseudomonas aeruginosa* revelou sequências idênticas às aquelas encontradas em um plasmídeo de *Klebsiella pneumoniae*, sugerindo que os genes que codificam estas enzimas podem ser transferidos geneticamente de membros da família Enterobacteriaceae, para isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto, esse evento deve ocorrer com baixa frequência, devido à possível incompatibilidade para a conjugação e replicação plasmidial entre os diferentes gêneros (Naas *et al*, 1999)

2.4.3. Enzima do tipo PER

O grupo PER de enzimas compreende as enzimas PER 1, PER 2 e PER 3. A primeira enzima TEM-1 foi identificada na Turquia em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos subseqüentes mostraram que *bla*PER-1 estava amplamente disseminado na Turquia e foi identificado em vários isolados de *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (Vahaboglu *et al.*, 1997). É possível que a disseminação de PER-1 esteja relacionada com a imigração de pessoas provenientes da Turquia para outras regiões do mundo. (Weldhagen *et al.*, 2003).

2.4.4. Enzimas do tipo GES

A enzima GES-1 foi inicialmente identificada de uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* isolada no ano de 1998 (Poirel *et al.*, 2000). Essa beta-lactamase foi caracterizada de uma amostra coletada de um paciente proveniente da Guiana Francesa. Posteriormente, GES-1 também foi encontrado em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em outro hospital da França (Dubois *et al.*, 2002). No ano de 2002, um surto de amostras *K. pneumoniae* produtoras de GES-1 foi detectado em Lisboa, Portugal (Duarte *et al.*, 2003). Vinte e quatro isolados recuperados de diferentes sítios foram identificados como produtores de GES-1, e o gene que codifica essa enzima foi encontrado em plasmídios de diversos tamanhos.

A enzima GES-1 difere em dois aminoácidos da enzima denominada IBC-1 caracterizada em amostras de *Enterobacter cloacae* isoladas na Grécia e difere em apenas um aminoácido de IBC-2, identificada em amostras isoladas no mesmo país (Giakkoupi *et al.*, 2004, Mavroidi *et al.*, 2001).

Em 2001, uma nova variante de GES-1 foi relatada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na África do Sul (Poirel et al., 2001 b). A enzima GES-2 possuía uma única alteração de aminoácido quando comparada a GES-1, no entanto, essa alteração ampliou o espectro de atividade da enzima que mostrava atividade catalítica contra imipenem, além das cefalosporinas de amplo espectro. A análise cinética de GES-2 mostrou uma eficiência catalítica contra imipenem 100 vezes maior do que a GES-1. Entretanto, a atividade da GES-2 permanece 1000 vezes menor do que outras carbapenemases como SME-1 e NMC-A.

Recentemente, novas variantes de GES foram relatadas em amostras de *K. pneumoniae* isoladas no Japão (Wachino et al., 2004a, Wachino et al., 2004b). A GES-3 foi isolada de amostras responsáveis por um surto em uma UTI neonatal, e a GES-4 foi isolada de um neonato internado nessa mesma unidade. GES-4, assim como a GES-2 apresentaram níveis intermediários de resistência à imipenem quando expressa em uma linhagem de *E. coli* hospedeira.

Recentemente foram isoladas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae* que carregavam *bla*GES-1 e *bla*GES-7, relatadas no Brasil respectivamente, por Castanheira et al., 2006 e Dropa et al., 2009 .

2.4.5. Enzimas do tipo OXA

As enzimas do tipo OXA compõem outra família de ESBL em expansão. Essas enzimas diferem das enzimas do tipo TEM e SHV, por pertencerem à família molecular D e grupo funcional 2d, que conferem resistência a ampicilina e cefalotina, além de serem caracterizadas por sua elevada atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina, e reduzida inibição pelo ácido clavulânico. São encontradas principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*.

As ESBL do tipo OXA originaram-se a partir de mutações em OXA-10. Estas conferem fraca resistência à oximino-cefalosporinas quando clonadas em *Escherichia coli*; porém, conferem altos níveis de resistência em transconjugantes de *Pseudomonas aeruginosa*. Em contraste com a maioria das enzimas OXA, que conferem maior resistência a ceftazidima, o tipo OXA-17 confere resistência a cefotaxima e ceftriaxona, e apenas pequena redução da sensibilidade a ceftazidima. (Bradford *et al* 2001)

2.4.6. Enzimas do Grupo VEB

A ESBL do grupo VEB-1 foi primeiramente caracterizada em um isolado de *Escherichia coli* de uma criança transferida do Vietnã para um hospital na França (Naas *et al.*, 2000). Posteriormente, VEB-1 foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* de dois pacientes da Tailândia, também transferidos para a França (Girlich *et al.*, 2001). Um estudo realizado em um hospital universitário da Tailândia revelou que 93% das amostras de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima isoladas nessa instituição eram produtoras de VEB-1.

Além de amostras de *P. aeruginosa*, *bla*VEB foi encontrado em amostras de enterobactérias resistentes à ceftazidima isoladas no mesmo hospital. Durante esse mesmo estudo, uma variante de *bla*VEB-1 foi identificada e o novo gene foi denominado *bla*VEB-2. A proteína codificada por esse gene tem apenas uma alteração de aminoácido localizada fora do sítio ativo da enzima, quando comparada a VEB-1. No Kuwait, amostras de *P. aeruginosa* produtoras de VEB-1 foram identificadas e, dentre as amostras avaliadas foram identificadas variantes de *bla*VEB-1, que possuem alterações de um único nucleotídeo, não gerando alteração da proteína final. Essas variantes foram denominadas *bla*VEB-1 a e *bla*VEB-1 b (Poirel *et al.*, 2001).

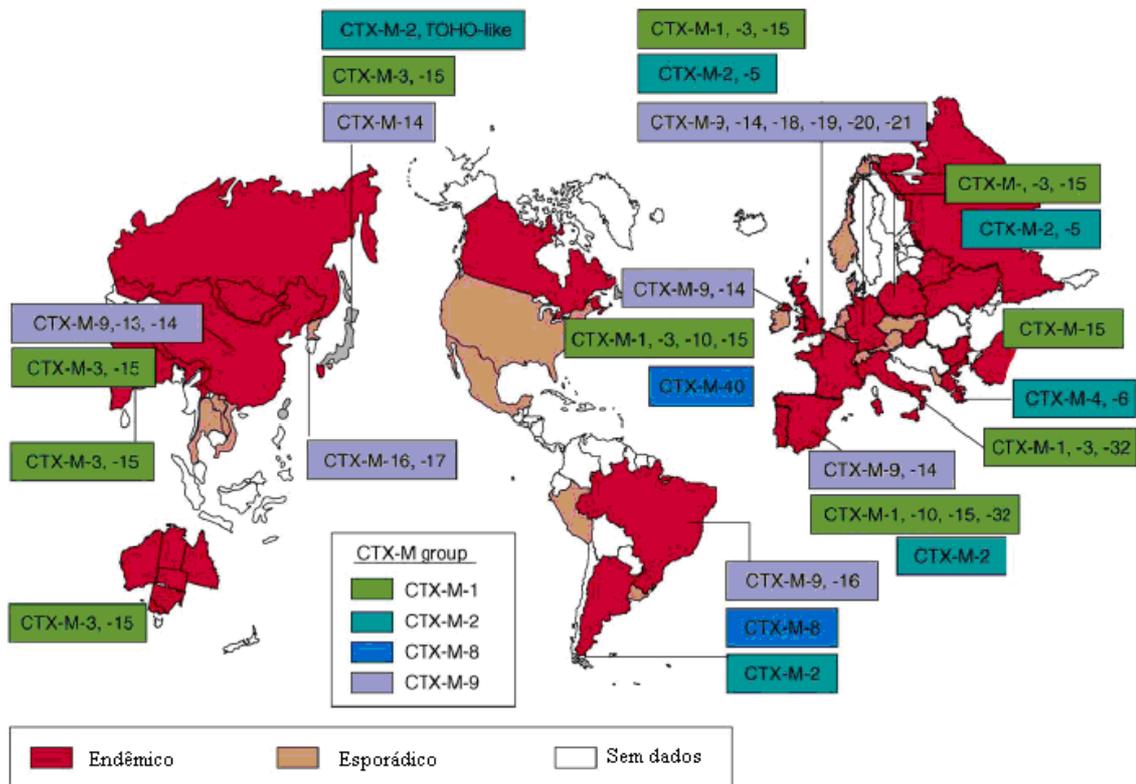
2.4.7. Enzimas do tipo CTX-M

Nos últimos anos, tem sido encontrada uma nova família de ESBLs mediadas por plasmídios, chamada CTX-M, que hidrolisa preferencialmente cefotaxima. Sua primeira descrição ocorreu em 1990, em uma cepa de *Escherichia coli* (Bauernfeind *et al.*, 1990) e logo depois, em *Salmonella enterica serovar typhimurium* (Bauernfeind *et al.*, 1992), tendo rápida expansão. É relatada como tipo predominante na América do Sul (Livermore e Brown, 2001; Bonnet 2004), inclusive no Brasil (Bonnet *et al.*, 2000). Foi descrita em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* em Taiwan (WU *et al.*, 2003) e na Itália, foi detectada no mesmo período em *Proteus vulgaris* (Pagani *et al.*, 2003). Já foi encontrada também em *Citrobacter freundii* na Polônia (Gniadkowski *et al.*, 1998) e em outras espécies de Enterobactérias, ocorrendo na Europa, África, Ásia, América do Sul e mais recentemente na América do Norte (Bonnet, 2004). Muito recentemente foi descrito em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* na Holanda, Bolívia e no Brasil. (Al *et al.*, 2006; Celenza *et al.*, 2006; Picão 2009).

Essas enzimas não foram ainda relatadas como TEM e SHV, e apresentam 40% de homologia com as mesmas, podendo ter origem evolucionária em enzimas do tipo AmpC cromossômicas de *Kluyvera ascorbata*, com as quais apresentam alta homologia (Humeniuk *et al.*, 2002). Estudos filogenéticos dessa família mostram que existem cinco grandes grupos baseados em suas seqüências de aminoácidos. O grupo I inclui CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-10 a 12; CTX-M-15; CTX-M-22; CTXM-23 e CTX-M-28 a 30. O grupo 2 CTX-M-2; CTX-M-4 a 7; CTX-M-20 e Toho-1. O grupo III inclui CTX-M-8, o grupo IV CTX-M-9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-16; CTX-M-19; CTX-M-21; CTM-X-27 e Toho-2 e o grupo V CTX-M-25 e 26 (Thompson, Higgins e Gibson, 1994). A figura 1 mostra como as enzimas CTX-M estão disseminadas pelo mundo em membros da família *Enterobacteriaceae*. Os membros do mesmo grupo

exibem similaridade maior que 94% entre suas seqüências de aminoácidos, enquanto entre grupos diferentes a semelhança é menor que 90%. A distância evolucionária entre os grupos pode supor evolução a partir de ancestrais diferentes (Bonnet,2004).

Estudos cinéticos mostram que enzimas do tipo CTX-M hidrolisam cefalotina ou cefaloridina melhor que benzil-penicilina, e possuem maior afinidade por cefotaxima que por ceftazidima. A CIM para ceftazidima varia entre 0,5 a 2 µg/mL, enquanto a CIM da cefotaxima varia de 8 a 256 µg/mL, existindo alguma hidrólise da ceftazidima mas não suficiente para conferir resistência aos produtores destas enzimas. Tais enzimas são inibidas por tazobactam mais eficientemente do que por sulbactam ou clavulonato (Matsumoto e Inoue, 1999; Péduzzi *et al.*, 1997).



Adaptado de Cantón *et al.*, 2006

Figura 1. Disseminação dos grupos da enzima CTX-M pelo mundo em 2006.

2.5. Detecção de beta-lactamases de espectro ampliado

Identificar organismos que são produtores de ESBLs pode ser um grande desafio. Alguns métodos têm sido propostos, baseados na interferência dos inibidores de beta-lactamases na produção de ESBL (Jiang, 2006).

Existem cefalosporinas com diversa habilidade de detectar enzima ESBL que está relacionada com a presença do tipo predominante da enzima em diferentes regiões do mundo. Isso demonstra a importância de se adaptar os testes de detecção de ESBL para determinadas áreas geográficas, hospitais e gêneros bacterianos particulares. Além disso, esses testes devem ser avaliados periodicamente, monitorando assim a introdução de novas enzimas que inativam antibióticos (Navon-Venezia *et al.*, 2003).

Segundo a CLSI, os antibióticos ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima e aztreonam devem ser utilizados como “marcadores” da possível presença de ESBLs, sendo a confirmação feita por meio de disco combinado. Há recomendação do CLSI para que testes de triagem e confirmação sejam realizados rotineiramente para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, consideradas produtoras clássicas destas enzimas, além de *Proteus mirabilis*. Além dos testes recomendados pelo CLSI, existem outras padronizações que podem ser empregadas na pesquisa fenotípica de ESBL em isolados bacterianos, entre elas a British Society for Antimicrobial Chemotherapy Methodology (BSAC). Segundo esta regulamentação, é possível pesquisar tais enzimas em outros membros da família *Enterobacteriaceae*, abrangendo microrganismos que não são contemplados pelo CLSI (Andrews, 2007).

Esta primeira triagem pode ser feita durante a realização do antibiograma de rotina. O consenso geral preconiza que organismos produtores de ESBL devem ser relatados como resistentes a todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (Livermore, 1995; Bradford, 2001; CLSI, 2007).

Muitos estudos têm relatado erros na detecção de ESBL. Uma das razões é que muitos microrganismos produtores destas enzimas possuem, *in vitro*, valores de concentração inibitória mínima abaixo dos "breakpoints" sugeridos (Bradford, 2001). Além disso, a diminuição da permeabilidade da bactéria aos antimicrobianos e a produção de outras enzimas beta-lactamases, em especial as induzíveis, de origem cromossômica presentes em várias espécies, podem mascarar a presença de ESBLs (Varela *et al.*, 2001; Schwaber *et al.*, 2004; Thomson, 2001).

Em *Pseudomonas aeruginosa* a produção de betactamases AmpC é um fenômeno constitutivo, e vários estudos têm mostrado a emergência da produção destas enzimas em membros da Família *Enterobacteriaceae*. Não detectar ESBLs nestes patógenos pode ter um impacto significativo aos pacientes, especialmente naqueles tratados com cefalosporinas de espectro ampliado (Medeiros, 1997; Bradford, 2001; Paterson, 2005; CLSI, 2007; Helfand, 2006; Perez, 2007).

2.6) Medidas de controle

O controle do uso de antimicrobianos pode reduzir a pressão seletiva, contribuindo para a redução da incidência de cepas produtoras de ESBLs. Uma forte correlação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração, como a ceftazidima, e a resistência aos antimicrobianos em *Klebsiella pneumoniae*, tem sido repetidamente demonstrada. Além disso, um declínio na prevalência de *K. pneumoniae* produtores de ESBL tem sido documentado em instituições que racionalizaram o uso de outras drogas de amplo espectro (Patterson, 2001).

Outro problema está relacionado ao aumento do uso de imipenem, sugerido como melhor opção terapêutica em infecções por bactérias produtoras da enzima ESBL em hospitais da América Latina.. Esta ação, porém, tem aumentado a incidência de

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter spp* resistentes a esse antibiótico (Sader *et al.*, 2003)

Alguns estudos mostram que o controle do uso dos antimicrobianos e a implementação de medidas de controle de infecções diminuem substancialmente a frequência de isolamento de bactérias produtoras de ESBL (Patterson, 2005).

2.7) Disseminação horizontal de genes de ESBL

Diversos fatores contribuem para o êxito das bactérias produtoras de ESBL, como determinantes de resistência, no entanto a grande capacidade de disseminação dos genes que codificam essa beta-lactamase mostram que esse é um problema contemporâneo, de grande importância e que aumenta as preocupações com o uso indiscriminado de antibióticos no ambiente hospitalar (Spencer *et al.*, 2001). A habilidade dos bacilos Gram-negativos de adquirir genes de resistência aos antimicrobianos e, subsequentemente, disseminá-los para inúmeras espécies bacterianas é plenamente explicada pela transferência de plasmídios, transposons e integrons. Os genes de resistência presentes em elementos móveis como transposons e/ou integrons podem ser transferidos para diversos plasmídios e, uma vez presente nos plasmídios, podem ser transferidos de uma bactéria para outra sendo assim disseminados (Recchia & Hall, 1997).

2.7.1.Elementos genéticos móveis

Os plasmídios são responsáveis pela disseminação de muitas beta-lactamases, no entanto, os genes que codificam essas enzimas encontram-se inseridos em integrons, os quais frequentemente contêm outros genes que conferem resistência a

uma variedade de antibióticos. Por essa razão, as beta-lactamases são usualmente produzidas por organismos que também são resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos (Jacoby & Munoz-Price, 2005). A maioria das ESBLs de *P. aeruginosa* estão associadas à integrons, assim como inúmeros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol entre outros. (Poirel *et al*, 2002)

Os integrons são unidades genéticas que incluem componentes para um sistema de recombinação sítio-específica capazes de capturar e mobilizar genes contidos em elementos móveis chamados de genes cassetes. O integron também contém um promotor para a expressão dos genes cassetes (Bennett, 1999, Collis & Hall, 1995). Os componentes essenciais do integron são um gene “int” que codifica uma recombinase sítio-específica, pertencente à família das integrases e um sítio, adjacente a esse gene, de reconhecimento e ligação, chamado *attI* (Collis & Hall, 1995). O gene que codifica a integrase, incluindo o sítio de ligação *attI* é conhecido como sequência conservada 5' (5'-CS). O *attI* é reconhecido pela integrase e funciona como um sítio receptor para os genes cassetes (Partridge *et al.*, 2000).

Os genes cassetes são elementos não-replicantes e incluem um gene que pode codificar resistência aos antimicrobianos e um sítio de recombinação integrase-específico, membro da família de sítios conhecida como elementos de 59 bases (59-be). Genes cassetes podem existir tanto em sua forma livre circular ou podem estar integrados a um sítio *attI*. Somente quando integrados os genes cassetes são considerados formalmente parte de um integron (Collis *et al.*, 1993, Partridge *et al.*, 2000). Um único evento de recombinação genética, envolvendo o sítio associado à integrase *attI* e um cassete associado ao 59-be, levam à inserção de genes cassetes em um integron receptor. A integrase pode catalisar eventos de recombinação do *attI* e o

59-be do gene cassette e também eventos de recombinação entre duas unidades de 59-be (uma no cassete a ser integrado e outra num gene cassette que já faz parte do integron), no entanto um estudo revelou que a integrase tem preferência pelo primeiro tipo de ligação descrita, entre o *attI* e o 59-be (Collis & Hall, 1992, Partridge *et al.*, 2000). A integrase também catalisa eventos de recombinação que levam à excisão de genes cassetes, ocasionando a perda dos mesmos e gerando um cassete circular livre. Devido à habilidade de adquirir novos genes, os integrons têm um importante papel na evolução de genomas de plasmídios e transposons que os contêm (Collis & Hall, 1992).

Os integrons podem ser agrupados em dez diferentes classes, de acordo com a estrutura da integrase, mas apenas cinco dessas classes estão associadas a genes de resistência aos antimicrobianos. Contudo a maioria dos integrons que contém genes de resistência aos antimicrobianos, e, portanto também os genes que codificam as beta-lactamases, pertencem à classe 1 (Correia *et al.*, 2003). Os integrons da classe 1 (figura 2) possuem a 5'-CS, característica desses elementos, e adicionalmente, na extremidade 3', está acomodado um gene o qual codifica resistência a compostos de amônio quaternário denominado *qacEΔ1*, truncado ao gene que codifica resistência à sulfonamida sul 1. Essa extremidade, que também é conservada nos integrons da classe 1, é conhecida como 3'-CS. A inserção de genes cassetes entre as sequências conservadas 5' e 3' dá origem a novos integrons.

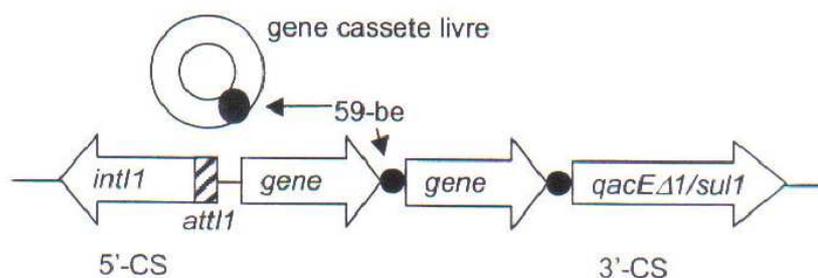


Figura 2. Representação esquemática de integron de classe 1.

2.7.2. Ambiente genético de ESBLs

A análise do suporte genético como suporte para a origem, aquisição e disseminação das ESBLs mostra uma variedade de elementos genéticos. Estes elementos genéticos têm o potencial para uma rápida e eficiente disseminação entre várias espécies de bactérias. Alguns mecanismos movimentam os genes de maneira fácil e simples, outros possuem formas mais complexas para exercer esta função. Muitas destas estruturas podem levar a um perfil de multidroga resistência aos antibióticos, mas algumas estão relacionadas com simples marcadores de resistência. Todos estes elementos fazem da análise do suporte genético um processo muito complexo, mas estudá-los em conjunto com os genes codificadores de ESBLs é uma ferramenta perfeita para entendermos melhor como ocorre a disseminação dos genes de resistência e os fatores que podem estar relacionados a sua emergência ou expressão (Poirel *et al*, 2008). A disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} é um problema atual quando comparado com a disseminação dos genes *bla*_{TEM} ou *bla*_{SHV}. Diferentes elementos genéticos podem estar envolvidos, como as sequências de inserção ISEcp1 e ISCR1 e também elementos relacionados aos fagos.

A sequência de inserção ISEcp1 tem sido identificada em associação com genes que codificam as enzimas CTX-M 1, CTX-M 2 e CTX-M 9. Esta mobilização ocorre com um processo peculiar de transposição, no qual sequências são mobilizadas por transposição, após o reconhecimento de uma variedade de sequências repetidas e invertidas de DNA conhecidas como *right inverted repeats* (IRRs) (Poirel *et al*, 2003). Algumas destas estruturas têm um papel de promotor. Por exemplo, ISEcp1 aumenta a expressão de *bla*_{CTX-M} quando localizada em um plasmídeo.

Um outro mecanismo de aquisição de genes *bla*_{CTX-M} está relacionada ao processo de transposição mediada por sequência de inserção chamada de Rolling-circle (RC) (Toleman *et al*, 2006 a e b) Alguns genes *bla*_{CTX-M} ocorrem em integrons tipo *sul1* que correspondem ao integron classe 1 ligado a sua extremidade 3' pelo gene da fase aberta de leitura *orf 513* e uma duplicação do segmento *quacE1/sul1*. Nesta situação, o gene *bla*_{CTX-M} não está presente como gene cassete mas está localizado na leitura abaixo (*downstream*) do gene *orf 513*, entre as duas sequências repetidas de *quacE1/sul1*. O gene *orf 513* foi primeiramente descrito como parte da chamada região comum - *common region* (CR1). Hoje, esta região é reconhecida como um elemento de inserção ISCR1 que pertence à família IS91 e ORF513 que é uma transposase que compartilha características estruturais e funcionais da família das transposases IS91-like ISCR1. Este pode mobilizar genes quando se transpõem primeiramente em uma região adjacente ao mesmo em seguida se transpondo novamente, mas de forma aberrante, mobilizando toda a sequência para um plasmídeo conjugativo. A formação do integron tipo *sul1* pode ter sido consequência de um processo que recombinau dois elementos ISCR1(Toleman *et al*, 2006b).

3- JUSTIFICATIVA

Por vários anos as cefalosporinas de terceira geração como a ceftazidima e aminoglicosídeos tais como amicacina e gentamicina, têm sido usadas no Brasil e, consideradas como antibióticos de primeira escolha no tratamento de infecções graves causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente no seu uso combinado, o qual exibe atividade sinérgica. Embora em nosso país, dados epidemiológicos do SENTRY e MYSTIC tenham mostrado um alto índice de resistência às cefalosporinas de última geração em amostras clínicas de *P. aeruginosa*, isoladas de diferentes hospitais brasileiros, não há informação sobre os mecanismos moleculares de resistência, seus determinantes genéticos e sua mobilização. Por outro lado, pesquisas sobre a produção de metilases RNAr 16S associada a resistência a aminoglicosídeos, tem sido direcionada apenas à identificação do gene *rmtD*, exclusivamente em isolados produtores de metalo beta lactamases- MBL, não se conhecendo assim a prevalência real das metilases RNAr 16S em demais isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

A emergência de isolados clínicos co-resistentes a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos tem comprometido o tratamento atual da infecção por *P. aeruginosa*. Para este tipo de isolados, os carbapenens têm sido usados como última alternativa terapêutica, porém seu uso intenso tem favorecido o aparecimento e disseminação de isolados produtores de MBL.

A identificação destes determinantes de resistência contribuirá no estabelecimento de medidas epidemiológicas mais efetivas que permitam controlar a disseminação deste tipo de isolado, evitando o possível o surgimento de freqüentes surtos, estimulando o uso racional de antibióticos.

4) OBJETIVOS

- 4.1) Identificar a produção de beta-lactamases de amplo espectro (ESBLs) com métodos fenotípicos e genotípicos, em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 4.2) Identificar a produção de metilases RNAr 16S por meio de métodos fenotípicos e genotípicos.
- 4.3) Avaliar métodos de triagem para detecção do fenótipo ESBLs
- 4.4) Avaliar um método de PCR *multiplex* para o diagnóstico de ESBL.
- 4.5) Investigar a diversidade genética de isolados produtores de ESBL e/ou metilase RNAr 16S por método de ERIC-PCR.
- 4.6) Investigar a mobilização gênica
- 4.7) Estudar o ambiente genético de cepas *bla*_{ESBL} positivas.

5) Materiais e Métodos

5.1 - Amostras bacterianas

Num total de 120 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram selecionadas 35 amostras com perfil de resistência caracterizados como não produtores de enzimas metalo-beta-lactamases, coletados no período de 2004 a 2008. Estes isolados foram selecionadas de banco de amostras isoladas de vários espécimes clínicos, provenientes de diversos centros hospitalares, tais como: Hospital das Clínicas de São Paulo (HC), Hospital Emílio Ribas (HER), Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU) e Hospital da Beneficência Portuguesa (HBP)

5.2 - Condições de cultura

Os isolados foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas por 24 h em estufa controlada a 37°C. As colônias foram semeadas em 2 ml de caldo BHI (infusão cérebro-coração) e incubadas a 37°C, por 24 h sob agitação constante em shaker rotativo a 150 rpm. O resultado dessa semeadura foi acrescido de 20% de glicerol e congelado para preservação.

5.3- Extração do DNA total

Para extração do DNA foi utilizado o método de fervura. A partir de uma cultura em caldo LB, de uma noite, alíquotas de 800 uL foram submetidas à centrifugação durante 1 minuto a 15.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuspensão em 100 µL de água, qualidade milli-Q, estéril. Posteriormente, os microtubos contendo os sedimentos ressuspensos foram fervidos durante 10 minutos.

Finalmente, após 15 minutos de centrifugação a 9.000 rpm, 100 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo estéril e congelado.

5.4) Extração do DNA plasmidial

Para extração do DNA plasmidial, foi utilizado o KIT NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) conforme instruções do fabricante.

5.5.) Perfil de resistência bacteriana

O perfil de sensibilidade antibacteriana foi avaliado pelo método de Kirby-Bauer, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI/NCCLS (CLSI, 2007) com os seguintes discos de antibiótico: amicacina(30ug), ampicilina/sulbactan(10/10ug), aztreonam(30ug), cefepima(30ug), cefoxitina(30ug), ceftazidima (30ug), ceftriaxona(30ug), ciprofloxacina(5ug), ertapenem(10ug), gentamicina(10ug), imipenem(10ug), meropenem(10ug), piperacilina/tazobactan(100/10ug), ticarciclina/clavulanato(35/10ug) e tobramicina(10ug).

5.6) Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) foi empregado o método de diluição em Agar, seguindo-se as normas padronizadas do CLSI, 2007. Uma suspensão de microrganismos foi inoculada em placas contendo ágar Müeller-Hinton acrescidas do antibiótico testado em concentrações decrescentes de 512µg/mL a 0,03µg/mL. As placas foram incubadas em estufa controlada a 37°C durante 24 horas. A CIM foi considerada como sendo a menor concentração de antibiótico em que não houve crescimento visível da cepa. Como controle foi utilizada a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

5.7) Determinação fenotípica da produção de ESBLs

Para determinação fenotípica, as cepas foram submetidas à *screening* para a produção de ESBL. Foram testados 4 métodos de *screening* na ausência e na presença de inibidores.

5.7.1 – Teste de Sinergismo de Duplo Disco (DDST)

Uma suspensão (escala 0,5 de McFarland) da bactéria testada foi espalhada com Swab sobre a superfície do meio Agar Muller Hinton. Discos de amoxicilina/clavulanato(20/10ug), Ticarciclina/clavulanato(35/10ug) e Piperacilina/Tazobactan(100/10ug) foram colocados sobre a superfície. Então, discos de ceftazidima ou cefepima eram colocados ao redor numa distância de 20 mm dos discos combinados. O mesmo era realizado em placas contendo Cloxacilina (200ug/ml). As placas foram incubadas em estufa controlada a 37°C por 18 horas. O microrganismo era considerado provável produtor de ESBL quando era observada a formação de uma zona de inibição (zona fantasma) entre os halos dos discos de cefalosporinas e os discos combinados.

5.7.2 – Efeito sinérgico entre Ceftazidima e Imipenem

Para avaliar a possível ação sinérgica entre CAZ e IPM na avaliação da presença de ESBL, duas metodologias foram testadas. Na primeira, foi adicionado 0,1ug de IPM em um disco CAZ (30ug) Esta combinação era colocada na superfície do Agar Muller Hinton com inóculo bacteriano (escala 0,5 de McFarland) e incubada por 18 horas. Um aumento na zona de inibição do disco de CAZ na presença de IPM era considerado como presuntiva produtora de ESBL (Pelegriño, 2006).

Na terceira metodologia, foi realizado o teste de sinergismo de duplo disco descrito anteriormente, porém, com discos de IPM (10ug) e CAZ(30ug) dispostos a 20mm de distância. A formação de uma zona fantasma entre os halos de inibição era considerada como suspeita de produção de ESBL (Weldhagen, 2003).

5.7.3) E-Test

Foram testadas fitas de *E-test* específicas para o diagnóstico de ESBL contendo cefotaxima com e sem ácido clavulânico nas extremidades. Uma suspensão (escala 0,5 de McFarland) da bactéria testada foi espalhada com zaragatoa sobre a superfície do meio Agar Muller Hinton onde as fitas foram colocadas. A redução no crescimento da amostra bacteriana na célula que contém a associação do antimicrobiano b-lactâmico com o inibidor de beta-lactamase, quando comparada com o nível de crescimento da célula que contém somente o antimicrobiano beta-lactâmico é indicativo da produção de ESBL.

5.8- Determinação fenotípica da produção de metilases 16S RNAr

A produção de metilases 16S RNAr foi determinada fenotipicamente por meio de antibiograma qualitativo e quantitativo com a determinação da concentração inibitória mínima. A produção destas enzimas pode ser suspeitada pelo perfil de multirresistência aos aminoglicosídeos. Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi empregado o método de diluição em ágar, seguindo as normas padronizadas do NCCLS, frente aos aminoglicosídeos gentamicina e amicacina. Uma CIM de 256 ug/ml é sugestiva de produção de metilases 16S RNAr.

5.9 - Confirmação genotípica

A confirmação genotípica foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos para amplificar os genes de interesse.

Para a verificação dos tamanhos dos produtos da PCR, alíquotas do DNA, assim como um padrão de massa molecular conhecido, misturadas a uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%) foram submetidas à separação eletroforética por cerca de 50 minutos a 100 volts em gel de agarose a 1%. O gel foi corado e visualizado em Brometo de Etídio.

Como controle, a expressão normalizada dos genes foi confirmada na cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853. As demais cepas controle disponíveis para o estudo podem ser vistas no Quadro 2.

5.9.1 - Confirmação genotípica da produção de ESBLs

Confirmação genotípica da produção de ESBL foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos para amplificar os genes de ESBL *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA} (Tabela 2). Os controles positivos disponíveis para o estudo podem ser verificados no Quadro 2.

Tabela 2. Iniciadores para identificação de genes ESBLs

Iniciadores	Seqüência	amplicon
PER-2 F	5 – ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC - 3'	886
PER-2 R	5' – AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA – 3'	
GES-1A F	5' – ATG CGCTTC ATT CAC GCA C – 3'	827
GES-1B R	5'–CTA TTT GTC CGT GCT CAG G – 3'	
TEM-A F	5'– GAG TAT TCA ACA TTT CCG TGT C– 3'	805
TEM-B R	5'– TAA TCA GTG AGG CAC CTA TCT C– 3'	
SWSHV-A F	5'- AAG ATC CAC TAT CGC CAG CAG – 3'	888
SWSHV-B R	5'- ATT CAG TTC CGT TTC CCA GCG G – 3'	
OXA 10 F	5' - TAT CGC GTG TCT TTC GAG TA - 3'	737
OXA 10 R	5' - TTA GCC ACC AAT GAT GCC C -	
OXA-13.1 F	5'– GCC GCA TAT GTA ATT ACT GC – 3'	702
OXA-13.2 R	5' –ATT TTC TTA GCG GCA ACT TAT – 3'	
OXA-18F F	5' – ATT TCA ACG GTT TGC CTT ACG – 3'	557
OXA-18F R	5' – TTG GCA TCG GAA AGC GAA CC – 3'	
CTX -M F	5' - CGC TTT GCG ATG TGC AG - 3'	520
CTX-M R	5' - ACC GCG ATA TCG TTG TG - 3'	
CTX-M-1 F	5' - GGT TAA AAA ATC ACT GCG TC - 3'	827
CTX-M-1 R	5' - TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC - 3'	
CTX-M 2 F	5' - ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG - 3'	827
CTX-M 2 R	5' - TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC - 3'	
CTX-M 8/25 F	5' - CTG GAG AAA AGC AGC GGG GG - 3'	542
CTX-M 8/25 R	5' - ACC CAC GAT GTG GGT AGC CC - 3'	
CTX-M 9 F	5' - ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA - 3'	833
CTX-M 9 R	5' - CCC TTC GGC GAT GAT TCT - 3'	

A reação ocorreu com uma desnaturação inicial a 94° por 5 minutos, seguida de 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 94° por 1 minuto, anelamento a 55° por 1 minuto e extensão a 72° por 1 minuto. Após o final dos 30 ciclos houve uma extensão final a 72° por 10 minutos.

5.9.2 - Confirmação genotípica da produção de metilases 16s RNAr

Para as metilases 16S RNAr foram utilizados os iniciadores específicos *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* (Tabela 3). O controle positivo disponível pode ser verificado no Quadro 2.

A reação ocorreu com uma desnaturação inicial a 94° por 5 minutos seguida de 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 94° por 30 segundos, anelamento a 55° por 30 segundos e extensão a 72° por 30 segundos. Após o final dos 30 ciclos houve uma extensão final a 72° por 10 minutos.

O experimento foi repetido nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94° por 5 minutos, seguida de 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 94° por 1 minuto, anelamento a 55° por 1 minuto e extensão a 72° por 1 minuto. Após o final dos 30 ciclos houve uma extensão final a 72° por 10 minutos

Tabela 3. Iniciadores para identificação de genes RNAr 16S

Iniciadores	Seqüência:	Amplicon esperado
<i>rmtA</i> F	5 – CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC - 3'	635
<i>rmtA</i> R	5' – TTG CTT CCA TGC CCT TGC C– 3'	
<i>rmtB</i> F	5'– GCT TTC TGC GGG CGA TGT AA– 3'	173
<i>rmtB</i> R	5' – ATG CAA TGC CGC GCT CGT AT– 3'	
<i>rmtC</i> F	5' – CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG – 3'	711
<i>rmtC</i> R	5' – ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT – 3'	
<i>rmtD</i> F	5' – CGG CAC GCG ATT GGG AAG C – 3'	902
<i>rmtD</i> R	5'– CGG AAA CGA TGC GAC GAT– 3'	
<i>armA</i> F	5'– ATT CTG CCT ATC CTA ATT GG – 3'	315
<i>armA</i> R	5' – ACC TAT ACT TTA TCG TCG TC– 3'	

5.10) Padronização de PCR *Multiplex*

Baseado nos resultados preliminares e nas cepas controle disponíveis (Quadro2), um PCR *multiplex* foi desenvolvido para identificar simultaneamente os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES} e *bla*_{OXA}.

Em todas as reações foram utilizados um controle negativo e os controles positivos para os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES} e *bla*_{OXA} identificados por sequenciamento. Os melhores resultados foram para as reações realizadas com volume total de 25 uL contendo 1 uL de DNA da amostra clínica, 1 uL de cada iniciador específico (2,5 uM), 2,5 uL de MgCl₂ (2,5mM), 2,5 uL de tampão de enzima, 2,5 uL de DNTP, 0,25 uL de enzima Taq polimerase (Fermentas) e 10,25 uL de água.

A reação ocorreu com uma desnaturação inicial a 94° por 5 minutos, seguida de 25 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 94° por 1 minuto, anelamento a 50° por 1 minuto e extensão a 72° por 1 minuto. Após o final dos 25 ciclos houve uma extensão final a 72° por 10 minutos. Para saber a temperatura de anelamento mais indicada, a reação foi realizada em termociclador com gradiente de temperatura que variava de 48 a 62° C.

Quadro 2. Controles positivos para detecção dos genes *bla* e *rmtD*

Gene alvo	Controle positivo
<i>bla</i> _{GES}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2663 Cedido gentilmente pela UNIFESP
<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>Escherichia coli</i> FCF-USP
<i>bla</i> _{SHV}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> FCF-USP
<i>bla</i> _{TEM}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> FCF-USP
<i>bla</i> _{PER}	<i>Enterobacter aerogenes</i> FCF-USP
<i>rmtD</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cedido gentilmente

5.11) Estudo do ambiente genético de *bla*ESBL positivas

O estudo do ambiente genético das cepas *bla*_{CTX-M} positivas foi realizado por PCR com iniciadores genéricos e específicos (tabela 4). O produto foi purificado com kit Gfx Pcr Dna AND Gel Band Purification Kit (Quiagen, Buckinghamshire, UK) e submetido a seqüenciamento com os mesmos pares de iniciadores. A seqüência foi posteriormente analisada e comparada com as publicações encontradas no banco de genes da *National Library of Medicine* (BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)).

O estudo da presença de integrons no material genético da bactéria foi feito empregando-se iniciadores dos segmentos conservados deste elemento. Para determinar o conteúdo da região variável são utilizados os iniciadores de genes de resistência em combinação com os do segmento conservado. A caracterização da região variável é realizada por meio de sequenciamento.

Tabela 4. Iniciadores para a identificação e caracterização de integrons e seus genes cassetes

Iniciadores	Seqüência:
intl 1 F	5'- CCG TAG AAG AAC AGC - 3'
QAC R	5'- GTT GCG ATT ACT TCG- 3'
Sul 1 R	5'- GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC-3'
aadA1 F	5'- CGC CGA AGT ATC GAC TCA AC - 3'
aadA1 R	5'- GAC TAC CTT GGT GAT CTC GC- 3'
AAC-6 F	5'- ATG ACT GGC TAA ATC -3'
AAC-6 R	5'- CCC GCC TTC TCG TAG CA - 3'
ORF 513 F	5'- CTT TTG CCCTAG CTG CGG - 3
ORF 513 R	5'- CTC ACG CCC TGG CAA GGT TT- 3'
CTX-M-2 R INV F	5'- GCGGCGAAAATCGTAACCCA- 3'
CTX-M-2 F INV R	5'- CGAATGCTCTGAGTCATCAT- 3'

5.12) - Estudo da mobilidade dos genes de resistência

A mobilização horizontal dos genes ESBL foi avaliada por transformação. Foi utilizada a cepa *Escherichia coli* DH10B como célula competente. Esta cepa foi incubada por uma noite em agitador rotativo à 37°C. Um volume de 100 uL da cultura bacteriana foi misturada a 100 mL de caldo LB e incubado durante 3 horas a 37°C sob agitação constante. Após este período, a bactéria foi transferida para tubo tipo Falcon de 50 mL e mantida em gelo durante 10 minutos. Esta cultura foi centrifugada a 2700G a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 30 mL de MgCl₂ – CaCl₂ (80mM/20mM) gelado. Novamente foi centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 2mL de CaCl₂ 0,1 M gelado.

Para a transformação foi utilizado o método de choque térmico, onde 50uL de caldo suspensão de *E.coli* DH10B competente foi misturado a 10 uL de DNA plasmidial e deixado em gelo durante 30 minutos. Em seguida, essa mistura foi transferida para banho Maria a 42°C durante 90 segundos e , logo após mergulhado no gelo durante 2 minutos. A essa mistura foi adicionado 950 uL de caldo LB e levada a incubação a 37°C sob agitação durante 90 minutos. Essa cultura foi transferida para placa com concentrações adequadas de antibiótico. As células transformadas então foram selecionadas em ágar Muller Hinton contendo ampicilina (64ug/mL).

5.13) Tipagem genotípica

Para tipagem genotípica as amostras bacterianas foram submetidas ao método de ERIC-PCR que consiste na amplificação de seqüências do DNA por meio da técnica de PCR utilizando o iniciador ERIC-2 (5' – AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3')

(Syrmis *et al.*, 2004, Pujana *et al.*, 1999, Renders *et al.*, 1996). A reação se deu nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 94°C por 10 min; etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, hibridação à 52° por 1 min, extensão à 72° por 8 min; extensão final a 72° por 16 minutos. A visualização dos segmentos foi obtida por eletroforese em gel de agarose 2% , corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV. Com a utilização do programa *BioNumerics*, o dendrograma gerado teve sua análise de clusters realizada pelo coeficiente de Dice , empregando-se tolerância de 1%. Foram considerados muito relacionados aqueles que mostraram perfis com 90% ou mais de similaridade .

6.) RESULTADOS

6.1) Identificação e Perfil de Resistência

Inicialmente, a identificação das amostras foi realizada por Vitek (BioMérieux, Hazelwood, Mo.) e/ou por meio de prova bioquímica convencional. O quadro 2 mostra as características clínicas, a origem e a data de isolamento de cada isolado.

Na tabela 5 e no gráfico 1, são apresentados os perfis e as porcentagens de resistência encontrada nos isolados recuperados. Todos os isolados apresentaram perfil multiresistente, exibindo resistência a 3 ou mais antibióticos. Todos os isolados foram resistentes a ampicilina/sulbactam, ertapenem e ticarciclina/clavulanato. Nenhum isolado foi resistente a todos os antibióticos testados.

Quadro 3. Características clínicas dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

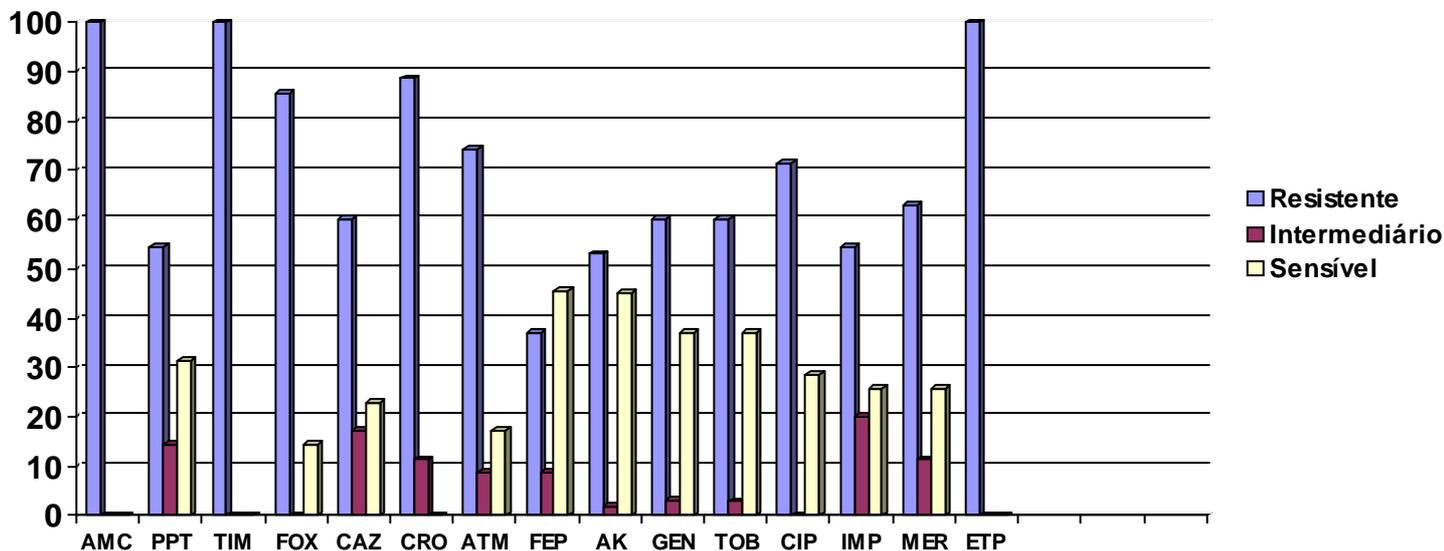
Nº	Isolado	Hospital	Amostra	Ano
1	827	HU	S.traqueal	2007
2	886	HU	S.traqueal	2007
3	686	HU	S.traqueal	2007
4	846	HU	S.traqueal	2007
5	847	HU	S.traqueal	2007
6	1H	HC	Cateter	2004
7	4H	HC	Cateter	2004
8	5H	HC	Cateter	2004
9	8H	HC	Nd	2004
10	13H	HC	Cateter	2004
11	15H	HC	Nd	2004
12	31H	HC	Abcesso	2004
13	3L	Boldrini	Nd	2005
14	6L	Boldrini	Nd	2005
15	7L	Boldrini	Urina	2005
16	247	ER	Nd	2005
17	281	ER	Nd	2005
18	381	ER	S.traqueal	2005
19	111	ER	Cateter	2005
20	1	HBP	Urina	2008
21	2	HBP	S.traqueal	2008
22	3	HBP	Urina	2008
23	4	HBP	Urina	2008
24	5	HBP	S.traqueal	2008
25	6	HBP	S.traqueal	2008
26	7	HBP	S.tumoral	2008
27	8	HBP	S.traqueal	2008
28	9	HBP	Urina	2008
29	10	HBP	Urina	2008
30	11	HBP	L.bronq	2008
31	12	HBP	Urina	2008
32	13	HBP	Urina	2008
33	14	HBP	Ferida	2008
34	15	HBP	Urina	2008
35	16	HBP	Urina	2008

Legenda: HU: Hospital Universitário da Universidade de São Paulo; HC: Hospital das Clínicas de São Paulo; Boldrini: Instituto infantil Boldrini; ER: Instituto de Infectologia Emílio Ribas; HBP: Hospital da Beneficência Portuguesa de São Paulo; S.traqueal: Secreção traqueal; S.tumoral: Secreção tumoral; L.Bronq: Lavado Brônquico; ND: dado não disponível.

Tabela 5. Perfil de resistência das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a 14 antimicrobianos testados

Cepa	Antibióticos														
	PPT	TIM	FOX	ATM	CRO	CAZ	FEP	AK	GEN	TOB	CIP	MER	ETP	IMP	
1	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	1
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	2
3	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	3
4	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	4
5	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	5
6	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	R	R	6
7	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	7
8	I	R	R	I	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R	8
9	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	9
10	I	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	I	R	S	10
11	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	11
12	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	12
13	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	13
14	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	I	R	R	14
15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	15
16	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	16
17	S	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	S	17
18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	18
19	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	R	R	19
20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	20
21	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	21
22	S	R	R	I	R	I	S	S	S	R	R	S	R	I	22
23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	23
24	S	R	R	R	R	R	S	I	I	R	R	R	R	R	24
25	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	25
26	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	26
27	I	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R	R	R	27
28	S	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	28
29	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	I	29
30	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	30
31	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	31
32	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	R	R	R	32
33	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	33
34	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	34
35	S	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	35

Gráfico 1. Taxa (%) de resistência dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* frente a 14 antimicrobianos testados



Legenda:AK: amicacina; FOX:cefoxetina; AMC:ampicilina/ac.clavulânico; ATM: aztreonam; FEP: cefepime; CRO:ceftriaxona; CAZ:ceftazidima; GEN: gentamicina; IMP:imipenem; PPT: piperacilina/tazobactam; MER: meropenem; ETP: ertapenem; CIP: ciprofloxacina; TOB: Tobromicina; TIM: ticarcilina/ac.clavulânico.

6.2) Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Ceftazidima, Aztreonam, Amicacina e Gentamicina

A tabela 6 mostra a amplitude da concentração inibitória mínima para cada antimicrobiano acima citado, frente as cepas que carregavam algum dos genes *blaESBL*., assim como, os valores de CIM50 e CIM 90 obtidos com o numero total das amostras .

A CIM 50 foi mais alta para ceftazidima e aztreonam, nos isolados que carregavam *blaESBL*. Porém, quando o antibiótico era a amicacina ou gentamicina, a CIM50 foi menos elevada em comparação ao total de cepas do estudo.

Tabela 6. Valores da Concentração inibitória mínima (CIM) de Ceftazidima, Aztreonam, Amicacina e Gentamicina do total de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

	Valores de CIM (ug/ml)				
	Amplitude	CIM50	CIM90	CIM50 <i>blaESBL</i> positivas*	CIM90 <i>blaESBL</i> positivas*
Ceftazidima	2 - 64	8	32	16	32
Aztreonam	8 - >512	64	128	128	128
Amicacina	4 - >512	>512	>512	256	>512
Gentamicina	8 - >512	>512	>512	256	512

Considerando genótipo

6.3- Determinação fenotípica da produção de ESBLs

Três das 35 cepas (11%) de *P. aeruginosa* apresentaram resultados fenotípicos positivos sugerindo a produção de ESBLs. A triagem realizada com a adição do inibidor não alterou esse resultado. Na figura 3 podemos ver os 4 resultados positivos apresentados por 3 amostras distintas de *Pseudomonas aeruginosa*. Os demais testes fenotípicos realizados obtiveram resultados negativos para a sugestão de produção de ESBL.

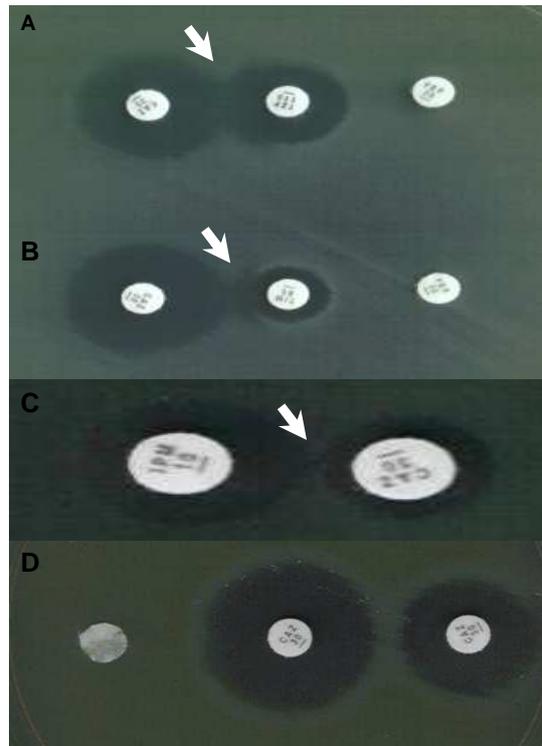


Figura 3. Sinergismo positivo para a presença de ESBL em *P.aeruginosa* A) A seta indica o sinergismo entre discos de Ceftazidima e Piperacilina/Tazobactan. B) A seta indica o sinergismo entre discos de Ceftazidima e Ticarcilina/Ac.Clavulânico. C)A seta indica sinergismo entre discos de Imipenem e ceztazidima D) Aumento do halo ao redor do disco de ceztazidima quando adicionado 0,1 ug de imipenem.

6.4- Determinação fenotípica da produção de metilases 16S RNAr

Doze amostras apresentaram concentração inibitória mínima para amicacina e gentamicina maior que 256ug/ml. Metade dessas não apresentou,, nenhum halo de inibição ao redor dos discos de aminoglicóideos no antibiograma. Essa resistência foi vista como presunção fenotípica da produção de metilases 16S RNAr.

6.5 - Confirmação genotípica da produção de ESBLs

Foram encontrados 9 isolados que carregavam o gene *bla*_{CTX-M} (Figura 4) e 2 isolados que carregavam o gene *bla*_{OXA-10} (figura 5). Nenhum dos outros genes *bla*_{ESBL} procurados foram encontrados nas cepas estudadas.

Os grupos *bla*_{CTX-M} encontrados foram *bla*_{CTX-M-1} (1) e *bla*_{CTX-M-2} (8). As cepas *bla*_{ESBL} positivas foram provenientes de 3 hospitais distintos



Figura 4. Perfil de eletroforese dos isolados *bla*_{CTX-M} positivos. M: marcador molecular 100pb; CP: controle positivo *Klebsiella pneumoniae bla*_{CTX-M} positiva. 1 a 9: isolados *bla*_{CTX-M} positivos.

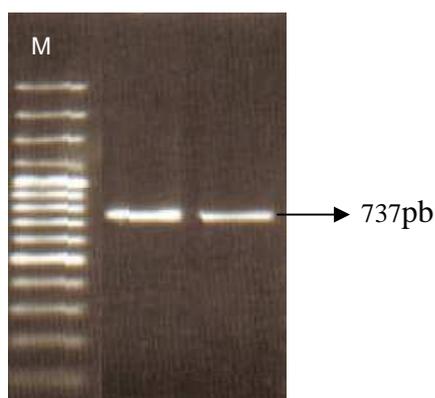


Figura 5. Perfil de eletroforese dos isolados *bla*_{OXA} positivos. M: marcador molecular 100pb.

6.6 - Confirmação genotípica da produção de metilases 16s rRNA

Os genes associados a produção de metilases 16s RNAr *armA*, *RmtA*, *RmtB*, *RmtC* e *RmtD* não foram encontrados nas amostras estudadas.

6.7) Técnica de PCR *Multiplex*

Os genes empregados no presente estudo foram escolhidos segundo resultados obtidos do próprio trabalho e da bibliografia. Como até o presente momento só 3 genes de ESBL (*bla_{GES}*, *bla_{OXA}* e *bla_{CTX-M}*) foram identificados em *P. aeruginosa*, estes foram empregados para o desenvolvimento de um método para confirmação diagnóstica. A figura 6 mostra amplificação dos fragmentos alvos da cepa controle. Após a padronização, o método foi testado com as 11 amostras identificadas como positivas para ESBL e 24 amostras negativas deste estudo. Não houve ocorrência de nenhum resultado falso positivo ou negativo com as amostras testadas.

Comparando-se os resultados obtidos com os métodos fenotípicos e pelo PCR *multiplex* aqui desenvolvido, observou-se que o método molecular foi capaz de detectar maior número de amostras que carregam os genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{GES}* e *bla_{OXA}*.

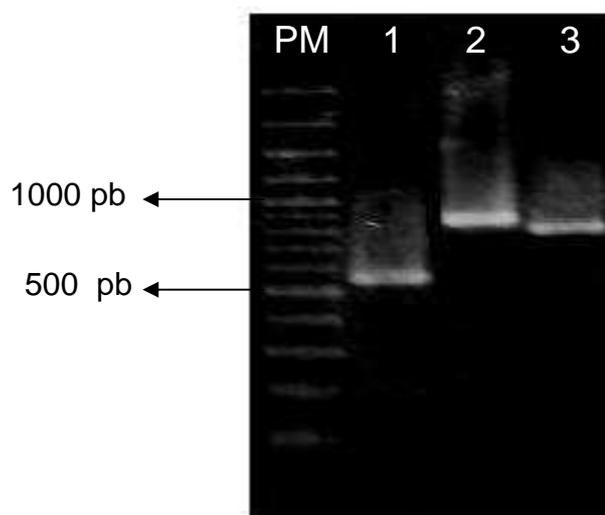


Figura 6. Perfil de eletroforese do PCR *Multiplex*. PM: Peso molecular 100pb; Linha 1: Controle *bla_{CTX-M}*, 520 pb; Linha 2: Controle *bla_{GES}*, 827 pb; Linha 3 : Controle *bla_{OXA}*, 737 pb.

6.8) Ambiente genético de *bla*_{CTX-M}

Entre as cepas *bla*_{CTX-M} positivas, em seis foram encontrados integrons de classe 1. Foi escolhida para estudo de ambiente genético uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa bla*_{CTX-M-2} positiva. Na análise por PCR, apenas os pares aad/A1F-R e CTX-M-2F/Orf513R não obtiveram amplicons. As bandas observadas na corrida eletroforética quando submetidos ao seqüenciamento apresentaram 98 a 100% de similaridade com as sequências de várias outras espécies bacterianas publicadas no banco de dados *BLAST*. A análise da posição das bandas e das sequências adquiridas nos possibilitou saber a disposição e o ambiente genético de *bla*_{CTX-M-2} em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Figuras 7 e 8). As sequências encontradas foram publicadas no banco de dados do *Blast* com os seguintes números de acesso FJ695216, FJ695217 e FJ695218.

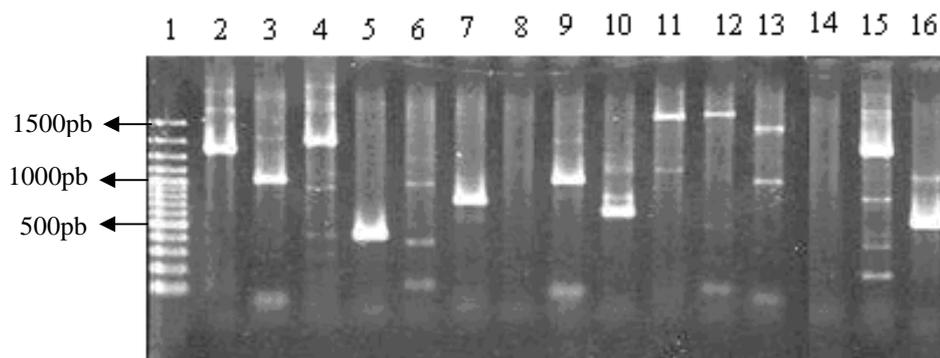


Figura 7. Perfil de eletroforese de mapeamento de integron de classe 1. Linha 1, marcador molecular de 100bp ; linha 2, IntlF/QacR; linha 3, IntlF/CTX-M-2R; linha 4, CTX-M-2F/QacR; linha 5, AAC-6; linha 6, IntlF/AAC-6R; linha 7, AAC-6-F/Qac R; linha 8, CTX-M-2F/AAC-6R; linha 9, AAC-6F/CTX-M-2R; linha 10, Orf513; linha 11, Orf 513F/QacR; linha 12, IntlF/Orf513; linha 13, Orf513F/CTX-M-2R; linha 14, CTX-M-2F/Orf513 R; linha 15, IntlF/sul1R; linha 16, CTX-M-2-seq.

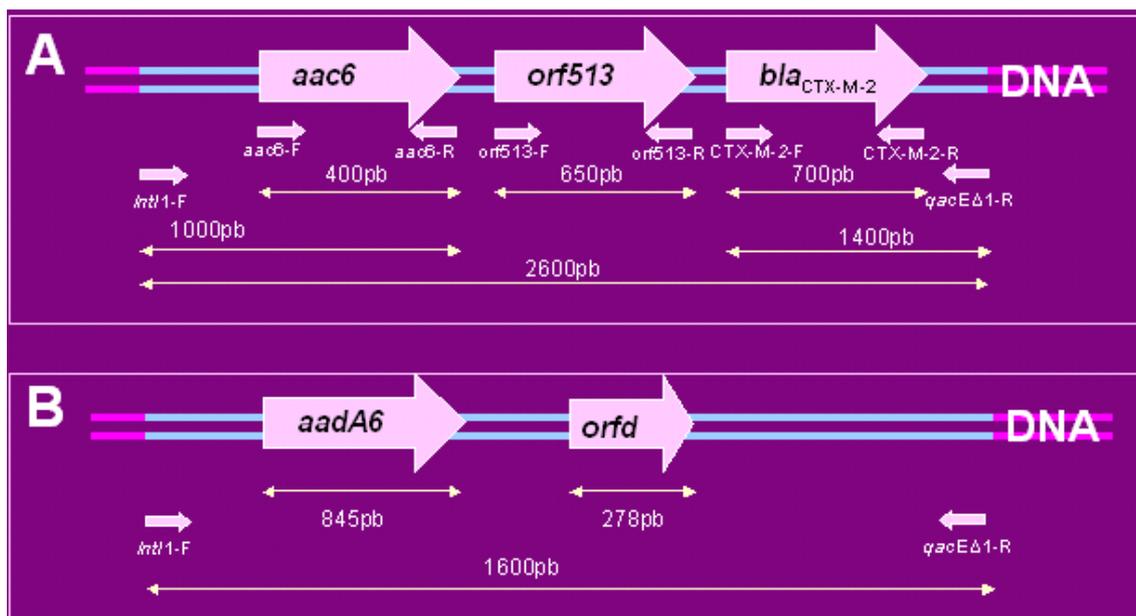


Figura 8. Representação esquemática dos integrons de classe 1 encontrados em cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Em A, Integron de classe 1 com tamanho aprox de 3000pb; em B, Integron de classe 1 com tamanho aproximado de 1600pb.

6.9) Mobilização gênica

Todas as cepas positivas apresentaram plasmídeos na extração. Porém, as tentativas de mobilização do plasmídeo através do método de transformação bacteriana não permitiram evidenciar se este plasmídeo seria o responsável por carrear o gene de ESBL.

6.10) Tipagem genotípica

Todas as 35 amostras foram submetidas ao método de ERIC-PCR. As 11 amostras que apresentaram positividade para o gene *bla*_{ESBL} foram submetidas à análise do perfil de similaridade genética pelo programa BioNumerics e resultaram na identificação de 11 clones distintos (figura 9).

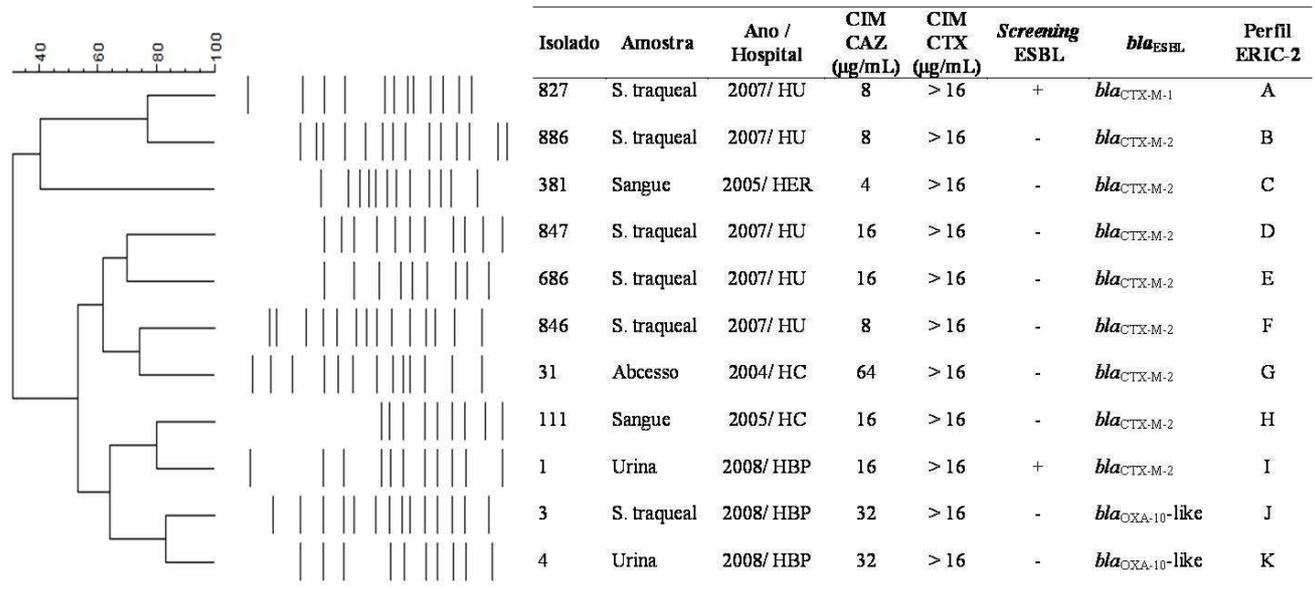


Figura 9. Diversidade genética das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* bla_{ESBL}positivas.

7) Discussão

A disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente vem se acentuando no ambiente hospitalar e configura um sério problema de saúde pública (Arruda *et al*, 1999; Sader *et al*, 2001). Com base na literatura, observou-se que apesar do desenvolvimento de diferentes classes de antimicrobianos, as bactérias estão constantemente apresentando mecanismos que lhes permitem sobreviver quando expostas a essas drogas. O que se tem evidenciado é que a velocidade das bactérias em adquirir resistência aos novos antibióticos é maior que a capacidade de se desenvolver novos medicamentos.

As bactérias relacionadas às infecções hospitalares mostram em geral, resistência à múltiplos antimicrobianos, as quais são responsáveis por muitos surtos, sendo este um fator crucial na epidemiologia de cepas hospitalares. (Moolenaar *et al.*, 2000).

Desta forma torna-se de fundamental importância o conhecimento e a aplicação de metodologias que possam auxiliar no rápido diagnóstico e monitoramento de resistência.

Todas as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* do presente estudo apresentaram-se resistentes a pelo menos 3 classes de antibióticos. Hoje, já não é mais possível inferirmos todos os mecanismos de resistência de uma cepa apenas pelo antibiograma realizado rotineiramente no laboratório de microbiologia clínica.

Os valores de CIM 90 para a ceftazidima mostraram que a maioria das amostras deste estudo apresentava uma alta resistência a este antibiótico. Porém, não podemos deixar de comentar que o valor de CIM 50 para o grupo *bla*_{ESBL} positivo, também frente a ceftazidima, estava abaixo do breakpoint preconizado pelo CLSI. Este dado mostra que embora as cepas possuidoras de ESBLs confirmem resistência, nem sempre isto

implicará no aumento in vitro da CIM a níveis considerados de resistência, segundo o breakpoint sugerido pela CLSI. Os relatórios da CLSI também não alertam para alguma medida a ser tomada na identificação de cepas produtoras de ESBL em *Pseudomonas aeruginosa*, assim como o faz para membros da família *Enterobacteriaceae*. Deste modo, é certo que a real prevalência destes organismos não está sendo devidamente apurada. (CLSI, 2008).

No entanto, os valores de CIM para o aztreonam ficaram acima do breakpoint de resistência sugerido pela CLSI. A especificidade e a sensibilidade do teste de sensibilidade variam de acordo com o antibiótico testado. O uso de mais de um antibiótico aumentaria a sensibilidade do teste de triagem para a detecção deste tipo de resistência. (Emery, C. L., 1997; Moland, E. S., 1998; CLSI, 2008).

Vários métodos estão sendo propostos para detectar a presença das enzimas ESBL, porém, a maioria encontra-se direcionada para a detecção em bactérias que possuem pouca ou nenhuma atividade de beta-lactamases de origem cromossômica, como ocorre com enzima AmpC, o que dificulta o diagnóstico, mascarando a presença destas enzimas. A detecção de ESBL em espécies que possuem a enzima beta-lactamase de origem cromossômica induzível, como ocorre em *Enterobacter* spp., mostra ser um grande desafio. A dificuldade na detecção de ESBL é maior em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, possivelmente devido à maior impermeabilidade da sua membrana externa quando comparado aos do membro da família *Enterobacteriaceae*, assim como a resistência à antimicrobianos mediada por sistemas de efluxo (Pournaras, 2005). Assim, no presente estudo propusemos empregar métodos fenotípicos e moleculares para tentar contornar esta dificuldade..

Tzelepi e colaboradores em 2000 mostraram que um teste de sinergismo de duplo disco (DDST) com emprego de amoxicilina/clavulanato (AMC) e cefepima (FEP)

poderia detectar eficientemente a produção de ESBL em *Enterobacter* spp. Em nosso estudo, o método de DDST detectou uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que carregava genes *bla*_{CTX-M} quando utilizamos discos de ceftazidima (CAZ) com ticarciclina/clavulanato (TIM) ou ainda piperacilina/tazobactan (TZP). Assim, o emprego de discos de CAZ parece ter sido mais eficiente do que de FEP. Outros estudos mostraram que a adição de cloxacilina no Ágar Muller-Hinton aumentaria a sensibilidade do DDST em *Acinetobacter baumannii* (Poirel *et al*, 2003) ou em *Pseudomonas aeruginosa* (Aubert *et al*, 2004; Jiang *et al*, 2006), porém, no nosso trabalho, este aumento de sensibilidade não se fez presente.

Weldhagen e colaboradores em 2003 descreveram um método de sinergismo de duplo disco realizado com IMP e CAZ que seria eficiente quando realizado em meio de Ágar Muller Hinton, contendo Cloxacilina (200 ug/ml). O sinergismo entre discos de CAZ e IMP podem ser observados frente as cepas produtores de enzimas do tipo GES e PER-1, porém, pode ser mascarado devido à ação indutora de imipenem sobre AMP-C, resultando em uma zona de antagonismo entre os discos de CAZ e IMP. A adição de oxacilina ou cloxacilina inibe a atividade de Amp-C, permitindo assim, a visualização da zona de inibição entre os discos. Este relato indica que a utilização de inibidores de beta-lactamases cromossômicas pode aumentar a sensibilidade da detecção de ESBLs em *Pseudomonas aeruginosa*. No presente estudo tivemos um caso de resultado positivo frente a este método. Com a adição ou não de cloxacilina (200ug) ao meio, uma discreta zona de inibição formou-se entre os discos. Esse resultado mostra que o efeito sinérgico entre CAZ e IMP pode ocorrer frente a outros grupos de enzimas, podendo-se tornar um marcador de ESBL em *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, como a zona de inibição formada é muito discreta, o teste está sujeito a erros técnicos de interpretação.

Kartali e colaboradores (2002) utilizaram com sucesso o método de detecção de ESBL em *Enterobacter cloacae*, no qual 0,1ug de IMP foi adicionado a um disco de CAZ. Neste estudo, cerca de 85% das cepas de *E. cloacae* CAZ resistente que carregavam o gene *bla_{IBC}* foram identificados fenotipicamente por Pellegrino *et al.* Em 2006 estes mesmos autores utilizaram este método para detecção de ESBL no qual 58% das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que carregavam o gene *bla_{GES}* foram identificadas por esta técnica. Nosso estudo obteve um resultado positivo utilizando o mesmo método, porém, ao analisar por PCR não se conseguiu amplificar nenhum gene relacionado às ESBLs. Embora, fenotipicamente tivesse havido um aumento de 10mm no halo de inibição formado ao redor do disco de CAZ (30ug). Pellegrino *et al.*, utilizaram um breakpoint de 5mm para caracterizar o sinergismo como positivo. Para confirmar o resultado falso-positivo ou a não detecção da enzima pelos iniciadores utilizados, em nosso estudo, seria necessário quantificar a hidrólise do antibiótico. As cepas *bla_{CTX-M}* positivas não mostraram atividade sinérgica com o emprego desta técnica. É sabido que GES-1 e IBC-1 podem ser inibidas por imipenem em baixas concentrações (Kartali *et al.*, 2002; POirel, 1999), porém, o mesmo parece não ocorrer com as enzimas CTX-M.

Os vários testes fenotípicos realizados puderam confirmar a grande dificuldade de se estabelecer um teste fenotípico padrão para cepas de *P.aeruginosa* produtoras de ESBL. Entre os 4 testes fenotípicos positivos, 3 estavam relacionados a cepas que apresentaram PCR positivo para o gene *bla_{CTX-M}*, porém, nunca um único método conseguiu identificar todas as cepas possíveis carregadoras do gene em questão.

Foi proposto portanto, uma técnica de PCR *Multiplex* para o diagnóstico das cepas positivas. A amplificação simultânea de diferentes segmentos genéticos, permite a identificação dos diferentes genes associados a presença de ESBL em uma mesma

reação de PCR. Há várias descrições do uso do *multiplex* para a detecção destes genes, porém, visando encontrar os genes encontrados na família das Enterobactérias (Xu, 2005; Chia, 2005; Jemina, 2008). Nossa preocupação foi desenvolver um método dirigido para a detecção de genes de ESBL encontrados em *Pseudomonas aeruginosa* no Brasil tais como: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} e *bla*_{GES} (Picão, 2009; Castanheira, 2004; dados do autor). Os iniciadores utilizados neste estudo foram os mesmo utilizados no uniplex PCR. As bandas ficaram nítidas e não houve inespecificidade. Apesar do número de amostras não ser suficiente para testes estatísticos de sensibilidade e especificidade neste estudo, podemos dizer que o teste molecular conseguiu diagnosticar maior número de amostras positivas do que o teste fenotípico. O estudo de testes moleculares, como o método de PCR *multiplex* para a amplificação dos genes de ESBLs é importante no que diz respeito a maior rapidez do diagnóstico e, assim, melhorar o prognóstico do paciente.

Entre os seis genes de ESBL pesquisados em todas as amostras estudadas no presente trabalho, como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{GES} e *bla*_{PER} foram identificados dois: os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}. A amplificação destes genes por PCR mostrou 11 isolados que carregavam genes *bla*_{CTX-M} (9) ou *bla*_{OXA} (2). Cantón *et al* (2006) relataram na Europa o primeiro caso de *bla*_{CTX-M} em *Pseudomonas aeruginosa*. Celenza *et al* (2006) relataram no mesmo ano uma alta prevalência de genes *bla*_{CTX-M} em isolados clínicos de *P.aeruginosa* provenientes de hospitais da Bolívia. Desde então, a associação de *bla*_{CTX-M} em *Pseudomonas aeruginosa* não tem sido relatada. As enzimas do tipo CTX-M ocorrem em todo o mundo em membros da família *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2001). No Brasil, a presença de *bla*_{CTX-M-2} em *P.aeruginosa* foi relatada pela primeira vez em 2008, por nosso grupo, em isolados clínicos recuperados desde 2004 de diferentes hospitais de São Paulo (Silva *et al*,

2008). Mais tarde a presença deste gene também foi confirmada por Picão e colaboradores (2009) quando relataram um caso clínico com uma cepa de *P. aeruginosa* produtora de CTX-M-2 em um hospital Universitário de São Paulo Assim, a presença e disseminação de *bla*_{CTX-M} em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no Brasil, já é um fato real, porém, pode não estar sendo detectado, o que pode levar a sérias preocupações. A mobilização por plasmídeos tem em geral, contribuído na transferência horizontal entre gêneros e espécies de forma inespecífica.

A presença do gene *bla*_{OXA} é mais frequente entre as ESBL quando se trata de *Pseudomonas aeruginosa* (Yan, 2006). Porém, nosso trabalho mostra uma frequência maior de genes *bla*_{CTX-M}. Uma das amostras *bla*_{OXA} positiva mostrou-se sensível a cefepima e resistente à ceftazidima, resultado que difere do encontrado na literatura onde há citação de que enzimas do grupo OXA que hidrolisam mais eficientemente cefepima do que ceftazidima (Aubert *et al*, 2001)

Os valores de CIM frente aos aminoglicosídeos foi maior que 512µg/ml, em mais de 50% das cepas estudadas, dados estes muito acima do breakpoint sugerido pelo CLSI. No antibiograma, seis isolados apresentaram resistência a pelo menos 3 drogas da classe dos aminoglicosídeos. Os genes para as metilases 16S têm sido relatados em muitos países da Europa e da Ásia, muitas vezes em associação com os genes das enzimas CTX-M. Tais isolados apresentam alta resistência para os aminoglicosídeos, com valores de CIM elevados e com a característica resistência a 3 ou mais aminoglicosídeos no antibiograma (Yamane, 2005). Doi *et al* (2006) descreveram o primeiro relato, no Brasil, da co-produção de metilases 16S e metalo-beta-lactamases em *P.aeruginosa*. A co-produção de SPM-1 e Rmt-D em *P.aeruginosa* também foi estudada pelo nosso grupo e encontrada em cerca de 93% das cepas (Neves *et al*, 2007). Esta hipótese foi estudada neste trabalho, porém, não foram encontradas metilases 16S

em nenhuma das cepas ESBL positivas estudadas, o mesmo ocorrendo para o total de amostras restantes. Deste modo, não pudemos avaliar neste estudo, qual seria um bom indicador da presença de metilases 16S em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, mas pudemos verificar que o fato da cepa apresentar alta resistência a 3 ou mais aminoglicosídeos não é suficiente para dizer que se trata da presença de metilases 16S.

Os isolados produtores de ESBL não apresentaram relação clonal, sugerindo origem distinta, podendo ocorrer transferência horizontal auxiliado por plasmídeo. Picão e colaboradores (2009) sugerem em seu trabalho que não encontraram plasmídeos e as tentativas de mobilização gênica falharam. Em nosso estudo, todas as cepas CTX-M positivas apresentaram plasmídeos, porém, não obtivemos sucesso na tentativa de transferência. Este dado pode corroborar com os relatos da literatura e significar que os genes de CTX-M podem ter uma localização cromossômica em *Pseudomonas aeruginosa*.

Neste trabalho foi estudado o ambiente genético do gene *bla*_{CTX-M-2}. A amostra 886 foi a de escolha para este estudo. Foram encontrados genes relacionados à resistência a aminoglicosídeos: *aac-6* e *aadA6*, resultados que corroboram com a literatura. Muitos estudos associam a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* a aminoglicosídeos às enzimas 6 - fosfotransferase e 3´ - fosfotransferase que modificam neomicina e kanamicina, tornando *P. aeruginosa* naturalmente resistente a esses aminoglicosídeos (Mingeot - Leclerq *et al.*, 1999). Algumas amostras também podem produzir 3 - acetiltransferase e 2 - adeniltransferase que modificam a gentamicina e a tobramicina. A produção de 6´ - acetiltransferase confere resistência também à amicacina (Mingeot - Leclerq *et al.*, 1999). É interessante destacar que o gene *aac-6*, que codifica a enzima acetil transferase 6, está frequentemente associado com genes que codificam ESBLs (Poole, 2005). A enzima *aadA6* foi descrita em *Pseudomonas*

aeruginosa por Naas e colaboradores em 1999. Neste trabalho, os autores realizaram a caracterização molecular de um integron classe 1 In51 que carrega o gene que codifica a enzima aadA6 e outro gene cassete , *orfD*, que codifica um polipeptídeo de função ainda desconhecida. Nosso trabalho encontrou os mesmos genes cassetes presentes também em integron classe 1.

O estudo do ambiente genético do gene *bla*_{CTX-M-2} revelou que esta cepa de *Pseudomonas aeruginosa* carrega consigo um forte arsenal de resistência. Nenhum dos genes *bla*_{CTX-M} foi descrito em forma de cassete em integron classe 1, porém, nossos resultados nos levam a acreditar neste fato. Esses genes encontram-se localizados na posição *abaixo do* gene *orf513* e entre uma duplicação do tandem *qacE/sul1* (Poirel, 2008). A figura 10 mostra como podem estar arranjados os genes encontrados no presente estudo. É interessante notar, que a cepa estudada carrega provavelmente dois integrons de classe 1. Com esse elemento, as cepas ficam com a capacidade duplicada de carregar genes de resistência.

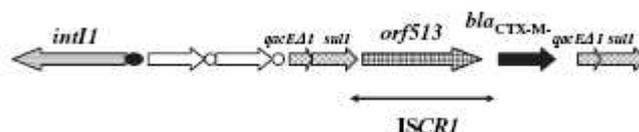


Figura 10. Representação esquemática da estrutura genética relacionada à aquisição de genes *bla*_{CTX-M}; adaptado de Poirel, 2008.

Os integrons de classe 1 em plasmídeos parecem ter contribuído para a disseminação horizontal dos genes de resistência. Estudar o ambiente genético dos genes *bla*_{ESBL} é importante para sabermos quais os determinantes de prevalência e expressão destes genes.

8.) Conclusões

8.1) A expressão da enzima ESBL está relacionada a presença de genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} entre os isolados do presente estudo.

8.2) Os genes que conferem resistência às metilases 16s RNAr não estão relacionados a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* produtores da enzima ESBL isoladas nas amostras de São Paulo.

8.3) Nenhum método fenotípico foi capaz de detectar a presença de ESBL em 100% dos isolados.

8.4) O método de PCR Multiplex padronizado neste trabalho foi capaz de detectar os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} e *bla*_{GES}, relacionados a ESBLs em *Pseudomonas aeruginosa*, com maior índice de positividade do que obtidos com métodos fenotípicos.

8.5) As cepas *bla*_{ESBL} positivas mostraram baixa similaridade genética e podem estar disseminadas em vários hospitais de São Paulo.

8.6) O mapeamento e seqüenciamento do integron classe 1 encontrado revelou duas cepas carreadoras de dois diferentes integrons da classe 1, com genes *bla*_{CTX-M-2}, *aac6*, e *aadA6* codificadores de resistência para as cefalosporinas de terceira geração e para aminoglicosídeos.

8.7) As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* do presente estudo mostraram vários elementos de mobilização genéticos, como integrons e seqüências de inserção, que podem estar participando na disseminação de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro.

9) Referências Bibliográficas

Al Naiemi N, Duim B, Bart A. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Med Microbiol**. Nov; 55(Pt 11):1607-8, 2006.

Ambler R.P., Coulson A.F., Frere J.M., Ghuysen J.M., Joris B., Forsman M., Levesque R.C., Tiraby G., Waley S.G. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochem J**, 276:269-270, 1991.

Andrade S.S.; Sader H.S.; Barth, A.L.; Ribeiro, J.; Zoccoli, C.; Pignatari, A.C; Gales, C.C. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacilli isolated in Brazilian Hospitals participating in the SENTRY Program (2003-2008). **Braz J Infect Dis**, 12:3-9, 2008.

Andresws. J. M.. BSAC Standardized disc susceptibility testing method , **J Antimicrob Chemother**,60 : 20 – 41,2007.

Arruda E.A.G.; Marinho, I. S.; Boulos, M.; Sumiko, I. S.; Caiaffa, H. H. , F.; Mendes, C. M.; Oplustil, C. P.; Sader, H.; Levy, C. E.; Levin, A. S. Nosocomial infection caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 20, p. 620-623, 1999.

Aubert D , Poirel L , Ali A B , Goldstein F W & Nordmann P . OXA - 35 is an OXA - 10 - related beta - lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* . **J Antimicrob Chemother**,48 : 717 – 721,2001

Aubert, D.; Girlich, D.; Naas, T.;Nagarajan, S.; Nordmann, P. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended spectrum beta-lactamase *bla*VEB gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. **Antimicrob Agents Chemother.** , 48:3284-3290, 2004

Bassetti M, Righi E, Viscoli C. *Pseudomonas aeruginosa* serious infections: mono or combination antimicrobial therapy? **Curr Med Chem.**;15:517-22; 2008.

Bennett P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **J antimicrob Chemother.** 43: 1–4. 1999

Blondel-Hill, E. Henry, D.A. And Speert, D. *Pseudomonas*. In: Murray, P. R. Manual Of Clinical Micorbiology. 9th Ed. Washington, D.C.: Asm Press. p. 734-748, 2007.

- Bonnet, R. Growing Group of Extended-Spectrum B-Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrob Agents Chemother.**, Jan., P. 1–14, 2004
- Bradford, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 933-951,. 2001
- Bush, K. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, 39:1211-1233,. 1995
- Bush, K. New Beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis** (32): 1085-1089, 2001
- Bush, K. The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents. **Curr Opin Investig Drugs**, 3:1284-1290, 2002
- Cantón, R; Coque, T.M. The CTX-M b-lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, 9:466–475,2006
- Carmeli, Y.; Eichelberger, K.; Soja, D.; Dakos, J.; Venkataraman, L.; Degirolami, P.; Samore, M. Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol.**595-597,1998.
- Carmeli, Y.; Troillet, N.; Eliopoulos, G. Samore, M. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrob Agents Chemother.**1379-1382,1999.
- Castanheira, M.; Mendes, R.; Walsh, T.; Gales, A.; Jones, R. Emergence of the Extended-Spectrum Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram. **Antimicrob. Agents Chemother.**2344-2345,2004.
- Celenza, G.; Pellegrini, C.; Caccamo, M. ; Segatore, B; Amicosante, G.; Perilli, M. Spread of *bla*CTX-M-type and *bla*PER-2 b-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J antimicrob Chemother.** 57: 975–978, 2006.
- Chia, J., Chu, C., Su, L., Chiu, C., Kuo, A., Sun, C., Wu, T. Development of a *Multiplex* PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for Detection of Some SHV and CTX-M β -Lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. **J Clin Microbiol.** 43(9): 4486–4491,2005.

Clinical and Laboratory Standard Methods. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA. CLSI document;:M100–S17, 2007

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.

Dalmarco, E.M, Blatt, S.L, Cordova, C. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs). **RBAC** . 38(3): 171-177, 2006.

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.

Doi, Y.; Ghilardi, A.C.R.; Adams, J. Garcia, D.O.; Paterson, D.L. Co-production of Novel 16S RNAr Methylase RmtD and Metallo-beta-lactamase SPM-1 in a Panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 2006

Doi, Y.; Arakawa, Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. **Clinical Infections Diseases.** 45:88-94. 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.** 2007b

Dropa, M., Balsalobre, C., Lincopan N, Mamizuka E.M., Cassettari, V.C., Matté, G. R., and Matté M. H.. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*SHV-40, *bla*TEM-116 and the class 1 integron-associated *bla*GES-7, Brazil. **Clin Infect Microbiol** 2009 (in press).

Einhorn AE, Neuhauser MM, Bearden DT, Quinn JP, Pendland SL. Extended spectrum beta-lactamases: frequency, risk factors, and outcomes. **Pharmacotherapy.** Jan;22(1):14-20. 2002

Emery, C. L., and L. A. Weymouth.. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. **J. Clin. Microbiol.** 35:2061–2067,1997

Empel, J., Filczak, K., Mrowka, A., Hryniewicz, W., Livermore, D.M., Gniadkowski, M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with PER-1 Extended-Spectrum Lactamase in Warsaw, Poland: Further Evidence for an International Clonal Complex. **J Clin Microbiol**, 45 (9): 2829–2834, 2007

Favero, M.S. Carson, L.A. Bond, W.W. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospital. **Science**, v. 173, p. 836-838, 1971.

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

Gales A C, Jones R N, Turnidge J, Rennie R, Ramphal, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance proGram, 1997-1999. **Clin Infect Dis**, (32 Suppl 2): S146-S155, 2001

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 RNA r methylation. **Antimicrob Agents Chemother**. 47:2565-2571, 2003.

Hancock, R.E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermentative Gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v.27, n. 1, p. 93-99, 1998.

Hasdenir U.O., Chevalier J., Nordmann P, Pages, J.M. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. **J Clin Microbiol** (42): 2701 – 2706, 2004

Helfand MS, Bonomo RA: Extended-spectrum beta-lactamases in multidrug-resistant *Escherichia coli*: changing the therapy for hospital-acquired and community-acquired infections. **Clin Infect Dis**, 43:1415-1416, 2006

Iglewski Bh. *Pseudomonas*. In: Baron S, eds. Medical Microbiology. 4 ed. Texas, Library of Congress, 1996.

Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros.. More extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 35:1697–1704, 1991

Jemima, S. ; Verghese S. *Multiplex PCR for blaCTX-M & blaSHV in the extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Gram-negative isolates.* **Indian J Med Res** 128:313-317, 2008.

Jiang, X.; Zhang, Z.; Li,M.;Zhou,D.; Ruan,F.; Lu,Y. Detection of Extended-Spectrum -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2990–2995, 2006.

Karlowsky, J.; Draghi, D.; Jones, M.; Thornsberry; Fridland, I.R.; Sahm, D. Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrob Agents Chemother.** 47: 1681-1688, 2003.

Kartali, G.; Tzelepi, e.; Pournaras, S.; Kontopoulou, C.; Kontos,F.;Sofianou,D.; Maniatis,A.; Tsakris4, A. Outbreak of Infections Caused by *Enterobacter cloacae* Producing theIntegron-Associated β -Lactamase IBC-1 in a Neonatal Intensive Care Unit of a Greek Hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, p. 1577–1580.2002.

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.; Hamzhepour, 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, 1999.

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.** May; 60(1): 19-26, 2005.

Laraki, N; Franceschini, N.;Rossolini G.M.; Santucci P, Meunier, C; de Pauw E, Amicosante G, Frere J M, Galleni M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas*

aeruginosa 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother** (43): 902-906,1999

Li X Z, Ma D, Livermore D M, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother** (38): 1742 – 1752, 1994

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.

Lincopan, N. E. H. ; Mamizuka, E. M. Resistência bacteriana a antibióticos. In: amato neto vicente; nicodemo, Antonio Carlos; lopes, Hélio Vasconcelos. (Org.). Antibióticos na Prática Médica. 6 ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, , v. 1, p. 43-67, 2007

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: Microbiologia .5 edição. Ateneu, 2006.

Lincopan, N.; Neves, P.; Mamizuka, E.; Levy, C.E. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S RNAr methylase in pediatric patients with underlying hematological malignancy. **Int J Infect Dis** 2009 (in press).

Livermore, D. Beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. **J Clin Microbiol**. 8:557-584, 1995.

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.

Medeiros A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clin Infect Dis**. Jan;24 Suppl:S19-45, 1997

Mingeot - Leclercq M - P , Glupczynski Y & Tulkens P M . Aminoglycosides : activity and resistance . **Antimicrob . Agents Chemother** . 43 : 727 – 737,1999

Moland, E. S., C. C. Sanders, and K. S. Thomson. Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of B-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam? **J. Clin. Microbiol.** 36:2575–2579. 1998

Moolenaar, R. L. *et al.* A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? **Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 80-85, 2000.

National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standards NCCLS document M7–A4. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.

Navon-Venezia, S. *et al.* Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum B-lactamases among members of the family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv medical center (Israel) and evaluation of diagnostics tests. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 155-158, 2003.

Neves, P. R. ; Silva, M.T. N. ; Antonio, C.S. ; Pavez, M. A. A. ; Noronha, M. C. A. ; Atobe, J. ; Cassetari, V. C. ; Martinez, M. B. ; Levy, C. E. ; Mamizuka, E. M. ; Lincopan, N. Co-Produção De Metilases RNAr 16s E Metalo-Beta-Lactamases Em Isolados Clínicos Multirresistentes De *Pseudomonas aeruginosa* Disseminados Em São Paulo, Brasil. In: 24º Congresso Brasileiro De Microbiologia, 2007, Brasília. XXIV Congresso Brasileiro De Microbiologia, 2007.

Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. **Clin Infect Dis** (27 suppl 1): S32 – S41, 1998

Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J Biol Chem** (269): 3905 – 3908,1994

Nikaido, H.; Nikaido, K.; Harayama, S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Biol Chem.** 266: 770-779, 1991.

Paterson D.L, Bonomo R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**,18:657-686, 2005

Pfaller,M.; Jones,R.;Doern,G.;Kugler,K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from SENTRY antimicrobial surveillance program(United States and Canada,1997). **Antimicrob Agents Chemother**.1762-1770, 1998.

Pellegrino, F.L.C.; Santos,K.R.;Riley,L.W.;Moreira,B.M. *bla*GES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect.Diseases**.10(4):251-253,2006.

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.

Perez, F.; Endimian, A.; Bonomo,R. The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion in Pharmacology**, 7:459–469,2007

Picão, R.C.; Poirel, L.; Gales, A.C.; Nordmann, P. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**. 53: 2225-2226, 2009 .

Pier, G., Ramphal, R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MandellG, Bennett J, Dolin R. eds. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livinstone; p. 2587-2615, 2005.

Piddock, L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**. Apr; 19(2): 382-402, 2006.

Poirel, L.;Decousser, J.W.;Nordmann, P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*CTX-M B-lactamase gene. **Antimicrob Agents Chemother**. 47:2938-2938, 2003.

Poirel,L.;Lebessi,E.;Castro,M.;Fevre,C.;Foustoukou,M.;Nordmann,P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. **Antimicrob Agents Chemother**. 48(5):2277-2279, 2004.

Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. Genetic support of extended-spectrum B-lactamases. **Clin Microbiol Infect.** 14(suppl.1):75-81, 2008

Poirel, L.; Menuteau, N.; Agoli, N.; Cattoen, C.; Nordmann, P. Outbreak of extended spectrum beta-lactamases VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. **J Clin Microbiol.** 41:3542 – 3547, 2003.

Poirel, L.; Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; Nordmann, P. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum b-Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, Mar., p. 622–632, 2000

Pollack M. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev Infect Dis;** (6 Suppl 3): S617 – S626, 1984

Poole K . 2005 . Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* . **Antimicrob Agents Chemother** . 49 : 479 - 487

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.

Renders, N.; Römling, U.; Verbrugh, H.; Van Belkum, 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.

Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, Perez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. **J Clin Microbiol**, 42:1089-1094, 2004

Rupp, M.E. And 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.; 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.

Santucci, S.G. *et al.* Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. **J Hospital Infect**, v.53, p. 6-13, 2003.

Schwaber, M. J. *et al.* Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-Spectrum B-lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microb**, v. 42, p. 294-298, 2004.

Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. **Crit Rev Microbiol.**;30(1):25-32, 2004

Silva, M. T. N. ; Lincopan,N. ; Mamizuka,E.M. . Disseminação De Genes *Blactx-M* Em Isolados Clínicos De *Pseudomonas aeruginosa* No Brasil. In: XI Congresso Brasileiro De Controle De Infecção Hospitalar, 2008, Rio De Janeiro. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**. Salvador : Contexto,. V. 12. P. 25-25, 2008

Spratt B G, Cromie K D. Penicillin – binding proteins of Gram-negative bacteria. **Rev Infect Dis** (10): 699-711,1988

Steward CD, Wallace D, Hubert SK, Lawton R, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. **Diagn Microbiol Infect Dis**. Sep;38(1):59-67,2000

Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J Infect**. Nov;47(4):273-95,2003

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.

Thomson, K. S. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 333-336, 2001.

Toleman, M.A. Genetic characterization of a novel metallo- B-lactamase gene, *blaIMP-13*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 583-590, 2003.

Toleman M., Bennett, P.M., Walsh, T.R. ISCR elements: novel gene-capturing system of the 21st century? **Microbiol Mol Biol Rev.**70:296-316, 2006a.

Toleman M., Bennett, P.M., Walsh, T.R. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. **J antimicrob Chemother.** 58: 1-6, 2006b.

Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.. *Microbiologia*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

Tzelepi, E.;Giakkoupi, A.; Sofianou, D.;Loukova,V.;Kemeroglou,A.; Tsakris, A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. **J. Clin. Microbiol.**38:542–546,2000.

Varela, C. *et al.* Prevalence of extended-spectrum B-lactamases in group-1 beta-lactamases-producing isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 278-282, 2001.

Xu, L., Ensor V., Gossain S., Nye , K. , Hawkey, P. Rapid and simple detection of *bla*_{CTX-M} genes by *multiplex* PCR assay. **J Med Microbiol** 54:, 1183-1187,2005

Walsh, T.R. *et al.* Metallo-B-Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 306-325. 2005.

Wang, C.;Cai,P.;Chang,D.;Mi,Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother.** 1261-1262, 2006.

Win, Jr. W. *et al.* Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 6nd ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins,. p. 316-326, 2006

Weldhagen,G.F. Sequence-Selective Recognition of extended-spectrum beta-lactamase GES-2 by a combinative, peptide nucleic acid-based *multiplex* PCR assay. **Antimicrob Agents Chemother.**3402-3406, 2004.

Weldhagen,G.F.; Poirel,L.; Nordmann, P. Ambler Class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel development and clinical impact. **Antimicrob Agents Chemother.** 47(8):2385-2391, 2003.

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.

Wright GD: The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nat Rev Microbiol**, 5:175-186, 2007

Yamane,K.;Wachin,J.;Suzuki,S.;Shibata,N.;Kato,H.;Shibayama,Kkimura,K.;Kai,K.;Ishikawa,S.;Ozawa,Y.;Konda,T.;Arakawa,Y. 16S RNAr Methylase-producing, Gram-negative Pathogens, Japan. **Emerging Infectious Diseases**. 13:642-646,2007.

Yamane K, Rossi F, Barberino MG, Adams-Haduch JM, Doi Y, Paterson DL. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**. Mar;61(3):746-7,2008.

Yan, J.J.; Tsai,S.H.; Chuang, C.L.; Wu, J.J. Oxa-type beta lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**. 39:130-134, 2006.

Yokoyama,K.;Doi,Y.;Yamane,K.Acquisition of 16S r RNA methylase in *Pseudomonas aeruginosa*.**Lancet**.362:1888-1893.

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.; 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.

Young,L.;Wenzel,R.;Sabath, L.;Pollack,M.;Pennington,J.;Platt,R. The outlook for prevention and treatment of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev Infct Dis**. 769-774, 1984.

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**. Oct; 25(10): 805-807, 2004.