UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Carbapenemases novas ou emergentes em *Pseudomonas aeruginosa*

Aline Valério de Lima

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Carbapenemases novas ou emergentes em *Pseudomonas aeruginosa*

Aline Valério de Lima

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L 732c

Lima, Aline Valério de
Carbapenemases novas ou emergentes em Pseudomonas aeruginosa / Aline Valério de Lima. - São Paulo, 2019.
69 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Carbapenemases. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Pseudomonas aeruginosa. I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello, orientador.

Aline Valério de Lima

Carbapenemases novas ou emergentes em *Pseudomonas aeruginosa*

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
orientador/presidente

_____
1o. examinador

_____
2o. examinador

_____
3o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)"

Dedico este trabalho a minha mãe Elenice e avó Georgina, "in memoriam", pelo exemplo e amor incondicional que sempre demonstraram em vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o autor da vida.

Ao meu pai e aos meus irmãos, por todo o amor e por sempre me apoiarem nas minhas escolhas.

Ao meu namorado Antonio, pelo amor, amizade, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

As minhas amigas Marcelle, Rafaela e Carol, pela amizade e companheirismo sempre.

À minha tia Mirian, por ter me acolhido em sua casa durante o período de mestrado.

À Suely, Darlan e Juliana, pelo ensino, colaboração e apoio no desenvolvimento deste projeto.

À técnica Fabiana e mestranda Keila, pelo convívio diário, amizade e parceria construída.

À minha querida professora Elisabete, pelo ensino e amizade, pelos seus conselhos e por ser uma grande incentivadora dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, pela oportunidade, ensino, paciência, pela sua inteira disponibilidade e incentivo. Sua ética, amor e compromisso com o ensino me inspiram.

Ao Instituto Fleury por disponibilizar os isolados para a realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

“Ser um empreendedor é executar os sonhos, mesmo que haja riscos. É enfrentar os problemas, mesmo não tendo forças. É caminhar por lugares desconhecidos, mesmo sem bússola. É tomar atitudes que ninguém tomou. É ter consciência de que quem vence sem obstáculos triunfa sem glória. É não esperar uma herança, mas construir uma história...”

Augusto Cury

RESUMO

LIMA, A. V. **Carbapenemases novas ou emergentes em *Pseudomonas aeruginosa***. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Pseudomonas aeruginosa é um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde em todo o mundo. O tratamento empírico de infecções graves causadas por esta espécie usualmente inclui os carbapenêmicos. Essa terapia, se inadequada, está relacionada a um aumento significativo da mortalidade. Os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em bacilos Gram-negativos são a redução da permeabilidade da membrana externa, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de betalactamases, sendo este último, o mais eficiente. O objetivo deste trabalho consistiu na caracterização de carbapenemases novas ou emergentes e seu contexto genético em *P. aeruginosa.* Foram utilizados 11 isolados de *P. aeruginosa* capazes de hidrolisar o imipenem em ensaio espectrofotométrico e negativos para genes de carbapenemases conhecidos e uma cepa produtora de KPC-2. Tais isolados foram submetidos à confirmação do perfil de resistência aos carbapenêmicos pelos métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo (CIM), bloqueio enzimático com EDTA e Blue-Carba. O perfil plasmidial foi avaliado utilizando-se os métodos de lise alcalina e eletroforese em campos pulsados (PFGE). Os genomas foram sequenciados utilizando-se o sistema MiSeq. O perfil clonal dos isolados foi avaliado por PFGE e *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Dez isolados apresentaram Blue-Carba negativo, compatível com a presença de carbapenemases fracas. Quatro isolados apresentaram plasmídeos, visualizados em gel de agarose após PFGE. Os plasmídeos do isolado D5303023 foram eletroporados em *E. coli* TOP 10 e selecionados em meio LB contendo 1µg/mL imipenem, contudo não foram obtidos transformantes. A análise por PFGE identificou sete grupos clonais distintos. Quanto à tipagem por MLST, foi detectado um novo tipo ST3187 e os ST277 e ST1560 foram os predominantes. O isolado D9203039 apresentou uma carbapenemase GES-20 associada a uma betalactamase de espectro estendido GES-19, sendo os genes que as codificam localizados no integron In*724*. Esse isolado pertence ao ST309, clone de potencial alto risco, associado ao fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos no México. O genoma da cepa positiva para KPC-2 foi digerido com a S1 nuclease e submetido à PFGE, evidenciando um plasmídeo de aproximadamente 453 kb. Após análise do sequenciamento confirmou-se que a cepa pertence ao ST446 e foi observada a presença do gene bla_{KPC-2} em um *contig* de 128.487 bp. Este *contig* apresentou 99,9% de similaridade com o plasmídeo 1 da cepa *P. aeruginosa* RW109; no entanto, ensaios de conjugação bacteriana falharam em obter colônias de transconjugantes. O gene bla_{KPC-2} foi encontrado flanqueado à montante por uma estrutura truncada de um transpóson da família Tn3 e à jusante por uma ISKpn6 truncada. As análises das sequências de DNA das demais cepas evidenciaram a presença de sequências gênicas, que traduzidas, apresentavam similaridade para sete metalobetalactamases (MBL), indicando a potencial presença de novos genes de carbapenemases. Foi caracterizada pela primeira vez no Brasil cepa produtora da carbapenemase GES-20 e o novo ST3187. Foram detectados potenciais novos genes de carbapenemases. O gene bla_{KPC-2} no isolado J5083553 tem provável localização plasmidial.

Palavras-chave: carbapenemases; resistência antimicrobiana; *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

LIMA, A. V. **New or emerging carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa*.** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Pseudomonas aeruginosa is a major agent of healthcare-related infections worldwide. Empirical treatment of serious infections caused by this species usually includes carbapenems. This therapy, if inadequate, is related to a significant increase in mortality. The main mechanisms of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria are the reduction of outer membrane permeability, overexpression of efflux pumps and beta-lactamase production, the latter being the most efficient. The aim of this work was the characterization of new or emerging carbapenemases and their genetic context in *P. aeruginosa.* Eleven *P. aeruginosa* isolates capable of hydrolyzing imipenem in spectrophotometric assay and negative for known carbapenemases genes were used, as well as a KPC-2 producing strain. These isolates were subjected to confirmation of carbapenem resistance profile by disk diffusion, broth microdilution (MIC) and enzyme inhibition by EDTA and Blue-Carba methods. Plasmid profile was evaluated using alkaline lysis and pulsed field electrophoresis (PFGE) methods. Genomes were sequenced using the MiSeq system. The clonal profile of the isolates was evaluated by PFGE and Multilocus Sequence Typing (MLST). Ten isolates presented negative Blue-Carba, compatible with the presence of weak carbapenemases. Four isolates presented plasmids visualized on agarose gel after PFGE. The plasmids of isolate D5303023 were electroporated into *E. coli* TOP 10 and selected in LB medium containing 1 µg/mL imipenem, however no transformants were obtained. The PFGE analysis identified 7 distinct clonal groups. As for MLST typing, a new type ST3187 was detected and the ST277 and ST1560 were the predominant types. The genome of the KPC-2 positive strain was digested with S1 nuclease and subjected to PFGE, evidencing a plasmid of approximately 453 kb. Isolate D9203039 presented a GES-20 carbapenemase associated with a GES-19 extended spectrum beta-lactamase. The genes encoding them were located in the In*724* integron. This isolate belonged to ST309, a potential high risk clone, associated with the multidrug resistant strain in Mexico. After sequencing it was confirmed that the strain belongs to ST446 and it was observed the presence of the bla_{KPC-2} gene in a contig of 128,487 bp. This contig was 99.9% similar to plasmid 1 of the *P. aeruginosa* RW103 strain. However, bacterial conjugation assays failed to obtain transconjugant colonies. The bla_{KPC-2} gene was found flanked upstream by a truncated structure of a Tn3 family transposon and downstream by a truncated ISKpn6. DNA sequence analysis of the other strains showed the presence of gene sequences, which translated, showed similarity to seven metallo-beta-lactamases (MBL), indicating the potential presence of new carbapenemase genes. It was characterized for the first time in Brazil carbapenemase producing strain GES-20 and the new ST3187. Potential new carbapenemase genes were detected. The bla_{KPC-2} gene in isolate J5083553 has plasmid localization.

Keywords: carbapenemase; antimicrobial resistance; *P. aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características estruturais dos antibióticos carbapenêmicos.....14
Figura 2 - Classificação molecular e funcional das principais betalactamases 18
Figura 3 - Diferenças estruturais entre os dois primeiros plasmídeos de *P. aeruginosa* albergando o gene bla_{KPC-2} descritos na literatura 19
Figura 4 - Comparação do entorno do gene bla_{KPC} em plasmídeos de *P. aeruginosa* depositados no GenBank 28
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 0,7% 41
Figura 6 - Eletroforese em Campos Pulsados em gel de agarose 1% 41
Figura 7 - Perfil clonal e MLST dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.....44
Figura 8 - Amplificação do entorno dos genes bla_{GES-19} e bla_{GES-20} 45
Figura 9 - Estrutura do integron de classe 1 do isolado D9203039.....46
Figura 10 - Comparação do entorno dos genes bla_{GES-19} e bla_{GES-20} do isolado D9203039 em integrons de classe 1 disponíveis no GenBank 46
Figura 11 Alinhamento da sequência nucleotídica parcial do isolado J5083553 com aquela da isoforma TnSwi1 de Tn3.....48
Figura 12 - Contexto genético do gene bla_{KPC-2} no isolado J5083553.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primeira descrição de variantes de carbapenemases de classe A em *P. aeruginosa*.....20
Tabela 2 - Primeiro relato de variantes de carbapenemases de classe B em *P. aeruginosa*.....23
Tabela 3 - Carbapenemases em *P. aeruginosa* descritas no Brasil.....27
Tabela 4 - Controles e cepas de referência utilizados para garantia da qualidade ...30
Tabela 5 - Programação para ensaio de PCR em termociclador 37
Tabela 6 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do entorno dos genes.....39
Tabela 7 - Resultados de testes fenotípicos para detecção de carbapenemases.....40
Tabela 8 - Determinação da CIM e comparabilidade com teste de hidrólise para imipenem e análise dos *contigs* pelo programa CARD/RGI 42
Tabela 9 - Alinhamento do *contig* do isolado J5083553 contendo o bla_{KPC-2} com sequências nucleotídicas de *P. aeruginosa* disponíveis no GenBank.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	Adelaide imipenemase
AmpC	Cefalosporinase cromossômica do tipo C
bla	gene de betalactamase
Bla2	Enzima *Bacillus anthracis*
BrCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CAM	Central Alberta Metalobetalactamase
CAU-1	Enzima *Caulobacter crescentus*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DHP-1	Dehidropeptidase I
DIM	Dutch imipenemase
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	Betalactamase de espectro estendido
FC	Fibrose Cística
FIM	Florence Imipenemase
GES	Guiana de espectro estendido
GIM	German imipenemase
HMB	Hamburg metalobetalactamase
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas
IMI	Betalactamase que hidrolisa imipenem
IMP	Imipenemase
In	Integron
Inc	Grupo de Incompatibilidade
IS	Sequência de Inserção
KHM	Kyorin University Hospital Metalobetalactamase
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
MBL	Metalobetalactamase
MDR	Multidrug-resistant

MH	Mueller-Hinton
MHCA	Mueller-Hinton cátion ajustado
MLST	Multilocus sequence typing
MSI-1	Enzima *Massilia oculi*
NDM	New Delhi metalobetalactamase
NMC	Não metalo carbapenemase
OXA	Oxacilinase
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEDO-1	Enzima *Pedobater roseus*
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RND	Resistance-nodulation-division
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFC	Carbapenemase *Serratia fonticola*
SIM	Seoul imipenemase
SME	Enzima *Serratia marcescens*
SOC	Super Optimal Broth
SPM	São Paulo metalobetalactamase
ST	Sequence Typing
THIN-B	Enzima *Janthinobacterium lividum*
TMB	Tripoli metalobetalactamase
Tn	Transpóson
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona imipenemase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS 14
1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM *Pseudomonas aeruginosa* 15
1.2.1 Carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa* 17
1.2.1.1 Carbapenemases de Classe A 18
1.2.1.2 Carbapenemases de Classe B 21
1.2.1.3 Carbapenemases de Classe D 25
1.3 DESCRIÇÃO DE CARBAPENEMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* NO BRASIL 25
2 MOTIVAÇÃO 29
3 OBJETIVOS 29
3.1 OBJETIVO GERAL 29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29
4 MATERIAIS E MÉTODOS 30
4.1 ISOLADOS BACTERIANOS 30
4.2 CONTROLE DE QUALIDADE 30
4.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS 30
4.3.1 Método de disco-difusão 30
4.3.2 Método de microdiluição em caldo 31
4.3.3 Teste fenotípico para detecção de carbapenemases 31
4.4 PERFIL PLASMIDIAL 32
4.4.1 Extração de DNA plasmidial 32
4.4.1.1 Preparo de células competentes 33
4.4.1.2 Eletroporação em *E. coli* TOP10 e seleção de transformantes 33
4.4.2 Ensaio de conjugação 34
4.4.3 Método para detecção de grandes plasmídeos 34
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO 35
4.6 PREPARO DE BIBLIOTECAS, SEQUENCIAMENTO NO SISTEMA MiSEQ, MONTAGEM DOS GENOMAS E DETECÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE CARBAPENEMASES 36
4.7 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS DE MLST 38

4.8 PERFIL CLONAL POR ELETROFORESE EM CAMPOS PULSADOS (PFGE) 38
4.9 DETERMINAÇÃO DO CONTEXTO GENÉTICO DOS ISOLADOS D9203039 e J5083553 39
4.10 CONFIRMAÇÃO DO CONTEXTO GENÉTICO DO ISOLADO D9203039 .39
5 RESULTADOS 40
5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS 40
5.2 PERFIL PLASMIDIAL 40
5.3 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO 42
5.4 PERFIL CLONAL 44
5.5 ISOLADO DE *Pseudomonas aeruginosa* D9203039 45
5.5.1 Entorno dos genes *bla*$_{ges-19}$ E *bla*$_{ges-20}$ 45
5.5.2 Estrutura do integron de classe 1 45
5.5.3 Alinhamento do integron de classe 1 com sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank 46
5.6 ISOLADO DE *Pseudomonas aeruginosa* J5083553 47
5.6.1 Alinhamento do *contig* contendo o gene *bla*$_{KPC-2}$ no BLAST 47
5.6.2 Entorno do gene *bla*$_{KPC-2}$ no isolado J5083553 47
6 DISCUSSÃO 50
7 CONCLUSÕES 54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

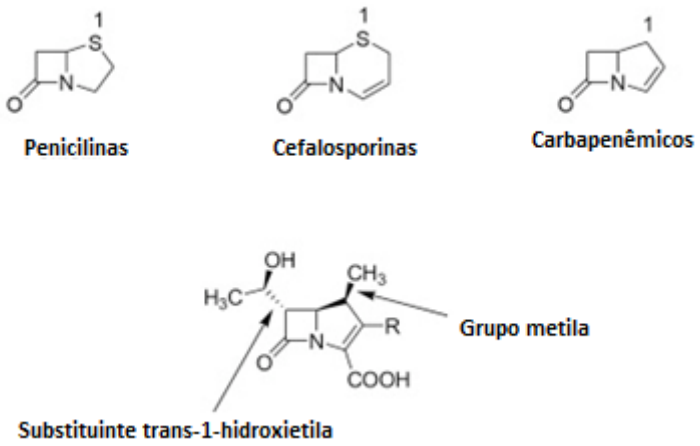
1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS

Os betalactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados em todo o mundo e incluem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Caracterizam-se pela presença, em sua estrutura química, do anel betalactâmico, responsável pela sua ação antimicrobiana (MELETIS, 2016). Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), enzimas que catalizam a formação de peptidoglicano na parede celular bacteriana. Possuem diferentes espectros de ação e diferem quanto ao grau de estabilidade frente às betalactamases devido às suas diferenças estruturais.

Os carbapenêmicos possuem estrutura química semelhante à das penicilinas, diferenciando-se pela dupla ligação nos carbonos 2 e 3 e pela presença do carbono ao invés do enxofre na posição 1 do anel. Este carbono é importante para a potência, espectro de atividade e estabilidade dos carbapenêmicos frente às betalactamases. Além disso, os carbapenêmicos possuem um substituinte trans-1-hidroxietila ao invés do substituinte aminoacil no anel betalactâmico, desempenhando um papel na resistência à hidrólise pelas carbapenemases e demais betalactamases (EL-GAMAL et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Características estruturais dos antibióticos carbapenêmicos



Fonte: Adaptado de El-Gamal et al. (2017).

Os primeiros carbapenêmicos isolados de *Streptomyces* sp. eram instáveis devido à hidrólise pela enzima renal, a dehidropeptidase I (DHP-I). Por essa razão, a apresentação farmacêutica do imipenem, primeiro carbapenêmico disponível para uso clínico, contém um inibidor de DHP-I, a cilastatina. Posteriormente, outros carbapenêmicos, incluindo meropenem, ertapenem e doripenem, foram desenvolvidos para uso clínico. Diferentemente do imipenem, esses carbapenêmicos possuem um grupo metila no C1, o que lhes confere estabilidade frente à DHP-1, não necessitando de inibidores do tipo cilastatina (BUSH; BRADFORD, 2016).

Em bactérias Gram-negativas, as betalactamases são o principal mecanismo de resistência aos betalactâmicos. Os genes que codificam essas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em elementos genéticos móveis (plasmídeos ou transpósons). Um número crescente de genes de betalactamases (*bla*) têm sido encontrados em integrons, elementos genéticos de tamanho variável que contêm um gene de integrase conservada no segmento 5' *(int),* cassetes de genes de resistência a antibióticos, e um sítio de integração para o cassete gênico (*attI)*. Elementos genéticos móveis que contêm integrons são importantes fontes de disseminação de genes *bla* e de outros determinantes de resistência (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006).

1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo ubíquo na natureza e um microrganismo oportunista capaz de causar diversas infecções, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Tem papel principal na morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC) e é um dos principais agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde em todo o mundo. O tratamento empírico de infecções graves causadas por esta espécie usualmente inclui os carbapenêmicos. Essa terapia, se inadequada, está relacionada a um aumento significativo da mortalidade. (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Esse microrganismo entrou para a lista de prioridades globais de bactérias resistentes aos antimicrobianos, sendo considerada prioridade número 1

(crítico) juntamente com o *Acinetobacter baumannii* e as *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Possui resistência intrínseca a uma ampla variedade de antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, fluorquinolonas e betalactâmicos. Os principais mecanismos de resistência incluem a baixa permeabilidade de membrana externa, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de betalactamases (SHERRATT, 1974).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas atua como uma barreira seletiva para a absorção de muitos compostos. A permeabilidade é controlada pela presença de porinas presentes na membrana externa, que permitem a difusão passiva de solutos hidrofílicos pela membrana. Em *P. aeruginosa*, a permeabilidade da membrana externa representa cerca de 8% da *Escherichia coli*, devido ao número limitado de grandes porinas, como OprF, e canais estreitos de outras porinas que medeiam a passagem de substâncias específicas, como OprD e OprB. A OprD é a principal porina responsável pela absorção dos carbapenêmicos. Eventos mutacionais que provoquem a repressão ou inativação dessa proteína pode levar a resistência ao imipenem e susceptibilidade reduzida para meropenem (CHEVALIER et al., 2017).

Os sistemas de bombas de efluxo constituem um dos principais mecanismos de multirresistência em *P. aeruginosa*. São agrupados em cinco famílias, sendo a RND (*"resistance-nodulation-division"*), uma família que desempenha um papel importante na resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas. Dentro desse grupo, a bomba de efluxo MexAB-OprM possui um alto nível de expressão em *P. aeruginosa,* contribuindo para resistência intrínseca ou susceptibilidade reduzida a diversos antimicrobianos (GUTIERREZ et al., 2007; PAN et al., 2016). A superexpressão de MexAB-OprM tem sido associada a mutações no gene *mex*R, que codifica o repressor desse sistema de efluxo (FERNANDO; KUMAR, 2013).

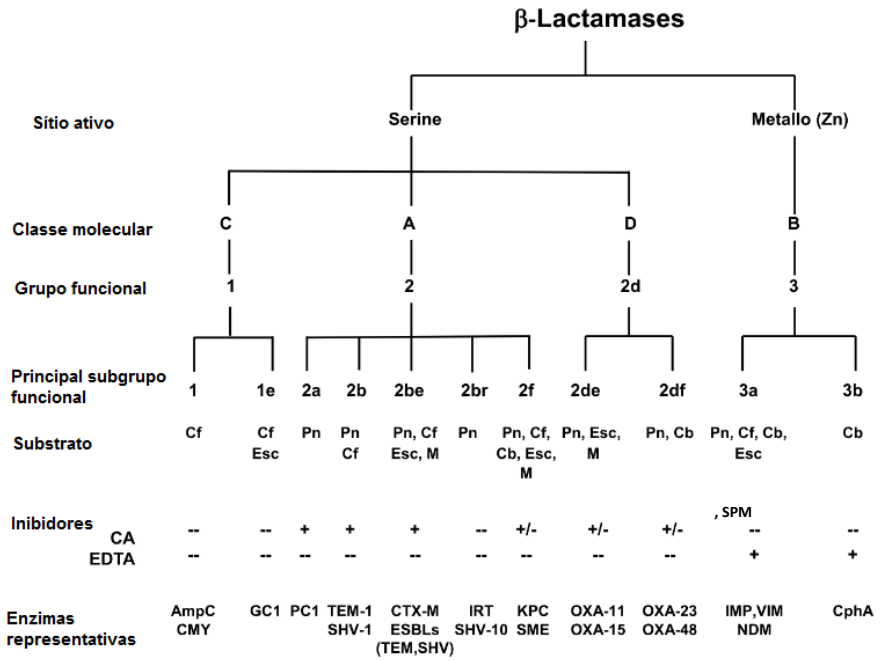
Assim como outras espécies Gram-negativas, a *P. aeruginosa* possui um gene cromossômico indutível, bla_{AmpC}, que codifica uma betalactamase capaz de hidrolisar aminopenicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração (BERRAZEG et al., 2015). A expressão dessas enzimas pode ser induzida pelo uso de betalactâmicos, como cefoxitina e imipenem, podendo levar à falha terapêutica durante o tratamento com esses antimicrobianos devido à seleção de mutantes resistentes que apresentam altos níveis constitutivos de produção de AmpC. A

hiperprodução dessa enzima é uma das principais causas de resistência às penicilinas antipseudomonas (ticarcilina e piperacilina), monobactâmicos (aztreonam) e cefalosporinas de terceira e quarta gerações (ceftazidima e cefepima) (BERRAZEG et al., 2015; JUAN et al., 2005). Diversas variantes dessa enzima já foram identificadas, sendo nomeadas de acordo com uma nomenclatura específica, Cefalosporinase Derivada de *Pseudomonas* (PDC). Alguns estudos apontam que a superexpressão dessas enzimas podem contribuir para a diminuição da susceptibilidade ao imipenem (RODRIGUEZ-MARTINEZ; POIREL; NORDMANN, 2009).

1.2.1 Carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa*

Existem dois sistemas de classificação das betalactamases em uso atualmente. A classificação molecular, proposta por Ambler (1980) baseia-se na sequência de aminoácidos e agrupa as betalactamases em enzimas de classe A, C e D, que possuem resíduos de serina em seu centro ativo, e as metalobetalactamases (MBL) de classe B, que requerem íons zinco como cofator para a hidrólise do anel betalactâmico. A classificação funcional, inicialmente proposta por Bush (1989) e expandida em 1995 e 2010 leva em conta os perfis de substrato e inibidores na tentativa de agrupar as enzimas de maneira que possam ser correlacionadas com seu fenótipo em isolados clínicos, sendo divididas em grupos (1-4) e subgrupos (a-f). As enzimas com atividade de carbapenemases estão incluídas nas classes A, B e D de Ambler e dentro dos subgrupos funcionais 2f, 2df, 3a e 3b de Bush e Jacoby (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995) (Figura 2).

Figura 2 - Classificação molecular e funcional das principais betalactamases



Abreviações: Cb: carbapenêmicos; Cf: cefalosporinas; A.C: Ácido clavulânico; EDTA: ácido etienodiamino tetra-acético; Esc: cefalosporinas de espectro estendido; M: monobactam; Pn: penicilinas. Fonte: adaptado de Bush (2013).

1.2.1.1 Carbapenemases de Classe A

As carbapenemases da classe molecular A de Ambler são serino-carbapenemases e correspondem ao grupo funcional 2f. Os genes que as codificam podem estar localizados no cromossomo (NMC, SME, IMI-1, SFC-1) ou em plasmídeos (KPC, IMI-2, GES), sendo parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico (DJAHMI et al., 2014).

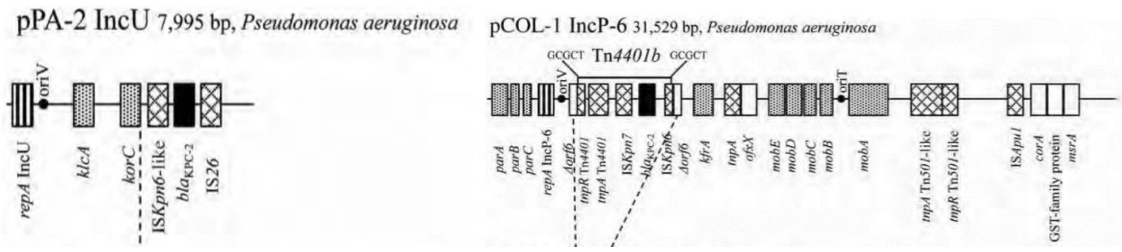
As KPCs (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são as enzimas mais frequentes nesse grupo. Foi isolada pela primeira vez de uma cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae*, na Carolina do Norte em 1996. São codificadas pelos genes bla_{KPC}, geralmente inseridos dentro do transpóson Tn*4401* localizado em plasmídeos conjugativos (DJAHMI et al., 2014). Até o momento, duas variantes dessa enzima foram relatadas em *P. aeruginosa (*KPC-2 e KPC-5), sendo a KPC-2 a enzima mais frequente (Tabela 1).

Entre outubro de 2006 a março de 2007, em um estudo sobre vigilância de isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos de hospitais do Centro Médico de Porto Rico, foi identificado a primeira variante, KPC-5, em *P. aeruginosa*.

(WOLTER; KHALAF; et al., 2009). A caracterização do contexto genético desse isolado demonstrou que o gene *bla*$_{KPC-5}$ foi localizado associado a sequência de inserção IS*600* e ao Tn*5563 (*WOLTER; KURPIEL; et al., 2009*)*

Em 2006, o primeiro isolado clínico de *P. aeruginosa* produtor de KPC-2 foi identificado em Medellin, Colômbia (VILLEGAS et al., 2007). Dois plasmídeos diferentes portadores do gene *bla*$_{KPC}$ foram associados aos isolados descritos na Colômbia: o plasmídeo do tipo IncP-6, com capacidade de se replicar tanto em espécies de *Pseudomonas* sp. quanto em *Enterobacteriaceae,* associado ao Tn*4401* completo; e o plasmídeo do tipo IncU, frequentemente associado à resistência a antibióticos em espécies de *Aeromonas*, contendo uma forma truncada do transpóson Tn*4401* (Figura 3) (NAAS et al., 2013).

Figura 3 - Diferenças estruturais entre os dois primeiros plasmídeos de *P. aeruginosa* albergando o gene *bla*$_{KPC-2}$ descritos na literatura



Fonte: Naas et al. (2013).

Os genes *bla*$_{GES}$ são comumente encontrados como cassetes genéticos de integrons de classe 1, podendo ser transportados por plasmídeos e disseminados entre espécies (STRELING et al., 2018). Quarenta e uma variantes dessa enzima já foram identificadas (http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#GES), diferindo uma das outras por 1 a 3 substituições de aminoácidos que afetam a especificidade quanto ao substrato (BEBRONE et al., 2013). A enzima GES-1 é capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro, mas não imipenem; contudo, já foram descritas variantes dessa enzima com atividade de carbapenemase (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 - Primeira descrição de variantes de carbapenemases de classe A em *P. aeruginosa*

Enzima	Localização/ Elementos de inserção	Ano de isolamento	País	Referência
GES-2	Plasmidial	2000	África do Sul	(POIREL et al., 2001)
GES-5	NR	2004	China	(WANG et al., 2006)
GES-6	InC1/Cromossômica	2012	Portugal	(BOTELHO et al., 2015)
GES-18	InC1/Cromossômica	2010	Bélgica	(BEBRONE et al., 2013)
GES-20	InC1/Cromossômica	2004-2011	México	(GARZA-RAMOS et al., 2015)
GES-24	InC1	2015	Coréia do Sul	(HONG et al., 2016)
KPC-2	Plasmidial	2006	Colômbia	(VILLEGAS et al., 2007)
KPC-5	IS*600*/Tn*5563*	2006-2007	Porto Rico	(WOLTER; KHALAF; et al., 2009) (WOLTER; KURPIEL; et al., 2009)

Abreviações: NR: Não reportado; InC1: integron de classe 1.

A primeira descrição da enzima GES-2 em *P. aeruginosa* se deu em 2000 na África do Sul, a partir de hemoculturas de um paciente que desenvolveu pneumonia nosocomial. Esse isolado continha um plasmídeo de 100kb que albergava o gene de betalactamase, $bla_{GES-2,}$ conferindo um perfil de resistência a cefalosporinas de amplo espectro e imipenem. A sequência de aminoácidos de GES-2 difere de GES-1 por uma substituição de glicina por aspargina na posição 170 de Ambler (POIREL et al., 2001).

O primeiro relato de GES-5 em *P. aeruginosa* se deu em 2004 em Pequim, China, a partir de hemoculturas de um paciente que desenvolveu infecção após sofrer uma queimadura na perna direita. O gene continha três mutações silenciosas comparado ao bla_{GES-5} de *Escherichia coli*. A enzima GES-5 difere de GES-1 por uma substituição de aminoácido de glicina por uma serina na posição 170 de Ambler (WANG et al., 2006).

A enzima GES-18 foi identificada em um isolado clínico de *P. aeruginosa*, a partir de um paciente hospitalizado na Bélgica em 2010. Essa enzima difere de GES-1 por duas substituições de aminoácidos. O gene bla_{GES-18} estava inserido em um integron de classe 1, In*762*, com possível localização cromossômica (BEBRONE et al., 2013).

A variante GES-6 foi identificada pela primeira vez em *P. aeruginosa* em 2012, a partir de um paciente com pneumonia admitido em uma unidade de terapia intensiva de um hospital português. Essa enzima apresentou atividade de carbapenemase, diferindo da GES-1 por apenas 2 substituições de aminoácidos. O

isolado pertencia ao ST235, clone considerado de alto risco. O gene *bla*$_{GES-6}$ foi localizado em um integron de classe 1, In*1076*, no cromossomo (BOTELHO et al., 2015).

A enzima GES-20 foi descrita no México em 2015 entre isolados de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, estando associada com a ESBL GES-19 (GES-19-GES-20) e localizada em 3 diferentes conjuntos de integron de classe 1 (GARZA-RAMOS et al., 2015). Essa enzima difere de GES-5 pela substituição de alanina por uma glicina na posição 17 de Ambler (BARRIOS et al., 2012).

Em 2015, foi identificado um isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperado de um hospital geral na Coréia do Norte. Esse isolado albergava o gene *bla*$_{GES-24}$, responsável pela elevação da CIM para imipenem (CIM, 128 µg/ml) e meropenem (CIM, 64 µg/ml). O gene foi localizado em um integron de classe 1, InGES-24, no cromossomo. A enzima GES-24 difere de GES-1 por duas substituições de aminoácidos (Met62-Thr e Gly170-Ser). Essa última substituição é a mesma encontrada na GES-5, responsável pela alta afinidade aos carbapenêmicos (HONG et al., 2016).

1.2.1.2 Carbapenemases de Classe B

As carbapenemases de classe B de Ambler são MBLs e correspondem ao grupo funcional 3 de Bush e Jacoby. Possuem capacidade de hidrolisar todos os betalactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. São inibidas por agentes quelantes de cátions divalentes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e são fracamente inibidas por tazobactam e ácido clavulânico (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

As MBLs foram inicialmente descritas como enzimas cromossômicas, encontradas em bactérias ambientais ou em patógenos oportunistas, como *Bacteroides fragilis* e *Stenotrophomonas maltophilia* (BUSH; JACOBY, 2010). No entanto, a maioria das enzimas do tipo MBL clinicamente relevantes são encontradas associadas a elementos genéticos móveis. Esse grupo compreende as enzimas do tipo IMP (Imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalobetalactamase), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase), AIM (Adelaide imipenemase), KHM (Kyorin University Hospital metalobetalactamase), HMB (Hamburg MBL), NDM (New Delhi metalobetalactamase), DIM (Dutch

imipenemase) e TMB (Tripoli MBL) (NEVES et al., 2011). Em *P. aeruginosa* já foram descritos MBL do tipo IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, AIM, FIM, HMB e CAM (BOYD et al., 2019; PFENNIGWERTH et al., 2017; HONG et al, 2015; YONG et al., 2012).

A primeira MBL descrita em *P. aeruginosa* foi a IMP-1, sendo detectada no Japão em isolados clínicos resistente aos carbapenêmicos no período de 1992-1994. Quinze linhagens portadoras do gene $bla_{\text{IMP-1}}$ foram identificadas em cinco hospitais em diferentes áreas geográficas. Na maioria dos isolados, o gene foi transportado por grandes plasmídeos (SENDA et al., 1996). Em 1999, a análise do contexto genético de um isolado de *P. aeruginosa* albergando o $bla_{\text{IMP-1}}$ evidenciou o gene em um plasmídeo de 36 kb, compondo um cassete gênico em um integron, In*31,* de classe 1 (LARAKI et al., 1999).

A segunda subclasse de MBL descrita em *P. aeruginosa* foi a VIM-1, sendo identificada em uma cepa isolada no Hospital Universitário de Verona, Itália, em 1997. O gene $bla_{\text{VIM-1}}$ fazia parte de um cassete genético inserido no integron In*70* de classe 1 (LAURETTI et al., 1999).

A SPM-1 foi isolada pela primeira vez em São Paulo, Brasil, a partir de um isolado clínico de *P. aeruginosa* susceptível apenas à polimixina B. A região de inserção correspondente ao gene $bla_{\text{SPM-1}}$ possuía um conteúdo de GC de 47%, distinto do restante do genoma, que apresentava em média conteúdo GC de 66%, sugerindo sua incorporação a essa região. Esse gene encontrava-se em uma ilha de patogenicidade genômica possivelmente localizada em um plasmídeo (TOLEMAN et al., 2002). Outras publicações evidenciaram o gene $bla_{\text{SPM-1}}$ franqueado pelas sequencias de inserção IS*CR4* (PEREIRA, 2017; PICAO et al., 2009; POIREL et al., 2004; TOLEMAN; BENNETT; WALSH, 2006).

A quarta subclasse de MBL foi identificada em 2002 a partir de cinco isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes em Dusseldorf, Alemanha. O gene bla_{GIM} foi encontrado em um plasmídeo não transferível de 22 kb, ocupando a primeira posição em um integron In*77* de classe 1 (CASTANHEIRA et al., 2004).

A quinta subclasse de MBL foi inicialmente detectada em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, na cidade de Adelaide, Austrália em 2002. O gene $bla_{\text{AIM-1}}$ foi localizado no cromossomo bacteriano franqueado por duas cópias (uma intacta e outra truncada) de um elemento de IS*CR*, IS*CR15* (YONG et al., 2012).

A sexta subclasse de MBL em *P. aeruginosa* foi a NDM-1, sendo descrita em 2011 a partir de dois isolados recuperados da Sérvia (JOVCIC et al., 2011). A

análise do contexto genético de um desses isolados foi publicada em 2013. O gene *bla*$_{NDM-1}$ foi encontrado em duplicidade com provável localização cromossômica. As sequências de inserção IS*Aba125* e IS*CR1* foram localizadas a montante das duas cópias do gene (JOVCIC et al., 2013).

Em 2013, a sétima subclasse de MBL adquirida, denomidada FIM-1, foi identificada em Florença, Itália, a partir de um isolado clínico de *P. aeruginosa* multirresistente. Essa MBL possuía 40% de identidade com enzimas do tipo NDM. O gene *bla*$_{FIM}$ estava inserido no cromossomo e associado a sequências de inserção IS*CR19*-like (POLLINI et al., 2013).

Em 2017, foi descrita em *P. aeruginosa* uma nova subclasse de MBL, sendo nomeada HMB-1 (Hamburg MBL). Essa enzima foi identificada em 2012, na Alemanha, a partir de um isolado com CIMs elevadas para os carbapenêmicos. A nova MBL apresentou 74,3% de identidade com a KHM-1. O gene *bla*$_{HMB-1}$ foi localizado no cromossomo bacteriano, fazendo parte de um transpóson da família Tn3 (Tn*6345*) (PFENNIGWERTH et al., 2017).

Recentemente, foi descrita uma nova MBL, CAM-1, em Alberta, Canadá. Essa enzima apresentou identidade de 26-36% com MBL do tipo NDM, SPM, VIM, IMP, GIM, DIM, KHM e SIM. O gene foi localizado em um elemento conjugativo integrativo, denominado IMEPaCAM-1, no cromossomo de quatro isolados clínicos de *P. aeruginosa.* Esses isolados pertenciam ao ST235, um clone de alto risco reponsável por surtos de infecções nosocomiais em todo o mundo (BOYD et al., 2019; MULET et al., 2013).

A partir dos primeiros isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL já identificados, diversas variantes dessas enzimas têm sido descritas (Tabela 2).

Tabela 2 - Primeiro relato de variantes de carbapenemases de classe B em *P. aeruginosa*

Enzima	Localização/ Elementos de inserção	Ano de Isolamento	País	Referência
IMP-1	Plasmidial	1992-1994	Japão	(SENDA et al., 1996)
IMP-2	InC1	2001-2002	Japão	(SHIBATA et al., 2003)
IMP-4	NR	2004	Austrália	(PELEG et al., 2004)
IMP-5	InC1	2001-2003	Portugal	(BRIZIO et al., 2006)
IMP-6	InC1	2004	Coréia	(RYOO et al., 2009)
IMP-7	InC1	1995-1996	Canada	(GIBB et al., 2002)
IMP-8	NR	2009-2012	Alemanha	(WILLMANN et al., 2015)
IMP-9	Intl1/ Plasmidial	2000	China	(XIONG et al., 2006)
IMP-10	InC1	1997-1998	Japão	(IYOBE et al., 2002)
IMP-13	InC1/Tn*5051*/ Cromossômica	2003	Itália	(PAGANI et al., 2005)
IMP-14	InC1	2009	Tailândia	(PIYAKUL; TIYAWISUTSRI; BOONBUMRUNG, 2012)

Continua...

Enzima	Localização/ Elementos de inserção	Ano de Isolamento	País	Referência
IMP-15	InC1/Plasmidial	2003	México	(GARZA-RAMOS et al., 2008)
IMP-16	InC1/Cromossômica	2002	Brasil	(MENDES et al., 2004)
IMP-18	NR	NR	EUA	(HANSON et al., 2006)
IMP-19	InC1/Cromossômica	2009-2016	França	(AMOUREUX et al., 2017)
IMP-22	InC1	2007	Áustria	(DULJASZ et al., 2009)
IMP-25	InC1	2003-2007	China	(YU et al., 2016)
IMP-26	NR	2008	Malásia	(KOH et al., 2010)
IMP-29	InC1/Plasmidial	2010	França	(JEANNOT et al., 2012)
IMP-30	NR	2004	Rússia	(PEGG et al., 2013)
IMP-31	InC1	2010	Alemanha	(PFENNIGWERTH et al., 2015)
IMP-33	InC1/Cromossômica	2009-2010	Itália	(DESHPANDE et al., 2013)
IMP-35	InC1	2005	Alemanha	(POURNARAS et al., 2013)
IMP-43	InC1	2011	Japão	(TADA et al., 2013)
IMP-44	InC1	2011	Japão	(TADA et al., 2013)
IMP-45	InC1/ Plasmidial	2012	China	(LIU et al., 2018)
IMP-48	NR	2012-2014	Tailândia	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
IMP-49	NR	2012-2014	Brasil	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
VIM-1	InC1/Cromossômica	1997	Itália	(LAURETTI et al., 1999)
VIM-2	InC1/Plasmidial	1996	França	(POIREL et al., 2000)
VIM-3	NR	1997-2000	Taiwan	(YAN et al., 2001)
VIM-4	InC1	2001	Grécia	(POURNARAS et al., 2002)
VIM-5	NR	2003	Turquia	(BAHAR et al., 2004)
VIM-6	InC1	2006	Índia	(CASTANHEIRA et al., 2009)
VIM-7	InC1/Plasmidial	1988	EUA	(TOLEMAN et al., 2004)
VIM-8	NR	1997-2003	Colômbia	(CRESPO et al., 2004)
VIM-10	NR	2003-2007	Reino Unido	(WOODFORD et al., 2008)
VIM-11	NR	2002	Argentina	(PASTERAN et al., 2005)
VIM-13	InC1/Cromossômica	2004-2005	Espanha	(JUAN et al., 2008)
VIM-14	InC1	-	Itália	(MAZZARIOL et al., 2011)
VIM-15	InC1/Cromossômica	2006	Bulgária	(SCHNEIDER et al., 2008)
VIM-16	InC1/Cromossômica	2005	Alemanha	(SCHNEIDER et al., 2008)
VIM-17	InC1/Cromossômica	2004-2005	Grécia	(SIARKOU et al., 2009)
VIM-18	InC1	2006	Índia	(CASTANHEIRA et al., 2009)
VIM-20	NR	2008-2009	Espanha	(RIERA et al., 2011)
VIM-28	InC1/Cromossômica	2009-2010	Egito	(EL-MAHDY, 2014)
VIM-36	NR	2009-2011	Bélgica	(CASTANHEIRA et al., 2014)
VIM-37	NR	2009-2011	Polônia	(CASTANHEIRA et al., 2014)
VIM-38	InC1	2011-2012	Turquia	(IRAZ et al., 2014)
VIM-43	NR	2012-2014	Hungria	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
VIM-44	NR	2012-2014	Portugal	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
VIM-45	NR	2012-2014	Tailândia	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
VIM-47	InC1/Cromossômica	2015	Espanha	(ZAMORANO et al., 2016)
NDM-1	IS*Aba125*/ IS*CR1*/ Cromossômica	2011	Sérvia	(JOVCIC et al., 2011) (JOVCIC et al., 2013)
NDM-2	NR	NR	Iraque	(ISMAIL; MAHMOUD, 2018)
SPM-1	Plasmidial	2001	Brasil	(TOLEMAN et al., 2002)
GIM-1	InC1/Plasmidial	2002	Alemanha	(CASTANHEIRA et al., 2004)
AIM-1	IS*CR*, IS*CR15*/ Cromossômica	2002	Austrália	(YONG et al., 2012)
FIM-1	IS*CR19*-like/ Cromossômica	2007	Itália	(POLLINI et al., 2013)
HMB-1	Tn*6345*	2012	Alemanha	(PFENNIGWERTH et al., 2017)
CAM-1	Cromossômica	2008-2009	Canadá	(BOYD et al., 2019)

Abreviações: NR: Não reportado; InC1: Integron de classe 1.

1.2.1.3 Carbapenemases de Classe D

As carbapenemases de classe D, também conhecidas como oxacilinases (OXA), correspondem ao grupo funcional 2df de Bush e Jacoby. O ácido clavulânico e tazobactam possuem atividade variável na inibição dessas enzimas, as quais não são inibidas por agentes quelantes de cátions divalentes (BUSH, 2013).

Existe uma variabilidade de enzimas do tipo OXA com atividade de carbapenemase já descritas, a maioria encontrada no cromossomo de espécies de *Acinetobacter baumannii*. No entanto, genes que codificam oxacilinases podem ser localizados em plasmídeos, a exemplo de bla_{OXA-23}, bla_{OXA-40}, bla_{OXA-58} e bla_{OXA-48}. (EVANS; AMYES, 2014).

Em *P. aeruginosa,* diversas enzimas do tipo OXA já foram descritas; poucas, porém, com atividade de carbapenemase. Uma oxacilinase de ocorrência natural e induzível tem sido descrita. Essa enzima é expressa em níveis baixos e constitutivos em *P. aeruginosa*, possuindo baixa atividade de hidrólise para os carbapenêmicos (GIRLICH; NAAS; NORDMANN, 2004; ZINCKE et al., 2016).

Em 2006, foi publicado o primeiro relato de uma carbapenemase OXA-40 em dois isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes com bronquiectasia crônica atendidos em um hospital no norte da Espanha. O gene foi localizado em um plasmídeo também encontrado em *A. baumannii* (SEVILLANO; GALLEGO; GARCIA-LOBO, 2009; SEVILLANO et al., 2006).

1.3 DESCRIÇÃO DE CARBAPENEMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* NO BRASIL

A SPM-1 é a MBL mais frequente entre isolados de *P. aeruginosa* no Brasil. Em 2002, após a primeira descrição de um isolado de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1, houve a disseminação de um clone epidêmico, a partir de isolados de *P. aeruginosa* coletados de sete centros médicos não relacionados, localizados em cinco estados brasileiros, que foram positivos por PCR para bla_{SPM-1}. Em 2004, o primeiro surto nosocomial no sul do Brasil ocorreu em um hospital de ensino localizado em Porto Alegre (GALES et al., 2003; ZAVASCKI et al., 2005). Desde então, a SPM-1 tem se espalhado por todo o território brasileiro (LABARCA et al., 2016). Existem poucos relatos de disseminação dessa enzima para outras partes do mundo. A primeira descrição deu-se em 2010, a partir de um isolado identificado na

Suíça. Contudo, verificou-se que o paciente havia sido internado no Brasil (SALABI et al., 2010). Posteriormente, em 2013, foi identificado um isolado de *P. aeruginosa* positivo para a carbapenemase SPM-1 no Reino Unido. O gene, $bla_{SPM-1,}$ foi localizando associado a um transpóson, Tn*4371* (LABARCA et al., 2016). Em 2018, nove isolados de *P. aeruginosa,* positivos para bla_{SPM-1}, foram identificados, a partir de lesões de queimaduras de pacientes atendidos em um hospital no Iran (AZIMI; PEYMANI; POUR, 2018).

A detecção de outras carbapenemases da classe A e B de Ambler têm sido esporadicamente descritas. Contudo, observa-se a emergência de carbapenemases do tipo KPC-2 (Tabela 3). O primeiro relato dessa enzima no Brasil se deu em 2010, a partir de dois isolados de *P. aeruginosa* recuperados de secreções traqueais de pacientes atendidos em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital terciário localizado em Recife, Pernambuco (JACOME et al., 2012). Em 2011, a partir de um estudo realizado no Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (ICHC-FMUSP), foi identificado um isolado de *P. aeruginosa* co-albergando três genes de carbapenemases (SPM-1, VIM-2 e KPC-2) recuperado de um paciente submetido a um transplante de células-tronco hematopoiéticas. No ano seguinte, durante um surto na unidade de Transplante de Medula Óssea, foram identificados 19 isolados de *P. aeruginosa* positivos para bla_{SPM-1}. Destes, 10 albergavam ambos os genes, bla_{SPM-1} e bla_{KPC-2}, sendo 6 desses isolados pertencentes ao mesmo clone (RIZEK et al., 2014).

O gene bla_{KPC-2} tem sido encontrado no Brasil em diferentes contextos genéticos. Um estudo publicado em 2015 evidenciou três isolados portadores do gene bla_{KPC} localizada no cromossomo e um isolado albergando o gene em um plasmídeo de ~11kb. As sequências de inserção ISKpn6 foram identificadas flanqueadas à jusante do gene bla_{KPC} em todos os isolados, mas somente o *tnpR* foi detectado à montante do bla_{KPC} na estirpe que albergava o gene em um plasmídeo (CARRARA-MARRONI et al., 2015) . Em 2016 foi descrita a sequência completa de um plasmídeo de 3.562 pb. A cepa foi detectada em 2011 na cidade de Belo Horizonte. O bla_{KPC-2} é o único gene de resistência presente no plasmídeo (GALETTI et al., 2016). Em 2018, foi caracterizada a sequência parcial de um plasmídeo contendo o gene bla_{KPC-2} associado à família de sequências de inserção ISKpn6 e genes reguladores da replicação plasmidial pertencentes ao grupo IncQ1. Os plasmídeos IncQ1 são promíscuos e seu papel na propagação de genes de

resistência tem sido demonstrado em diferentes espécies de bactérias Gram-negativas (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018). No mesmo ano foi publicado outro estudo relatando a presença do gene *bla*$_{KPC}$ associado à sequência de inserção ISKpn com possível localização cromossômica (PETROLI et al., 2018).

Tabela 3 - Carbapenemases em *P. aeruginosa* descritas no Brasil

Enzima	Ano de isolamento	Estado	Referência
KPC-2	2014	Minas Gerais	(DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018)
KPC-2	2008	NR	(PETROLI et al., 2018)
KPC-2	2011	Minas Gerais	(GALETTI et al., 2016)
KPC-2	2010-2012	Paraná	(CARRARA-MARRONI et al., 2015)
KPC-2	1998-2012	São Paulo	(RIZEK et al., 2014)
KPC-2	2010	Pernambuco	(JACOME et al., 2012)
GES-5	2009	São Paulo	(POLOTTO et al., 2012)
GES-5	2005	São Paulo	(PICAO et al., 2009)
GES-5	2001	Maranhão	(FONSECA et al., 2007)
IMP-49	2012-2014	NR	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
IMP-1	2009	São Paulo	(POLOTTO et al., 2012)
IMP-1	2005	São Paulo	(PICAO et al., 2009)
IMP-1	2003-2004	Porto Alegre	(MARTINS, A. F. et al., 2007)
IMP-1	2000-2001	São Paulo	(SADER et al., 2005)
IMP-16	2002	Distrito Federal	(MENDES et al., 2004)
VIM-7	2013	Paraná	(BALERO DE PAULA et al., 2017)
VIM-2	2012-2004	NR	(KAZMIERCZAK et al., 2016)
VIM-2	2000-2001	São Paulo	(SADER et al., 2005)
VIM-2	2006	São Paulo	(FRANCO et al., 2010)
SPM-1	2013	Mato Grosso do Sul	(FERREIRA et al., 2017)
SPM-1	2009-2012	Paraná	(KALLUF et al., 2017)
SPM-1	2003-2012	São Paulo	(NASCIMENTO et al., 2016)
SPM-1	2009-2014	Minas Gerais	(ARAUJO et al., 2016)
SPM-1	2003 2006	Maranhão Rio de Janeiro	(FONSECA et al., 2015)
SPM-1	2008-2009	Sergipe	(COSTA et al., 2015)
SPM-1	2009-2011	Minas Gerais	(DANTAS et al., 2014)
SPM-1	1999-2010	Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro	(SILVA, L. V. et al., 2014)
SPM-1	2009	São Paulo	(POLOTTO et al., 2012)
SPM-1	2002-2009	Pernambuco	(CAVALCANTI et al., 2012)
SPM-1	2004-2006	São Paulo	(FURTADO et al., 2011)
SPM-1	2006	São Paulo	(FRANCO et al., 2010)
SPM-1	2003-2005	Santa Catarina	(SCHEFFER et al., 2010)
SPM-1	2000-2005	São Paulo	(FERNANDES et al., 2010)
SPM-1	2004	São Paulo	(LINCOPAN et al., 2010)
SPM-1	2005	São Paulo	(PICAO et al., 2009)
SPM-1	2005-2007	Goiás	(GONCALVES et al., 2009)
SPM-1	2003-2005	Minas Gerais	(CEZARIO et al., 2009)
SPM-1	1999-2000	Rio de Janeiro	(PELLEGRINO et al., 2008)

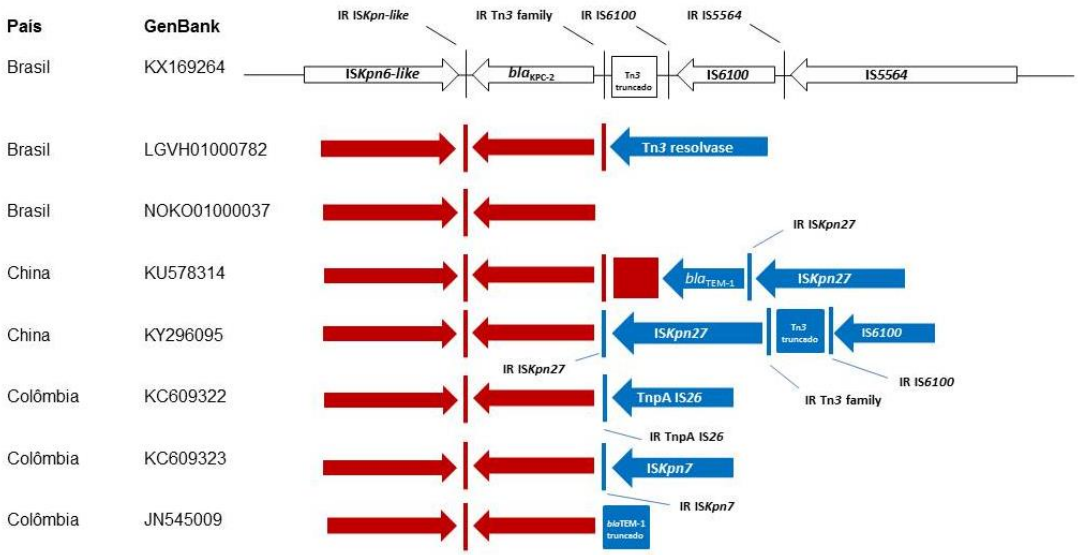
Continua...

Enzima	Ano de isolamento	Estado	Referência
SPM-1	2003-2004	Porto Alegre	(MARTINS, A. F. et al., 2007)
SPM-1	2000-2003	Maranhão	(CIPRIANO et al., 2007)
SPM-1	2005	São Paulo	(DOI et al., 2007)
SPM-1	2000-2001	Rio de Janeiro	(CARVALHO et al., 2006)
SPM-1	1999-2002	Rio de Janeiro	(PELLEGRINO et al., 2006)
SPM-1	2004	Rio Grande do Sul	(ZAVASCKI et al., 2005)
SPM-1	2000-2001	São Paulo	(SADER et al., 2005)
SPM-1	2002-2013	Pernambuco	(POIREL et al., 2004)
SPM-1	2002	Bahia, Paraná, DF, São Paulo, Ceará, Paraná	(GALES et al., 2003)
SPM-1	2001	São Paulo	(TOLEMAN et al., 2002)

Abreviação: NR: Não reportado.

Há três sequências de plasmídeos detectados em *P. aeruginosa*, no Brasil, depositados no GeneBank, sendo duas já descritas em publicações científicas (GALETTI et al., 2016; SANTOS et al., 2018). Comparando-se as sequências dos plasmídeos de *P. aeruginosa*, que albergam o gene bla_{KPC-2}, disponíveis no GeneBank em relação ao plasmídeo KX169264 detectado em São Paulo, há entre eles uma região comum de 2.070 pares de bases contendo o gene bla_{KPC-2} e a porção 3´ da ISKpn6 (Figura 4). As demais estruturas do Tn*4401* não são comuns a todos os plasmídeos.

Figura 4 - Comparação do entorno do gene bla_{KPC} em plasmídeos de *P. aeruginosa* depositados no GenBank



Legenda: As regiões em vermelho representam estruturas idênticas.
Fonte: Produzida pelo autor.

2 MOTIVAÇÃO

Em estudo recente de prevalência de carbapenemases, nosso grupo avaliou, utilizado reações de PCR, a presença de genes de carbapenemase bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{NDM}, bla_{SPM}, bla_{AIM}, bla_{DIM}, bla_{GIM}, bla_{SIM}, bla_{KPC}, bla_{BIC} e bla_{OXA-48}, $bla_{OXA,}$ bla_{GES} e bla_{FIM} em *P. aeruginosa*, resistentes ao imipenem e meropenem, isoladas de amostras clínicas de pacientes atendidos em 11 hospitais da grande São Paulo, no período de fevereiro a outubro de 2013. Os resultados obtidos evidenciaram que dentre 119 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e meropenem, 42 foram capazes de degradar o imipenem em ensaio de hidrólise em espectrofotômetro, mas em 25 não foram detectados genes de carbapenemases conhecidos. A caracterização de novos genes de carbapenemases é fundamental para que sua detecção possa ser realizada utilizando-se testes moleculares rápidos, a exemplo da PCR em tempo real, potencialmente permitindo ajuste terapêutico mais precoce.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar carbapenemases novas ou emergentes e seu contexto genético em *P. aeruginosa.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a- Sequenciar o genoma de isolados capazes de hidrolisar imipenem.
b- Identificar potenciais genes de carbapenemases por análise *in silico* dos genomas sequenciados.
c- Caracterizar o contexto genético de bla_{KPC} em clone epidêmico de *P. aeruginosa.*
d- Caracterizar o contexto genético de potenciais novas carbapenemases
e- Caracterizar os tipos de MLST dos isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Dos 25 isolados de *P. aeruginosa* que foram capazes de hidrolisar o imipenem em ensaio espectrofotométrico e eram negativos para genes de carbapenemases conhecidos, foram selecionados 11 para o estudo, os quais apresentaram maior atividade de hidrólise para o imipenem. Esses isolados foram cultivados de amostras clínicas de pacientes atendidos em hospitais privados da Grande São Paulo, um isolado por paciente, no período de fevereiro a outubro de 2013. Também foi incluído para estudo um isolado de *P. aeruginosa* causador de um surto em serviço de transplante de medula óssea de um hospital da cidade de São Paulo, positivo para KPC-2. Estes isolados pertencem à coleção do Fleury de Medicina e Saúde e foram disponibilizados para uso neste estudo.

4.2 CONTROLE DE QUALIDADE

Os ensaios realizados foram aprovados mediante controles padronizados listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Controles e cepas de referência utilizados para garantia da qualidade

Controles
Escherichia coli ATCC 25922
Plasmídeo natural de *P. aeruginosa* de 32,4 kbp – GenBank KX169264.1
Escherichia coli 39R861
Plasmídeo pBCSK(-)
Acinetobacter baumannii pmx^r
PhiX 1%

Fonte: Produzida pelo autor.

4.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS

4.3.1 Método de disco-difusão

Os isolados foram testados pelo método de disco-difusão conforme diretrizes do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos

(BrCAST). As suspensões bacterianas foram preparadas com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland em salina 0,9% estéril, a partir de crescimento recente obtido em ágar Mueller-Hinton (MH). O *swab* foi umedecido na suspensão, o excesso foi eliminado e a suspensão bacteriana foi espalhada de forma homogênea sobre a superfície do ágar. Após evaporação do excesso de umidade, discos de imipenem e meropenem de 10 µg foram aplicados sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas por 16-20h a 36°C ± 1ºC (BRCAST, 2017).

4.3.2 Método de microdiluição em caldo

Os isolados foram testados pelo método de microdiluição em caldo conforme documento da *International Organization for Standardization* (ISO 227-1). Os antimicrobianos a serem testados foram diluídos em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (MHCA) a uma concentração inicial de 256 mg/L. Com uma pipeta multicanal, 50µL do MHCA foram aplicados da 2ª à 12ª coluna da placa de microdiluição. Um volume de 100µL das soluções de antimicrobiano foi aplicado na 1ª coluna para diluição seriada (1/2) da 2ª à 11ª coluna com 50% de seu volume inicial. A seguir, foram preparadas suspensões bacterianas com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland em salina 0,9% estéril e realizada uma diluição 1/100 das suspensões em MHCA. Um volume de 50µL das suspensões bacterianas diluídas 1/100 foi aplicado em cada um dos poços da placa de microdiluição, da 12ª para a 1ª coluna. A seguir, as placas foram incubadas por 16 a 20 h a 36°C ± 1ºC. Utilizou-se a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle de qualidade (ISO 2776-1, 2006).

4.3.3 Teste fenotípico para detecção de carbapenemases

Os isolados foram submetidos à pesquisa de carbapenemase pelo método Blue-Carba (BC). Em dois microtubos de 1,5 ml foram adicionados 100 µL da solução BC ou 100 µL da solução BC com imipenem. A massa bacteriana equivalente a cerca de 10 µL foi adicionada às soluções. Os tubos foram incubados a 36°C ± 1ºC por 2 horas. A interpretação foi realizada conforme descrito na publicação original de Pires, Novais et. al. (2013). De forma complementar, realizou-

se também a pesquisa de MBL com EDTA 0,1 M, conforme Nota Técnica n°: 01/2013 (ANVISA, 2013).

4.4 PERFIL PLASMIDIAL

4.4.1 Extração de DNA plasmidial

Para verificar a presença de plasmídeos nos isolados, realizou-se a extração do DNA plasmidial, segundo o método de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Os isolados foram cultivados em ágar Luria-Bertani (LB) contendo um disco de imipenem e incubados a 36°C ± 1ºC por 18 a 24 horas. Para cada isolado, uma alçada cheia do crescimento bacteriano foi ressuspendida em 100 µL da solução I (2 mg/mL lisozima, 50 mM glicose, 10 mM EDTA, 25mM Tris-HCl – pH 8,0). Amostras foram homogeneizadas no vórtex e incubadas em banho de gelo por 5 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%). As suspensões foram homogeneizadas por inversão e a seguir, 150 µL da solução III (acetato de sódio 3M, pH 4,8), mantida em banho de gelo, foram adicionadas aos tubos. As suspensões foram homogeneizadas por inversão para precipitação do DNA cromossômico. As suspensões foram incubadas em banho de gelo a 0°C por 5 min, e centrifugadas a 20.000 x g por 5 min a 4°C. Em seguida, 400 µL dos sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5 mL onde o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado. As suspensões foram homogeneizadas por inversão do tubo e incubadas por 30 min a -80°C. Após a incubação, os precipitados foram coletados por centrifugação a 20.000 x g por 2 min a 4°C. Posteriormente, os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL de solução IV (0,1 M acetato de sódio/ 0,05 M Tris-HCl - pH 8,0) e o DNA foi precipitado com 200 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram incubados a -80°C por 10 min e centrifugados novamente. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados e os tubos foram mantidos com a tampa aberta no interior da cabine de segurança biológica até completa evaporação do etanol (cerca de 20 min). Os sedimentos foram ressuspensos em 25 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0). As concentrações de DNA plasmidial foram aferidas utilizando-se o Nanodrop® e as extrações foram aplicadas em gel de agarose 0,7% para eletroforese. As cepas *E. coli* 39R861 e *P. aeruginosa* D5170990 (GenBank KX169264.1) foram utilizadas como referência, sendo incluídas a cada lote de extração.

4.4.1.1 Preparo de células competentes

Uma colônia da *E. coli* TOP 10 foi inoculada em 10 mL de Caldo LB e mantida sob agitação (150 rpm) a 36°C ± 1ºC por 18-24h. Em seguida, 100 µL da cultura foram inoculadas em 100 mL de Caldo LB. O subcultivo foi incubado sob agitação até atingir o DO_{600nm} 0,5-0,7A. Uma vez obtida a turbidez adequada, a cultura foi mantida em gelo picado para manipulação. A seguir, 50 mL do crescimento microbiano foram transferidos para tubo cônico de 50 ml e centrifugados a 3.000 g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 25 mL de água Milli-Q estéril mantida em banho de gelo. Repetiu-se a lavagem do *pellet* por mais duas vezes, diminuindo-se apenas o volume final de ressuspensão. A seguir, uma nova centrifugação foi realizada a 3.000 g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL solução de glicerol a 10% mantida em banho de gelo. Alíquotas de 60 µL foram separadas em microtubos estéreis e armazenadas à -80ºC até o momento do uso.

4.4.1.2 Eletroporação em *E. coli* TOP10 e seleção de transformantes

Para eletroporação, 3 µL da solução de DNA plasmidial foram adicionados a 60 µL de *E. coli* TOP 10 eletrocompetente mantida em gelo picado. A suspensão foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm mantida em gelo picado e posicionada imediatamente em câmara de choque onde se aplicou uma voltagem de 2,5 kV. Imediatamente após o término da eletroporação, foi adicionado 1 mL do meio SOC e a seguir a suspensão foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Amostra foi incubada por 1h a 37°C a 60 rpm. Após incubação, as amostras foram plaqueadas em meio seletivo contendo imipenem 1µg/mL para a seleção de transformantes. As placas foram incubadas por cerca de 20 horas a 36°C ± 1ºC e a seguir observadas quanto à presença de colônias incolores no meio. Como controle da técnica de eletroporação, foi inserido o plasmídeo pBCSK (-) sem o inserto em *E. coli* eletrocompetente e selecionado em meio LB contendo cloranfenicol 50µg/mL e Xgal 80µg/mL.

4.4.2 Ensaio de conjugação

O ensaio de conjugação foi realizado conforme descrito por Woodall (2003). A cepa receptora *Acinetobacter baumannii* J2281237, resistente à polimixina B e sensível as cefalosporinas e carbapenêmicos, e o isolado J5083553 positivo para bla_{KPC} foram inoculados em 5 mL de Caldo LB e incubados a 36ºC ±1ºC a 175 rpm até atingir o DO_{600nm} 0,5-0,7A. Em um tubo foram adicionados 1 mL da suspensão da cepa doadora e 100 µL da suspensão da cepa receptora. A suspensão resultante foi incubada à 37°C por 1h. A seguir, o tubo foi centrifugado por 5 min a 3.000 g, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi homogeneizado com 100 µL de caldo LB. O sedimento foi aplicado sobre uma membrana de acetato de celulose estéril com porosidade de 0,45 µm, previamente depositado sobre o ágar LB. A placa foi incubada a 36ºC ±1ºC por 18-24h. A seguir, a membrana foi lavada com 5 mL de Caldo LB e alíquotas de 10 µL, 50 µL e 100µL dessa suspensão foram inoculadas em ágar LB contendo 128 µg/mL de polimixina e 32 µg/mL de ceftriaxona para a seleção dos transconjugantes.

4.4.3 Método para detecção de grandes plasmídeos

Para detectar a presença de grandes plasmídeos, foi utilizado a enzima S1 nuclease e protocolo de Eletroforese em Campos Pulsados (PFGE).

Inicialmente, os isolados foram repicados em ágar sangue e incubados a 36 ±1°C por 18 a 24 horas. No dia seguinte, suspensões bacterianas foram preparadas em tampão PIV com formol (Tris 10mM, NaCl 2M, pH 8,0 + 4% formol) e ajustadas quanto à turbidez no Densichek (bioMérieux), na escala 3,0 de MacFarland. A seguir, 1 mL dessas suspensões bacterianas foram transferidas para um microtubo e incubadas no gelo por 1 hora. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 1 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados duas vezes com tampão PIV (sem formol). As células bacterianas foram ressuspensas em 300µL de tampão de lise 2X concentrado acrescido de 4 mg de lisozima e incubadas em banho seco à 60°C. A seguir, 300 µL de agarose a 2% (Sigma A2929) acrescida de SDS a 20% foram adicionados aos tubos contendo as suspensões bacterianas. As amostras foram gentilmente homogeneizadas e aplicadas nos moldes para confecção de blocos contendo o DNA bacteriano. Após

solidificação dos blocos, os mesmos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços contendo 2 mL de tampão de lise celular 1X e incubados à 37°C com agitação suave por 1h. Após esse período, o tampão foi descartado e 2 mL de tampão ESP (0,5 M EDTA, 10% laurilsarcosinato de sódio, 2 mg/mL de proteinase K, pH 8,0) foram adicionados, sendo posteriormente incubados à 55°C, onde permaneceram *overnight*. No dia seguinte, o tampão foi descartado e 2 mL do tampão ESP (sem proteinase K) foram adicionados e incubados por mais 6 h. Após incubação, os blocos foram lavados 2 vezes com 3 mL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) com intervalos de 10 minutos entre as lavagens. A seguir, 1 mL de tampão TE contendo 1mM de PMSF foram adicionados aos poços e incubados à 40°C por 1h. O tampão foi, então, descartado e os blocos lavados 3 vezes com tampão TE com intervalos de 30 minutos entre as lavagens. Os blocos permaneceram armazenados em EDTA 0,5 M de 2 - 8°C até o momento do uso.

Para a digestão com a enzima S1 nuclease, 1/3 dos blocos de agarose foram utilizados, sendo posteriormente lavados 5 vezes com 4 mL de água MiliQ estéril em placas de culturas de células de 24 poços, com intervalos de 15 minutos entre as lavagens. A digestão foi realizada conforme descrito por Barton, Harding e Zuccarelli (1995).

Os blocos foram fixados no gel de agarose 1% e submetidos à eletroforese de campos pulsados pelo sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad®) sob as seguintes condições de corrida: tempo do pulso inicial: 2,1s; tempo do pulso final: 63,8s; voltagem: 6V; ângulo: 120°; tempo total de corrida: 19h; temperatura: 14°C.

As distâncias de migração das bandas plasmidiais foram medidas em milímetros, diretamente da fotografia do gel de agarose. A curva padrão e a estimativa dos plasmídeos foram feitas através de análises de regressão linear.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit. Os isolados foram cultivados em ágar LB contendo um disco de imipenem e incubados a 36°C ± 1ºC por 18 a 24 horas. Para cada isolado, uma alçada cheia da cultura foi ressuspendida em 40 µL do tampão de lise tipo II e imediatamente vortexadas. Em seguida, 10 µL da solução de proteinase K foram adicionados e as suspensões foram vortexadas por 10 segundos. A seguir, 10 µL do

tampão tipo III foram adicionados e as amostras foram vortexadas por mais 10 segundos, seguido pela centrifugação por 5 segundos a 1.000 x g e incubação por 7 min a 55ºC. Após o período de incubação, as suspensões foram novamente vortexadas, centrifugadas por 5 s e incubadas por mais 8 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 s a 1.000 x g. Para a remoção do RNA, 5 µL da solução de RNAse A (20mg/mL) foram adicionados e vortexados por 10 segundos, seguido da centrifugação por 5 segundos a 1.000 x g e incubação por 15 min à temperatura ambiente. Para a purificação do DNA foram adicionados 500µL do tampão de lise tipo IV. As suspensões foram, então, vortexadas por 10 segundos e incubadas por 5 min em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram vortexadas e centrifugadas por 5 segundos a 1.000 x g e novamente incubadas por 5 min. Para cada purificação realizada uma coluna foi adicionada aos tubos coletores. As amostras foram aplicadas no centro da coluna e centrifugadas por 1 min a 11.000 x g. O fluido dos tubos coletores foi descartado e as colunas foram adicionadas novamente nos tubos coletores. Prosseguiu-se com a lavagem das colunas, com aplicação de 500 µL do tampão de lise tipo IV. Os tubos contendo as colunas foram centrifugados por 1 min a 11.000 x g. Os fluidos foram descartados e as colunas foram novamente posicionadas nos tubos coletores. A seguir, foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem tipo VI e os tubos foram centrifugados por 3 min a 16.000 x g. As colunas foram transferidas para microtubos estéreis de 1,5 mL e para a eluição do DNA um volume de 100 µL de tampão de eluição tipo V pré-aquecido (70ºC) foi aplicado no centro das colunas. Após 1 min em temperatura ambiente os tubos foram centrifugados por 1 min a 11.0000 x g para recuperar o DNA genômico purificado. As concentrações de DNA genômico foram aferidas utilizando-se o Nanodrop® e as extrações foram aplicadas em gel de agarose a 0,7% para eletroforese.

4.6 PREPARO DE BIBLIOTECAS, SEQUENCIAMENTO NO SISTEMA MiSEQ, MONTAGEM DOS GENOMAS E DETECÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE CARBAPENEMASES

Para o preparo das bibliotecas de DNA genômico, utilizou-se o kit Nextera XT DNA Library Prepation, conforme instruções do fabricante. Em tubos de 0,2 mL foram adicionados 10µL do Neutralize Tagment Buffer (TD), 5 µL do DNA genômico normalizado a 0,2 ng/µL e 5 µL do Amplicon Tagment Mix (ATM). As amostras foram

homogeneizadas e centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min. Prosseguiu-se para a etapa de PCR em termociclador Veriti® Termal Cycler (Thermo) para tagmentação do DNA e inserção de adaptadores, a uma temperatura de 55°C por 5 min e espera a 10°C. A seguir, 5 µL do Neutralize Tagment Buffer (NT) foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 5 µL dos Indexes 1 e 2 do Nextera® XT Index Kit – 24 indexes, 96 samples (Illumina) foram adicionados juntamente com 15 µL do Nextera PCR Master Mix (NPM) para amplificação dos fragmentos de DNA. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min. Um novo ciclo de PCR foi iniciado conforme programação a seguir:

Tabela 5 - Programação para ensaio de PCR em termociclador

N° de ciclos	Temperatura	Tempo
1	72°C	3 minutos
	95°C	30 segundos
12	95°C	10 segundos
	55°C	30 segundos
1	72°C	5 minutos
	10°C	∞

Fonte: Illumina (2018).

Após reação de PCR, as amostras foram centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min. Para a purificação do DNA, 50 µL dos produtos de PCR foram adicionados em placas de PCR 96-Well, juntamente com 30 µL AMPure XP beads (Beckman Coulter). As amostras foram homogeneizadas em agitador a 1.800 rpm por 2 min e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. A placa foi posicionada em estante magnética até que as amostras permanecessem límpidas. A seguir, os sobrenadantes foram desprezados e as esferas magnéticas purificadas em 200 µL de etanol a 80%. A placa permaneceu em repouso até completa evaporação do etanol por aproximadamente 15 min. Por fim, as amostras foram eluídas em 30 µL de RSB.

As bibliotecas foram validadas através da análise do tamanho médio dos fragmentos utilizando o kit Agilent High Sensitivity DNA e normalizadas para a preparação do “pool” de DNA após determinação das concentrações das bibliotecas

por PCR-RT (Step One Plus), utilizando o NEBNext® Library Quantification kit (BioLabs®). O “pool” de amostras foi diluído e desnaturado a 10 pM para sequenciamento com MiSeq Reagent kit v3 – 150 cycles (Illumina) na plataforma MiSeq (Illumina). O PhiX à 1% foi utilizado como controle de qualidade do sequenciamento.

Os genomas foram montados utilizando o programa Geneious v.8.1.9 e submetidos à análise automática para genes de resistência utilizando o programa CARD/RGI v. 4.2.0.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS DE MLST

O tipo de MLST foi determinado utilizando o programa BioEdit para localização dos genes *acs*A, *aro*E, *gua*A, *mut*L, *nuo*D, *pps*A e *trp*E. A sequência completa de cada um dos genes foi incluída em um único arquivo fasta e submetido à análise no banco de dados PubMLST (https://pubmlst.org/paeruginosa/submission.shtml).

4.8 PERFIL CLONAL POR ELETROFORESE EM CAMPOS PULSADOS (PFGE)

O perfil clonal dos isolados foi realizado por PFGE e digestão com a enzima SpeI. Os blocos foram preparados conforme descrito para a avaliação da presença de plasmídeos no item 4.4.3. Para a digestão do DNA genômico, 1/3 dos blocos foram utilizados, sendo lavados 3 vezes com 200 µL de tampão TE pré-aquecido a 35°C ± 1°C, com intervalos de 15 min entre as lavagens. A seguir, 6U da enzima SpeI foram utilizados para a digestão dos blocos em um volume total de 100 µL com incubação à 35°C ± 1°C *overnight*. Após a digestão, os blocos foram lavados com 200 µL de EDTA 0,1M e fixados no gel de agarose a 1%, sendo submetidos à eletroforese de campos pulsados pelo sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad®) sob as seguintes condições de corrida: tempo do pulso inicial: 2,1s; tempo do pulso final: 63,8s; voltagem: 6V; ângulo: 120°; tempo total de corrida: 19h; temperatura: 14°C.

A similaridade entre os perfis clonais gerados foi avaliada no software BioNumerics v.7.5, com cálculo de coeficiente de Dice, com 1,5% de otimização e tolerância.

4.9 DETERMINAÇÃO DO CONTEXTO GENÉTICO DOS ISOLADOS D9203039 e J5083553

A determinação do contexto genético dos isolados D9203039 e J5083553 foi feita através da curadoria manual utilizando-se o software Artemis e alinhamento de sequências nucleotídicas no BLAST para busca por regiões de similaridade entre sequências biológicas com depósito no GenBank.

4.10 CONFIRMAÇÃO DO CONTEXTO GENÉTICO DO ISOLADO D9203039

Para confirmar o entorno dos genes bla_{GES-19} e bla_{GES-20}, seis *primers* foram confeccionados com o auxílio do programa Primer-Blast (Tabela 6).

Reações de PCR foram realizadas conforme condições de bula da Platinum™ *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Quatro temperaturas de anelamento dos *primers* foram testadas (57°C, 59°C, 60°C e 61°C).

Tabela 6 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do entorno dos genes bla_{GES-19} e bla_{GES-20}

Primer	**Região**	**Sequência (5' – 3')**	**Tamanho do amplicon (pb)**
1	ges19-aacA4-FW	GGAAAGAGCCGGAGATGG	1698
	ges19-aacA4-RV	AAGAGCAACGTACGACTGGG	
2	ges-20-aacA4-FW	GGAAAGAGCCGGAGATGA	828
	ges-20-aacA4-RVa	TGGTCTATTCCGCGTACTCC	
3	ges-20-aacA4-FW	GGAAAGAGCCGGAGATGA	629
	ges-20-aacA4-RVb	CCCACCACTCGACGATATGA	
4	aac6-ges19-FW	CAGCTGTTGATCTTTACGGCG	1067
	aac6-ges19-Rv	AAAACCAATGTCGTTCCGGG	
5	aac6-ges20-FW	TGGCCTGACATGAAAAGTGC	2276
	aac6-ges20-RV	AAAACCAATGTCGTTCCGGC	
6	aac6-aacA4 –FW	TTGCTTGGATGGATTGGCCT	2535
	aac6-aaca4-RV	AGCCACTCATAGAGCATCGC	

Fonte: Produzida pelo autor.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS

Todas as amostras utilizadas neste estudo apresentaram-se puras após cultura em ágar sangue e resistentes ao imipenem após realização do antibiograma por disco difusão. A pesquisa de carbapenemases pelo Blue-Carba para os isolados de *P. aeruginosa* com teste de hidrólise positivo e PCR negativo para carbapenemases conhecidas evidenciou um isolado fracamente positivo. O isolado J50083553 causador de um surto em serviço de transplante de medula óssea, que era positivo para KPC também apresentou resultado positivo, conforme esperado. O teste de bloqueio com EDTA evidenciou diferenças de diâmetro de halos de 1 a 4 mm, sendo interpretado inicialmente como negativo para todas as amostras (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados de testes fenotípicos para detecção de carbapenemases

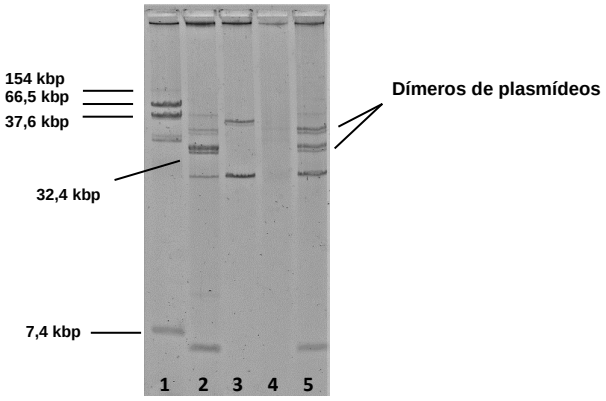
Isolado	Espécie	Bloqueio EDTA	Blue-Carba
D9203039	*P. aeruginosa*	-	-
D7191241	*P. aeruginosa*	-	-
D5063567	*P. aeruginosa*	-	-
D8202543	*P. aeruginosa*	-	+
D6180210	*P. aeruginosa*	-	-
E0163227	*P. aeruginosa*	-	-
D7282489	*P. aeruginosa*	-	-
E0241077	*P. aeruginosa*	-	-
D6023166	*P. aeruginosa*	-	-
E2190468	*P. aeruginosa*	-	-
D5303023	*P. aeruginosa*	-	-
J5083553	*P. aeruginosa*	-	+

Fonte: Produzida pelo autor.

5.2 PERFIL PLASMIDIAL

De doze amostras de DNA plasmidial extraídas, duas apresentaram plasmídeos, visualizados em gel de agarose à 0,7% após eletroforese. O isolado E2190468 apresentou uma banda com baixa intensidade de sinal fluorescente, podendo representar um plasmídeo com baixo número de cópias (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 0,7%

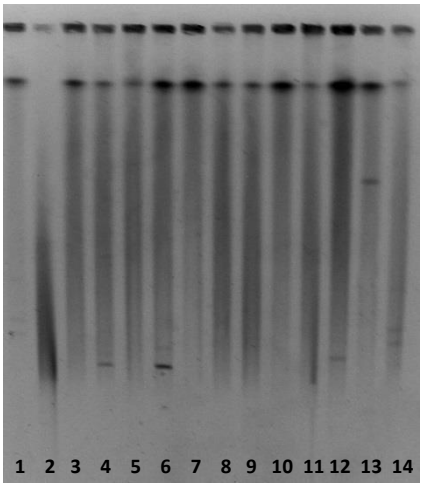


Legenda: 1 - Cepa de referência *E. coli* 39R861; 2- Cepa controle D5170990 (plasmídeo natural de *P. aeruginosa* de 32,4 kbp – GenBank KX169264.1); 3- isolado D5303023; 4- E2190468; 5- D5063567.

Os plasmídeos do isolado D5303023 foram eletroporados em *E. coli* TOP 10 e selecionados em meio LB contendo 1µg/mL imipenem, contudo não foram obtidos transformantes. A eletroporação do plasmídeo pBCSK (-) sem o inserto em *E. coli* TOP 10 confirmou que a célula estava eletrocompetente.

Digestões com a enzima S1 nuclease foram realizadas para detecção de grandes plasmídeos (> 100 kbp). O isolado J5083553, positivo para bla_{KPC-2}, apresentou um plasmídeo de aproximadamente 453 kb (Figura 6). Contudo, experimentos de conjugação bacteriana falharam em obter colônias de transconjugantes. Outros três isolados apresentaram plasmídeos também evidenciados na extração por lise alcalina (Figuras 5 e 6)

Figura 6 - Eletroforese em Campos Pulsados em gel de agarose 1%



Legenda: 1- Cepa de referência *E. coli* 39R861; 2- isolado D9203039; 3- isolado D7191241; 4- isolado D5063567; 5- isolado D8202543; 6- isolado D5303023; 7- isolado D6023166; 8- isolado D6180210; 9- isolado D7282489; 10- isolado E0163227; 11- isolado E0241077; 12- isolado E2190468; 13- isolado J5083553; 14- Cepa de referência *E. coli* 39R861.

5.3 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

Determinou-se a CIM para imipenem, meropenem, cefepima e ceftazidima e comparou-se com os resultados da análise dos *contigs* pelo programa CARD/RGI v. 4.2.0 e com dados prévios de hidrólise para imipenem em ensaio espectrofotométrico (Tabela 8).

Todos os isolados analisados apresentaram OXA-50 constitutiva, compatível com o descrito na literatura (Tabela 8).

O isolado D9203039 apresentou sequência deduzida de aminoácidos 100% idêntica à de uma carbapenemase já descrita, GES-20 e a uma ESBL, GES-19 (Tabela 8).

Cinco isolados apresentaram uma PDC-5 e seis isolados apresentaram sequências de aminoácidos deduzida com identidade acima de 90% com PDC-87 ou PDC-9. Outros quatro isolados apresentaram sequências de aminoácidos com aproximadamente 22% de similaridade para PDC-82 (Tabela 8).

Onze isolados apresentaram sequências de aminoácidos similares a sete enzimas do tipo MBL, entre as quais se destacam aquelas similares à HMB-1 e AIM-1, já descritas em *P. aeruginosa* e MSI-1, cuja identidade com sequências de aminoácidos foi de 42,47%, a maior entre o grupo de MBL (Tabela 8).

O isolado J5083553 apresentou sequência deduzida de aminoácidos 100% identica à carbapenemase KPC-2 (Tabela 8).

Tabela 8 - Determinação da CIM e comparabilidade com teste de hidrólise para imipenem e análise dos *contigs* pelo programa CARD/RGI

Isolado	Enzima	Similaridade com sequências de aminoácidos (%)	Δ hidrólise IPM	CIM (µg/mL)			
				IPM	MPM	CPM	CAZ
D9203039	GES-20	100	0,56906	>32	>128	>128	>128
	GES-19	100					
	OXA-2	100					
	PDC-87	99.73					
	OXA-50	98.85					
	MSI-1	42.37					
	AIM-1	30.21					
D7191241	PDC-5	100	0,54988	32	16	32	64
	OXA-50	99.24					
	AIM-1	30.21					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
	PDC-82	21,86					

Continua...

Isolado	Enzima	Similaridade com sequências de aminoácidos (%)	Δ hidrólise IPM	CIM (µg/mL)			
				IPM	MPM	CPM	CAZ
D5063567	PDC-87	99.46	0,31103	16	32	32	32
	OXA-50	99.24					
	MSI-1	42.37					
	AIM-1	30.21					
	CAU-1	37.5					
	THIN-B	27.43					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
D8202543	OXA-50	98.85	0,27406	8	4	4	2
	PDC-9	96.47					
	MSI-1	40.68					
	PEDO-1	28.28					
	PEDO-1	27.66					
	TRIN-B	27.43					
	Bla2	25.53					
	HMB-1	22.99					
D6180210	PDC-5	100	0,25681	16	32	64	64
	OXA-50	99.24					
	AIM-1	30.21					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
	PDC-82	21.86					
E0163227	PDC-5	100	0,24328	32	32	64	>64
	OXA-50	99.62					
	MSI-1	42.37					
	AIM-1	30.21					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
D7282489	PDC-5	100	0,23705	32	32	64	>64
	OXA-50	99.24					
	AIM-1	30.21					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
	PDC-82	21.86					
E0241077	PDC-5	100	0,22689	16	16	16	32
	OXA-50	99.24					
	AIM-1	30.21					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
	PDC-82	21.86					
D6023166	PDC-87	99.46	0,18924	16	64	32	32
	OXA-50	99.24					
	MSI-1	42.37					
	AIM-1	30.21					
	CAU-1	37.5					
	THIN-B	27.43					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
E2190468	PDC-87	99.73	0,17163	32	>64	64	8
	OXA-50	99.24					
	AIM-1	30.21					
	THIN-B	28.42					
	Bla2	25.57					

Continua...

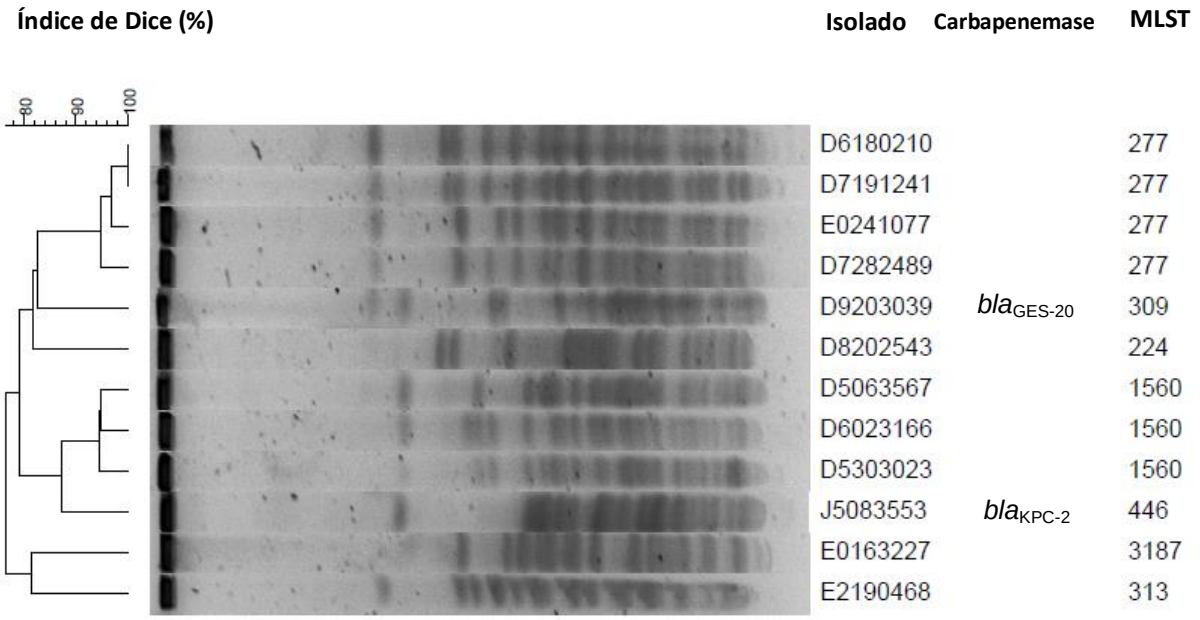
Isolado	Enzima	Similaridade com sequências de aminoácidos (%)	Δ hidrólise IPM	CIM (µg/mL)			
				IPM	MPM	CPM	CAZ
D5303023	PDC-87	99.46	0,16277	32	64	32	16
	OXA-50	99.24					
	MSI-1	42.37					
	AIM-1	30.21					
	CAU-1	37.5					
	THIN-B	27.43					
	PEDO-1	26.6					
	Bla2	25.57					
	HMB-1	22.99					
J5083553	KPC-2	100	Não realizado	16	32	>128	16

Abreviações: IMP: imipenem; MPM: meropenem; CPM: cefepima; CAZ: ceftazidima.
Legenda: Segundo pontos de corte clínicos do BrCAST, a categoria de interpretação 'Resistente', é determinada pelos seguintes valores de CIM: IMP: >4 mg/L; MPM: >8 mg/L; CPM: >8 mg/L; CAZ: >8 mg/L. Para o MPM, acrescenta-se a categoria 'Intermediário', cujo intervalo de CIM é 4-8 mg/L.
Fonte: Produzida pelo autor.

5.4 PERFIL CLONAL

O perfil clonal dos isolados de *P. aeruginosa* foi determinado através de PFGE e MLST. A análise por PFGE identificou 7 grupos clonais distintos. Quanto à tipagem por MLST, sete ST foram detectados, sendo os ST277 e ST1560 os tipos predominantes. Isolados apresentando perfis com índice de similaridade de Dice ≥ 90% foram considerados parte de um mesmo grupo clonal. Dois isolados ST277 apresentaram perfis idênticos. O isolado E0163227 apresentou um novo ST, denominado ST3187 (Figura 7).

Figura 7 - Perfil clonal e MLST dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

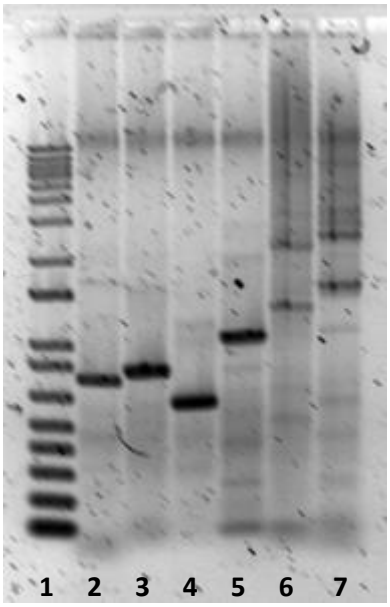


5.5 ISOLADO DE *Pseudomonas aeruginosa* D9203039

5.5.1 Entorno dos genes $bla_{ges\text{-}19}$ E $bla_{ges\text{-}20}$

O isolado D9203039 positivo para a carbapenemase GES-20 e a ESBL GES-19 foi submetido a ensaio de PCR para amplificação do entorno dos genes. As regiões amplificadas apresentaram fragmento de tamanho aproximado ao que era esperado. Contudo, observou-se a formação de duas bandas no produto amplificado. Isso é devido à alta similaridade entre os genes $bla_{GES\text{-}19}$ e $bla_{GES\text{-}20}$, o que diminui a especificidade dos *primers* (Figura 8).

Figura 8 - Amplificação do entorno dos genes $bla_{GES\text{-}19}$ e $bla_{GES\text{-}20}$

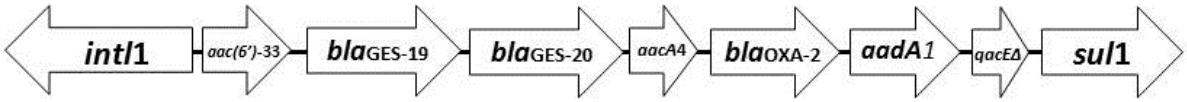


Legenda: (1) 1 kb DNA Ladder; (2) *primer* 1 (ges19-aacA4); (3) *primer* 2 (ges-20-aacA4-RVa); (4) *primer* 3 (ges-20-aacA4-RVb); (5) *primer* 4 (aac6-ges19); (6) *primer 5* (aac6-ges20); (7) *primer 6* (aac6-aacA4).

5.5.2 Estrutura do integron de classe 1

A curadoria manual do isolado D9203039 revelou a presença de uma estrutura completa de integron. O integron continha três genes de resistência para betalactamases, sendo os genes, $bla_{GES\text{-}20}$ uma carbapenemase, $bla_{GES\text{-}19}$ uma ESBL e $bla_{OXA\text{-}2}$ uma betalactamase de espectro estrito. Também foram encontrados genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: *aacA*4, *aadA*1 e *aac(6')-33* e um gene de resistência a compostos de amônio quartenário: *qacE*Δ (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura do integron de classe 1 do isolado D9203039

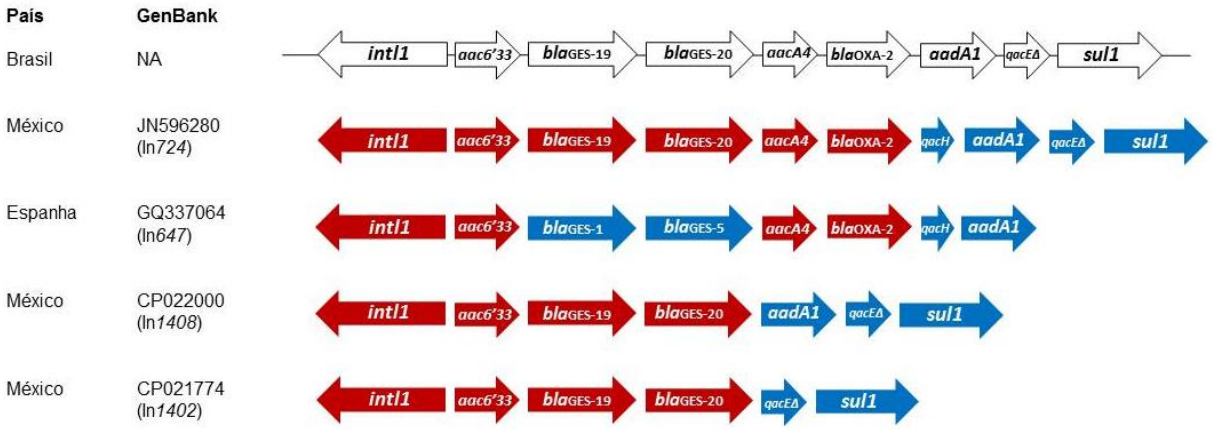


Fonte: Produzida pelo autor

5.5.3 Alinhamento do integron de classe 1 com sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank

Comparando-se as sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank com cobertura ≥80% em relação ao integron do isolado D9203039 positivo para *bla*$_{GES-19}$ e *bla*$_{GES-20}$, evidenciou-se que esses genes estão localizados em um integron de classe 1, In*724* (JN596280.1), previamente identificado por Barrios et al. (2012), cuja identidade foi de 99,93% com 100% de cobertura. A única diferença encontrada foi a ausência do gene *qacH* no integron do isolado D9203039. O In*724* compartilha estreita relação com o In*647* (GQ337064), cuja identidade foi de 99,84%. Os demais integrons possuem uma região comum de 3.294 pares de bases contendo os genes *bla*$_{GES-19}$ e *bla*$_{GES-20}$ e a porção 5' do *intI*1 (Figura 10).

Figura 10 - Comparação do entorno dos genes *bla*$_{GES-19}$ e *bla*$_{GES-20}$ do isolado D9203039 em integrons de classe 1 disponíveis no GenBank



Abreviação: NA – não aplicável.
Legenda: As regiões em vermelho representam estruturas idênticas.
Fonte: Produzida pelo autor.

5.6 ISOLADO DE *Pseudomonas aeruginosa* J5083553

5.6.1 Alinhamento do *contig* contendo o gene *bla*$_{KPC-2}$ no BLAST

O isolado J5083553 apresentou o gene *bla*$_{KPC-2}$ localizado em um *contig* único de 128.487 bp. O alinhamento do *contig* com sequências nucleotídicas de *P. aeruginosa* pelo sistema BLAST apresentou maior cobertura e identidade com plasmídeos (Tabela 9).

Tabela 9 - Alinhamento do *contig* do isolado J5083553 contendo o *bla*$_{KPC-2}$ com sequências nucleotídicas de *P. aeruginosa* disponíveis no GenBank

Descrição	Depósito GenBank	Cobertura (%)	Identidade (%)
Pseudomonas aeruginosa strain PABL048 plasmid pPABL048, complete sequence	CP039294.1	79	99,95
Pseudomonas aeruginosa isolate RW109 genome assembly, plasmid: RW109 plasmid 1	LT969519.1	57	99,98
Pseudomonas aeruginosa plasmid p727-IMP, complete sequence	MF344568.1	74	98,79
Pseudomonas aeruginosa strain PA121617 plasmid pBM413, complete sequence	CP016215.1	76	99,25
Pseudomonas aeruginosa PA96 plasmid pOZ176, complete sequence	KC543497.1	79	97,83

Fonte: Produzida pelo autor.

5.6.2 Entorno do gene *bla*$_{KPC-2}$ no isolado J5083553

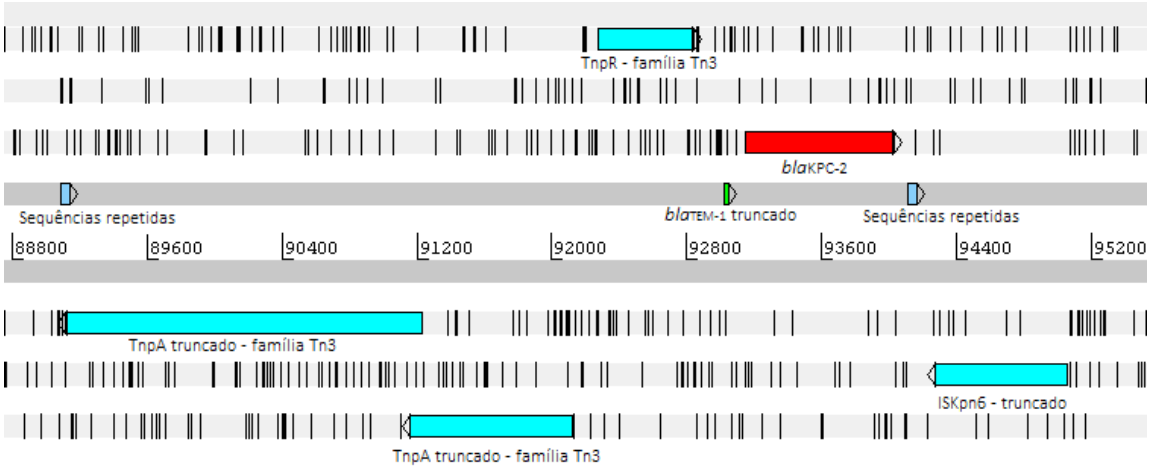
O gene *bla*$_{KPC-2}$ foi encontrado flanqueado à montante por uma estrutura truncada de um transpóson da família Tn3. Esta estrutura tem maior similaridade (3895/3963 - 98%) com a isoforma TnSwi1, mas a repetição invertida esquerda (IRL) está ausente e o gene de betalactamase passageiro *bla*$_{TEM-1}$ sofreu deleção e apenas 21 pares de nucleotídeos estão presentes. Quando a sequência nucleotídica do isolado J5083553 foi comparada, com aquela da isoforma TnSw1 de Tn3, foram observadas deleções e inserções que resultaram na interrupção da ORF 3 do transpóson, gerando dois pseudogenes (Figuras 11 e 12). À jusante do gene *bla*$_{KPC-2}$ foi observada a presença da ISKpn6 truncada em sua porção 5´ (Figura 12).

Figura 11 Alinhamento da sequência nucleotídica parcial do isolado J5083553 com aquela da isoforma TnSwi1 de Tn3

```
J5083553     AAGATGCGGTTAGCTTTTACCCCTGCATCTTTGAGCGCTCTGATCTGAATATCGAGGGAC
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 1648  AAGATGCGGTTAGCTTTTACCCCTGCATCTTTGAGCGCTCTGATCTGAATATCGAGGGAC  1707

J5083553     TGCTGGCTGGTTGAGACCCGCGCATAACCAAAAATTCGCAT-AAAATGTACCTTAAATCG
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
TnSWi1 1708  TGCTGGCTGGTTGAGACCCGCGCATAACCAAAAATTCGCATAAAAATGTACCTTAAATCG  1767

J5083553     AATATCAGACACGATGTGTCTATTATGCCAAAATGACGATTTAATGGACACTCAAACGAA
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 1768  AATATCAGACACGATGTGTCTATTATGCCAAAATGACGATTTAATGGACACTCAAACGAA  1827

J5083553     GCCGTTTTACTATGTCTGATAATTTATAACATTTCGGACGGTTGCAAAAATGTTACTAAA
             ||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| |||||||||    |||||  |||
TnSWi1 1828  GCCGTTTTACTATGTCTGATAATTTATAATATTTCGAACGGTTGCAGTTGTGTTA--AAA  1885

J5083553     TGCCCGTAAGGCAGGGAGGCCTATATGCCCGTTGACTTTCTGACCACTGAGCAGACTGAA
                ||||| |||||||||||||| ||||||||||||||| ||| |||||||||||||  |||
TnSWi1 1886  AAGCCGTCAGGCAGGGAGGCCGATATGCCCGTTGATTTTTTGACCACTGAGCAGGTTGAG  1945

J5083553     AGCTATGGCAGATTCACCGGTGAACCGGATGAGCTTCAGCTGGCACGATATTTTCACCTT
             || |||||||| ||||| || | ||| ||||| |||||||||||| || |||||||| |||
TnSWi1 1946  AGTTATGGCAGGTTCACTGGCGGACCCGATGAACTTCAGCTGGCGCGTTATTTTCATCTT  2005

J5083553     GATGAAGCAGACAAGGAATTTATCGGAAAAAGCAGAGGTGATCACAACCGTCTGGGCATT
             |||||||| || || ||||||||||| |||||| | ||||||||||| || || || |||
TnSWi1 2006  GATGAAGCGGATAAAGAATTTATCGGGAAAAGCCGGGGTGATCACAATCGACTTGGTATT  2065

J5083553     GCCCTGCAAATTGGATGTGTCCGTTTTCTGGGCACCTTCCTCACCGATATGAATCATATT
             ||||||||||| || ||||| |||||||||||||| || || || || |||||||||||||
TnSWi1 2066  GCCCTGCAAATCGGGTGTGTGCGTTTTCTGGGCACTTTTCTTACTGACATGAATCATATT  2125

J5083553     CCTTCCGGCGTCCGGCATTTTACCGCCAGACAGCTCGGGATTCGTGATATCACCGTTCTT
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2126  CCTTCCGGCGTCCGGCATTTTACCGCCAGACAGCTCGGGATTCGTGATATCACCGTTCTT  2185

J5083553     GCAGAATACGGTCAGAGGGAAAATACCCGCCGTGAGCATGCAGCGCTGATACGTCAGCAC
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2186  GCAGAATACGGTCAGAGGGAAAATACCCGCCGTGAGCATGCAGCGCTGATACGTCAGCAC  2245

J5083553     TATCAGTATCGTGAATTTGCCTGGCCCTGGACATTTCGCCTTACCCGTCTTTTATATACC
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2246  TATCAGTATCGTGAATTTGCCTGGCCCTGGACATTTCGCCTTACCCGTCTTTTATATACC  2305

J5083553     CGGAGCTGGATAAGCAACGAACGTCCTGGCCTGCTTTTCGATCTGGCGACAGGGTGGCTT
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
TnSWi1 2306  CGGAGCTGGATAAGCAACGAACGTCCTGGCCTGCTTTTCGACCTGGCGACAGGGTGGCTT  2365

J5083553     ATGCAACATCGTATTATTCTCCCCGGAGCCACTACGCTGACTCGGTTGATTTCAGAGGTA
             |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||||||||
TnSWi1 2366  ATGCAACATCGTATTATTCTCCCCGGAGCCACCACGCTGACCCGGTTGATTTCAGAGGTA  2425

J5083553     AGGGAAAAGGCGACGTTGCGCCTGTGGAACAAACTGGCACTGATACCGTCAGCCGAACAG
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2426  AGGGAAAAGGCGACGTTGCGCCTGTGGAACAAACTGGCACTGATACCGTCAGCCGAACAG  2485

J5083553     CGTTCACAGCTGGAGATGCTGCTGGGGCCAACTGATTGCAGCCGCCTGTCTTTACTGGAA
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2486  CGTTCACAGCTGGAGATGCTGCTGGGGCCAACTGATTGCAGCCGCCTGTCTTTACTGGAA  2545

J5083553     TCACTGAAAAAAGGCCCTGTGACCATCAGTGGTCCGGCGTTTAATGAAGCAATTGAACGC
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2546  TCACTGAAAAAAGGCCCTGTGACCATCAGTGGTCCGGCGTTTAATGAAGCAATTGAACGC  2605

J5083553     TGGAAAACTCTGAACGATTTTGGCTTGCATGCTGACAACCTGAGTACACTCCCGGCTGTG
             |||||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2606  TGGAAAACTCTGAACGATTTTGGCCTGCATGCTGAAAACCTGAGTACACTCCCGGCTGTG  2665

J5083553     CGCCTGAAAAATCTCGCACGTTATGCTGGTATGACTTCGGTGTTCAATAT----------
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2666  CGCCTGAAAAATCTCGCACGTTATGCTGGTATGACTTCGGTGTTCAATATTGCCAGGATG  2725

J5083553     TCACCGCAGAAAAGGATGGCGGTTCTGGTTGCCTTTGTCCTTGCATGGGAAACGCTGGCG
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TnSWi1 2726  TCACCGCAGAAAAGGATGGCGGTTCTGGTTGCCTTTGTCCTTGCATGGGAAACGCTGGCG  2785
```

Legenda: As divergências estão marcadas com cores distintas. Notar a ocorrência de deleções e inserções.
Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 12 - Contexto genético do gene *bla*$_{KPC-2}$ no isolado J5083553



Fonte: Produzida pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Foram utilizados neste estudo 11 isolados de *P. aeruginosa* capazes de hidrolisar o imipenem em ensaio espectrofotométrico e negativos para genes de carbapenemases conhecidos e uma cepa produtora de KPC-2. Inicialmente, testes fenotípicos foram realizados para avaliar a presença de carbapenemases. A maioria dos isolados apresentou negatividade no teste Blue-Carba, sugerindo a presença de carbapenemases fracas, uma vez que esses isolados foram inicialmente selecionados por sua atividade de hidrólise de imipenem em ensaio espectrofotométrico, método com maior sensibilidade do que o colorimétrico (Blue-Carba).

É provável que a localização dos potenciais novos genes de carbapenemase seja cromossômica. Dois métodos para detecção de plasmídeos foram empregados, onde a maioria dos isolados apresentou resultado negativo. Outro aspecto é que a presença de plasmídeo nestes isolados não necessariamente indica que o gene de carbapenemase tenha localização plasmidial. Nos experimentos de eletroporação em *E. coli* TOP 10 e seleção em meio LB contendo 1µg/mL de imipenem, não foram obtidos transformantes.

Poucos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram CIM ≥64mg/L, sugerindo a presença de carbapenemases fracas. O isolado D8202543 apresentou CIM baixas para os carbapenêmicos e cefalosporinas, podendo indicar a presença de mecanismos secundários de resistência aos carbapenêmicos. Na ausência de carbapenemase a resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer devido à interação entre a hiperprodução de AmpC, a perda de OprD e o aumento da expressão de MexAB-OprM. Estudos têm demonstrado que a perda de OprD aumenta as CIMs de meropenem e imipenem até 16 µg/mL A redução da expressão da proteína OprF na membrana externa de *P. aeruginosa* também tem sido associada ao aumento das CIMs de ceftazidima e aztreonam (PAI et al., 2001; QUALE et al., 2006). Outro mecanismo de resistência que pode ter contribuído para a diminuição da susceptibilidade aos carbapenêmicos é a presença de mutantes PoxB (OXA-50). Estudos avaliando a superexpressão de OXA-50 em mutantes deficientes em *oprDampCpoxB,* demonstraram um aumento significativo nas CIMs de todos os carbapenêmicos, em especial o meropenem, com CIM ≥8 µg/mL. Contudo, essa

enzima não hidrolisa significativamente penicilinas e cefalosporinas (ZINCKE et al., 2016).

Análises do sequenciamento do genoma dos isolados de *P. aeruginosa* sem genes conhecidos de carbapenemases evidenciaram potenciais novos genes que codificam potenciais carbapenemases da classe B de Ambler. As sequências de aminoácidos apresentaram similaridade com duas MBLs já descritas em *P. aeruginosa* e outras cinco MBL ainda não descritas em isolados clínicos. Essas MBL são encontradas no cromossomo de bactérias ambientais, constituindo determinantes de resistência de relevância clínica se adquiridas por bactérias patogênicas. Sua nomenclatura foi definida com base no microrganismo a que foi associada sendo, *Pedobater roseus* (PEDO-1), *Massilia oculi* (MSI-1), *Janthinobacterium lividum* (THIN-B), *Caulobacter crescentus* (CAU-1) e *Bacillus anthracis* (Bla2) (DOCQUIER et al., 2004; DOCQUIER et al., 2002; GUDETA et al., 2016; MATERON et al., 2003). Também foram identificadas sequências deduzidas de aminoácidos com similaridade para betalactamases de classe C, que poderiam ter contribuído para a redução da susceptibilidade aos carbapenêmicos. Entretanto, novos experimentos de clonagem e caracterização enzimática devem ser realizados para que esses potenciais novos genes e seus respectivos produtos possam ser caracterizados.

O isolado D9203039 apresentou uma carbapenemase GES-20 associada a uma ESBL GES-19. A presença de enzimas GES entre isolados de *P. aeruginosa* com PCR negativo para carbapenemases demonstra que a frequência dessas enzimas pode estar sendo subestimada, uma vez que os *primers* utilizados na triagem inicial dos isolados não foram capazes de amplificar esses genes. O desenvolvimento de métodos rápidos e simples que auxiliem na detecção dessas enzimas se faz necessário para a correta epidemiologia molecular. Em 2018, um ensaio de PCR multiplex para a rápida identificação de carbapenemases do tipo GES foi desenvolvido. O teste foi capaz de identificar as variantes testadas, distinguindo-as quando ao perfil de substrato (ESBL ou carbapenemase). Esse é um exemplo de teste que poderá contribuir com a detecção das enzimas GES em *P. aeruginosa* (KAYAMA et al., 2018).

A curadoria manual do isolado D9203039, positivo para bla_{GES-19} e bla_{GES-20}, demonstrou que esses genes estão localizados em um integron de classe 1, In*724*. Esse integron foi descrito no México, sendo localizado em um plasmídeo

conjugativo de 40-kb em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *E.coli.* Acredita-se que esse integron tenha sido derivado do In*647* (GenBank: GQ337064) encontrado no cromossomo de isolados de *P. aeruginosa* albergando os genes bla_{GES-1} e bla_{GES-5}. Na região intergênica entre o conjunto dos genes bla_{GES-19} e bla_{GES-20} no In*724*, há um fragmento "TAAAACAAAGTTAG" duplicado do final da região *attI*. O mesmo tipo de duplicação foi encontrada na região intergênica dos genes bla_{GES-1} e bla_{GES-5} no In*647*. Duas repetições diretas de 5 nucleotídeos "ACAAA" foram localizadas no final da região *attI* e no início do cassete *aacA4* (BARRIOS et al., 2012; VIEDMA et al., 2009).

As enzimas GES-19 e GES-20 desempenham um importante papel na resistência aos carbapenêmicos no México. No período de agosto de 2004 a dezembro de 2011, um total de 124 isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados de pacientes atendidos em cinco hospitais mexicanos. Destes, 38 isolados foram positivos por PCR para enzimas do tipo GES, representando uma prevalência de 30,6%. Os genes bla_{GES-19} e bla_{GES-20} foram encontrados associados a três integrons de classe 1, In*724* (JN596280.1), In*768* (*aacA*42, GES-19, GES-20, *aacA*4, OXA-2, *aadA*1) e In*783* (*aacA*42, GES-19, GES-20, *aadA*1). Quatro grupos clonais foram identificados por PFGE (GARZA-RAMOS et al., 2015). Em 2017, Outros dois integrons de classe 1, In*1402* (CP021774) e In*1408* (CP022000), albergando os genes bla_{GES-19} e $bla_{GES-20,}$ foram localizados em dois isolados de *P. aeruginosa* com contexto genético similar. Esses isolados foram recuperados de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital na cidade do México. Ambos os isolados pertenciam ao ST309, mesmo ST do isolado de *P. aeruginosa* positivo para GES-19 e GES-20 identificado neste estudo (ESPINOSA-CAMACHO et al., 2017). A presença de cepas ST309 foi associada ao fenótipo MDR no México, sendo considerado um clone potencial de alto risco. De 60 isolados de *P. aeruginosa* analisados, nove apresentaram ST309, o mais frequente do grupo. Seis dos nove isolados foram recuperados de amostras de urina de pacientes com infecção do trato urinário, com o maior perfil de resistência, e quatro isolados apresentaram até três betalactamases diferentes (GES-20, OXA-2 e KPC) (MORALES-ESPINOSA et al., 2017).

Recentemente foram encontrados dois isolados de *P. aeruginosa* ST309 com extenso fenótipo de multirresistência nos Estados Unidos. Esses isolados albergavam os genes bla_{GES-19} e bla_{GES-27}, localizados no cromossomo em um

integron de classe 1. A betalactamase OXA-2 foi encontrada associada ao integron, compartilhando estreita relação com os isolados encontrados no México e com o isolado identificado neste estudo. A presença em tandem dos genes que codificam essas enzimas foi associada com resistência a todos os betalactâmicos, incluindo as combinações de ceftolozana/tazobactam, ceftazidima/avibactam e meropenem/vaborbactam (KHAN et al., 2019). Esses achados evidenciam o potencial de disseminação dessa linhagem MDR.

A análise por PFGE identificou 7 grupos clonais distintos. Quanto à tipagem por MLST, os ST277 e ST1560 foram os tipos predominantes. Ambos os grupos apresentaram similaridade de aproximadamente 94% entre os perfis clonais por PFGE. O ST277 é endêmico em *P. aeruginosa* e considerado um clone de potencial alto risco, estando associado a isolados produtores de SPM-1 (FONSECA et al., 2015; MARTINS, W. et al., 2018; SILVA, F. M. et al., 2011). O ST1560 foi recentemente associado a isolados de *P. aeruginosa* extensivamente resistentes e positivos para bla_{KPC} (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2019).

O isolado J5083553 apresentou o gene bla_{KPC-2} localizado em um *contig* único de 128.487 bp. Esse *contig* apresentou maior cobertura e identidade com plasmídeos. O gene foi localizado associado à sequência de inserção ISKpn6, região compartilhada entre plasmídeos de *P. aeruginosa* albergando o gene bla_{KPC-2} (CARRARA-MARRONI et al., 2015; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018; NAAS et al., 2013). Esse isolado apresentou um plasmídeo de aproximadamente 453 kb. No entanto, ensaios de conjugação bacteriana falharam em obter colônias de transconjugantes. Considerando a grande similaridade do *contig* obtido com sequências nucleotídicas de plasmídeos depositados no GenBank, é provável que o gene bla_{KPC-2} esteja localizado no plasmídeo de 453 kbp, mas testes de hibridização com sondas marcadas se fazem necessários para confirmação da localização do gene. Esse isolado pertence ao ST446, um clone associado a um isolado de *P. aeruginosa* recuperado de um paciente atendido no Centro Médico da Universidade Erasmus de Roterdã, Holanda, que albergava o gene bla_{VIM-2} em um integron de classe 1 localizado em um plasmídeo conjugativo (VAN DER ZEE et al., 2018).

7 CONCLUSÕES

1. Dez isolados apresentaram negatividade no teste Blue-Carba, compatível com presença de carbapenemases fracas.

2. É provável que a localização dos potenciais novos genes de carbapenemases nos oito isolados de *P. aeruginosa*, onde não fora observados plasmídeos, seja cromossômica.

3. O sequenciamento do DNA genômico dos isolados de *P. aeruginosa* sem genes conhecidos de carbapenemase evidenciaram sete possíveis novos genes de carbapenemase do tipo MBL e novas variantes de AmpC.

4. O isolado D9203039 apresentou os genes bla_{GES19} e bla_{GES-20} inseridos em um integron de classe 1, In*724* e pertence ao ST309.

5. Os STs predominantes entre os isolados de *P. aeruginosa* foram os ST277 e ST1560.

6. O isolado E0163227 apresentou um novo ST denominado ST3187.

7. O isolado J5083553 apresentou o gene bla_{KPC-2} associado à ISKpn6 e ao Tn3 e tem provável localização em plasmídeo de aproximadamente 453 kb.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B,** v. 289, n. 1036, p. 321-31, 1980.

AMOUREUX, L. et al. Nosocomial Infections with IMP-19-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Linked to Contaminated Sinks, France. **Emerg Infect Dis,** v. 23, n. 2, p. 304-307, Feb 2017.

ANVISA. Nota técnica nº 01/2013: medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília, (2013).

ARAUJO, B. F. et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying aac(6')-Ib-cr, qnrS1 and *bla*SPM Genes in Brazil. **PLoS One,** v. 11, n. 5, p. e0155914, 2016.

AZIMI, A.; PEYMANI, A.; POUR, P. K. Phenotypic and molecular detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with burns in Tehran, Iran. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 51, n. 5, p. 610-615, Sep-Oct 2018.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat,** v. 9, n. 3, p. 142-56, Jun 2006.

BAHAR, G. et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. **J Antimicrob Chemother,** v. 54, n. 1, p. 282-3, Jul 2004.

BALERO DE PAULA, S. et al. Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 89, n. 1, p. 80-82, Sep 2017.

BARRIOS, H. et al. A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Mexico. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 56, n. 7, p. 4032-4, Jul 2012.

BEBRONE, C. et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 1, p. 396-401, Jan 2013.

BERRAZEG, M. et al. Mutations in beta-Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 59, n. 10, p. 6248-55, Oct 2015.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res,** v. 7, n. 6, p. 1513-23, Nov 24 1979.

BOTELHO, J. et al. Characterization of a new genetic environment associated with GES-6 carbapenemase from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to the high-risk clone ST235. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 2, p. 615-7, Feb 2015.

BOYD, D. A. et al. Identification of a novel metallo-beta-lactamase, CAM-1, in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Canada. **J Antimicrob Chemother,** v. 74, n. 6, p. 1563-1567, Jun 1 2019.

BRCAST. Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Brasil, (2017).

BRIZIO, A. et al. High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Int J Antimicrob Agents,** v. 27, n. 1, p. 27-31, Jan 2006.

BUSH, K. Characterization of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 33, n. 3, p. 259-63, Mar 1989.

_____. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1277, p. 84-90, Jan 2013.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med,** v. 6, n. 8, Aug 1 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 54, n. 3, p. 969-76, Mar 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 39, n. 6, p. 1211-33, Jun 1995.

CARRARA-MARRONI, F. E. et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **J Glob Antimicrob Resist,** v. 3, n. 4, p. 304-306, Dec 2015.

CARVALHO, A. P. et al. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital

located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist,** v. 12, n. 2, p. 103-8, Summer 2006.

CASTANHEIRA, M. et al. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 3, p. 1225-7, Mar 2009.

CASTANHEIRA, M. et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. **J Antimicrob Chemother,** v. 69, n. 7, p. 1804-14, Jul 2014.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 12, p. 4654-61, Dec 2004.

CAVALCANTI, F. L. et al. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of Sao Paulo metallo-beta-lactamase-producing isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 107, n. 3, p. 420-3, May 2012.

CEZARIO, R. C. et al. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enferm Infecc Microbiol Clin,** v. 27, n. 5, p. 269-74, May 2009.

CHEVALIER, S. et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **FEMS Microbiol Rev,** v. 41, n. 5, p. 698-722, Sep 1 2017.

CIPRIANO, R. et al. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the blaSPM clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. **Microb Drug Resist,** v. 13, n. 2, p. 142-6, Summer 2007.

COSTA, L. M. et al. Production of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the State of Sergipe, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 48, n. 2, p. 212-5, Mar-Apr 2015.

CRESPO, M. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 11, p. 5094-101, Nov 2004.

DANTAS, R. C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. **J Med Microbiol,** v. 63, n. Pt 12, p. 1679-87, Dec 2014.

DE OLIVEIRA SANTOS, I. C. et al. Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist,** v. 15, p. 99-100, Aug 30 2018.

DE OLIVEIRA SANTOS, I. C. et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). **Infect Genet Evol,** v. 73, p. 411-415, Sep 2019.

DESHPANDE, L. M. et al. IMP-33, a New IMP variant detected in *Pseudomonas aeruginosa* from Sicily. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 12, p. 6401-3, Dec 2013.

DJAHMI, N. et al. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 305784, 2014.

DOCQUIER, J. D. et al. Biochemical characterization of the THIN-B metallo-beta-lactamase of *Janthinobacterium lividum*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 12, p. 4778-83, Dec 2004.

DOCQUIER, J. D. et al. CAU-1, a subclass B3 metallo-beta-lactamase of low substrate affinity encoded by an ortholog present in the *Caulobacter crescentus* chromosome. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 6, p. 1823-30, Jun 2002.

DOI, Y. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 51, n. 3, p. 852-6, Mar 2007.

DULJASZ, W. et al. First organisms with acquired metallo-beta-lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 5, p. 2221-2, May 2009.

EL-GAMAL, M. I. et al. Recent updates of carbapenem antibiotics. **Eur J Med Chem,** v. 131, p. 185-195, May 5 2017.

EL-MAHDY, T. S. Identification of a novel metallo-beta-lactamase VIM-28 located within unusual arrangement of class 1 integron structure in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Egypt. **Jpn J Infect Dis,** v. 67, n. 5, p. 382-4, 2014.

ESPINOSA-CAMACHO, L. F. et al. Complete Genome Sequences of Four Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains, Isolated from Adults with Ventilator-Associated Pneumonia at a Tertiary Referral Hospital in Mexico City. **Genome Announc,** v. 5, n. 36, Sep 7 2017.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. OXA beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev,** v. 27, n. 2, p. 241-63, Apr 2014.

FERNANDES, T. A. et al. [Molecular characterization of carbapenem-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood cultures from children and teenagers with cancer]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 43, n. 4, p. 372-6, Jul-Aug 2010.

FERNANDO, D. M.; KUMAR, A. Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. **Antibiotics (Basel),** v. 2, n. 1, p. 163-81, Mar 18 2013.

FERREIRA, K. M. et al. First case of infection by metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz J Infect Dis,** v. 21, n. 3, p. 359-360, May - Jun 2017.

FONSECA, E. L. et al. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo-beta-lactamase *bla* SPM-1 and bicyclomycin bcr1 resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 9, p. 2547-50, Sep 2015.

FONSECA, E. L. et al. Emergence of *bla*GES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **J Antimicrob Chemother,** v. 59, n. 3, p. 576-7, Mar 2007.

FRANCO, M. R. et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics (Sao Paulo),** v. 65, n. 9, p. 825-9, 2010.

FURTADO, G. H. et al. Prevalence and clinical outcomes of episodes of ventilator-associated pneumonia caused by SPM-1-producing and non-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 44, n. 5, p. 604-6, Oct 2011.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother,** v. 52, n. 4, p. 699-702, Oct 2003.

GALETTI, R. et al. New Small Plasmid Harboring *bla*KPC-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 5, p. 3211-4, May 2016.

GARZA-RAMOS, U. et al. Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 81, n. 2, p. 135-7, Feb 2015.

GARZA-RAMOS, U. et al. Metallo-beta-lactamase gene *bla*(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 8, p. 2943-6, Aug 2008.

GIBB, A. P. et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*(IMP) allele, *bla*(IMP-7). **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 1, p. 255-8, Jan 2002.

GIRLICH, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 6, p. 2043-8, Jun 2004.

GONCALVES, D. C. et al. [Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Goiania, State of Goias]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 42, n. 4, p. 411-4, Jul-Aug 2009.

GUDETA, D. D. et al. The Soil Microbiota Harbors a Diversity of Carbapenem-Hydrolyzing beta-Lactamases of Potential Clinical Relevance. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 1, p. 151-60, Jan 2016.

GUTIERREZ, O. et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 51, n. 12, p. 4329-35, Dec 2007.

HANSON, N. D. et al. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 6, p. 2272-3, Jun 2006.

HONG, J. S. et al. Clonal Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 235 Isolates Carrying *bla*IMP-6 and Emergence of *bla*GES-24 and *bla*IMP-10 on Novel Genomic Islands PAGI-15 and -16 in South Korea. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 12, p. 7216-7223, Dec 2016.

IRAZ, M. et al. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 78, n. 3, p. 292-4, Mar 2014.

ISMAIL, S. J.; MAHMOUD, S. S. First detection of New Delhi metallo-beta-lactamases variants (NDM-1, NDM-2) among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iraqi hospitals. **Iran J Microbiol,** v. 10, n. 2, p. 98-103, Apr 2018.

ISO 2776-1. **Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices:** 19 p. 2006.

IYOBE, S. et al. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 6, p. 2014-6, Jun 2002.

JACOME, P. R. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 56, n. 9, p. 4990, Sep 2012.

JEANNOT, K. et al. IMP-29, a novel IMP-type metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 56, n. 4, p. 2187-90, Apr 2012.

JOVCIC, B. et al. The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the blaNDM-1 gene in a novel genetic context. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 7, p. 3405-7, Jul 2013.

JOVCIC, B. et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 55, n. 8, p. 3929-31, Aug 2011.

JUAN, C. et al. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 10, p. 3589-96, Oct 2008.

JUAN, C. et al. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 49, n. 11, p. 4733-8, Nov 2005.

KALLUF, K. O. et al. Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. **Infect Genet Evol,** v. 49, p. 130-133, Apr 2017.

KAYAMA, S. et al. Rapid identification of carbapenemase-type *bla*GES and ESBL-type *bla*GES using multiplex PCR. **J Microbiol Methods,** v. 148, p. 117-119, May 2018.

KAZMIERCZAK, K. M. et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 2, p. 1067-78, Feb 2016.

KHAN, A. et al. Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST309 Harboring Tandem Guiana Extended Spectrum beta-Lactamase Enzymes: A Newly Emerging Threat in the United States. **Open Forum Infect Dis,** v. 6, n. 7, p. ofz273, Jul 2019.

KOH, T. H. et al. Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel *bla*(IMP-26) gene. **J Clin Microbiol,** v. 48, n. 7, p. 2563-4, Jul 2010.

LABARCA, J. A. et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Crit Rev Microbiol,** v. 42, n. 2, p. 276-92, 2016.

LARAKI, N. et al. Structure of In31, a *bla*IMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 43, n. 4, p. 890-901, Apr 1999.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 43, n. 7, p. 1584-90, Jul 1999.

LINCOPAN, N. et al. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. **Int J Infect Dis,** v. 14, n. 4, p. e344-7, Apr 2010.

LIU, J. et al. Complete sequence of pBM413, a novel multidrug resistance megaplasmid carrying qnrVC6 and *bla*IMP-45 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents,** v. 51, n. 1, p. 145-150, Jan 2018.

MARTINS, A. F. et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection,** v. 35, n. 6, p. 457-60, Dec 2007.

MARTINS, W. et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 90, n. 3, p. 221-227, Mar 2018.

MATERON, I. C. et al. Biochemical characterization of beta-lactamases Bla1 and Bla2 from *Bacillus anthracis*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 47, n. 6, p. 2040-2, Jun 2003.

MAZZARIOL, A. et al. A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. **Clin Microbiol Infect,** v. 17, n. 5, p. 722-4, May 2011.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Ther Adv Infect Dis,** v. 3, n. 1, p. 15-21, Feb 2016.

MENDES, R. E. et al. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*IMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 12, p. 4693-702, Dec 2004.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol,** v. 7, p. 39, 2017.

MORALES-ESPINOSA, R. et al. Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. **Front Microbiol,** v. 8, p. 313, 2017.

MULET, X. et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 11, p. 5527-35, Nov 2013.

NAAS, T. et al. Complete sequence of two KPC-harbouring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother,** v. 68, n. 8, p. 1757-62, Aug 2013.

NASCIMENTO, A. P. et al. Intraclonal Genome Stability of the Metallo-beta-lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an Endemic Clone Disseminated in Brazilian Hospitals. **Front Microbiol,** v. 7, p. 1946, 2016.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.,** v. 47, n. 4, 2011.

PAGANI, L. et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase. **J Clin Microbiol,** v. 43, n. 8, p. 3824-8, Aug 2005.

PAI, H. et al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 45, n. 2, p. 480-4, Feb 2001.

PAN, Y. P. et al. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa.* **Arch Microbiol,** v. 198, n. 6, p. 565-71, Aug 2016.

PASTERAN, F. et al. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo-{beta}-lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum-{beta}-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 49, n. 1, p. 474-5, Jan 2005.

PEGG, K. M. et al. Biochemical characterization of IMP-30, a metallo-beta-lactamase with enhanced activity toward ceftazidime. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 10, p. 5122-6, Oct 2013.

PELEG, A. Y. et al. Emergence of IMP-4 metallo-beta-lactamase in a clinical isolate from Australia. **J Antimicrob Chemother,** v. 54, n. 3, p. 699-700, Sep 2004.

PELLEGRINO, F. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. **J Chemother,** v. 18, n. 2, p. 151-6, Apr 2006.

PELLEGRINO, F. L. et al. A carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain carrying the bla(SPM) gene. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 61, n. 2, p. 214-6, Jun 2008.

PEREIRA, M. D. O. **Caracterização genotípica e fenotípica de *Acinetobater* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases**. 2017. 81 Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PETROLI, S. B. P. et al. Early detection of a hypervirulent KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist,** v. 12, p. 153-154, Mar 2018.

PFENNIGWERTH, N. et al. Description of IMP-31, a novel metallo-beta-lactamase found in an ST235 *Pseudomonas aeruginosa* strain in Western Germany. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 7, p. 1973-80, Jul 2015.

PFENNIGWERTH, N. et al. Genetic and biochemical characterization of HMB-1, a novel subclass B1 metallo-beta-lactamase found in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **J Antimicrob Chemother,** v. 72, n. 4, p. 1068-1073, Apr 1 2017.

PICAO, R. C. et al. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 9, p. 3908-13, Sep 2009.

PIYAKUL, C.; TIYAWISUTSRI, R.; BOONBUMRUNG, K. Emergence of metallo-beta-lactamase IMP-14 and VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary-level hospital in Thailand. **Epidemiol Infect,** v. 140, n. 3, p. 539-41, Mar 2012.

POIREL, L. et al. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene *bla*(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 4, p. 1406-9, Apr 2004.

POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 44, n. 4, p. 891-7, Apr 2000.

POIREL, L. et al. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 45, n. 9, p. 2598-603, Sep 2001.

POLLINI, S. et al. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 1, p. 410-6, Jan 2013.

POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, *bla* GES-1 and *bla* GES-5, *bla* IMP-1 and *bla* SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect Dis,** v. 12, p. 176, Aug 3 2012.

POURNARAS, S. et al. Detection of a phylogenetically distinct IMP-type metallo-beta-lactamase, IMP-35, in a CC235 *Pseudomonas aeruginosa* from the Dutch-German border region (Euregio). **J Antimicrob Chemother,** v. 68, n. 6, p. 1271-6, Jun 2013.

POURNARAS, S. et al. Novel variant (*bla*(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene *bla*(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 12, p. 4026-8, Dec 2002.

QUALE, J. et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 5, p. 1633-41, May 2006.

RIERA, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. **J Antimicrob Chemother,** v. 66, n. 9, p. 2022-7, Sep 2011.

RIZEK, C. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Ann Clin Microbiol Antimicrob,** v. 13, p. 43, Sep 2 2014.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 5, p. 1766-71, May 2009.

RYOO, N. H. et al. Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo-beta-lactamase in a Korean hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 63, n. 1, p. 115-7, Jan 2009.

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

SALABI, A. E. et al. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 54, n. 1, p. 582, Jan 2010.

SANTOS et al. Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist,** v. 15, p. 99-100, Aug 30 2018.

SCHEFFER, M. C. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goias. **Braz J Infect Dis,** v. 14, n. 5, p. 508-9, Sep-Oct 2010.

SCHNEIDER, I. et al. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 8, p. 2977-9, Aug 2008.

SENDA, K. et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 40, n. 2, p. 349-53, Feb 1996.

SEVILLANO, E.; GALLEGO, L.; GARCIA-LOBO, J. M. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. **Pathol Biol (Paris),** v. 57, n. 6, p. 493-5, Sep 2009.

SEVILLANO, E. et al. Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathol Biol (Paris),** v. 54, n. 8-9, p. 493-7, Oct-Nov 2006.

SHERRATT, D. J. Bacterial plasmids. v. 3, n. 3, p. 189-195, 1974.

SHIBATA, N. et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. **J Clin Microbiol,** v. 41, n. 12, p. 5407-13, Dec 2003.

SIARKOU, V. I. et al. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*VIM-17 metallo-beta-lactamase gene. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 4, p. 1325-30, Apr 2009.

SILVA, F. M. et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. **Microb Drug Resist,** v. 17, n. 2, p. 215-20, Jun 2011.

SILVA, L. V. et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Med Microbiol,** v. 304, n. 8, p. 990-1000, Nov 2014.

STRELING, A. P. et al. Genetic and biochemical characterization of GES-16, a new GES-type beta-lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens.* **Diagn Microbiol Infect Dis**, May 12 2018.

TADA, T. et al. IMP-43 and IMP-44 metallo-beta-lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa.* **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 9, p. 4427-32, Sep 2013.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 70, n. 2, p. 296-316, Jun 2006.

TOLEMAN, M. A. et al. *bla*VIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 1, p. 329-32, Jan 2004.

TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother,** v. 50, n. 5, p. 673-9, Nov 2002.

VAN DER ZEE, A. et al. Spread of Carbapenem Resistance by Transposition and Conjugation Among *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Microbiol,** v. 9, p. 2057, 2018.

VIEDMA, E. et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 11, p. 4930-3, Nov 2009.

VILLEGAS, M. V. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 51, n. 4, p. 1553-5, Apr 2007.

WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother,** v. 57, n. 6, p. 1261-2, Jun 2006.

WILLMANN, M. et al. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 5, p. 1322-30, May 2015.

WOLTER, D. J. et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 4, p. 1660-4, Apr 2009.

WOLTER, D. J. et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 53, n. 2, p. 557-62, Feb 2009.

WOODFORD, N. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother,** v. 62, n. 6, p. 1265-8, Dec 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. p. 7, 2017.

XIONG, J. et al. *bla*(IMP-9) and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 1, p. 355-8, Jan 2006.

YAN, J. J. et al. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas isolates* in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 45, n. 8, p. 2224-8, Aug 2001.

YONG, D. et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, *bla*AIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 56, n. 12, p. 6154-9, Dec 2012.

YU, G. et al. First report of novel genetic array aacA4-*bla*IMP-25-oxa30-catB3 and identification of novel metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP25: A Retrospective Study of antibiotic resistance surveillance on *Pseudomonas aeruginosa* in Guangzhou of South China, 2003-2007. **Microb Pathog,** v. 95, p. 62-67, Jun 2016.

ZAMORANO, L. et al. VIM-47, a New Variant of the Autochthonous Metallo-beta-Lactamase VIM-13 from the Balearic Islands in Spain. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 5, p. 3251-2, May 2016.

ZAVASCKI, A. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-{beta}-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J Antimicrob Chemother,** v. 56, n. 6, p. 1148-51, Dec 2005.

ZINCKE, D. et al. Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 60, n. 2, p. 936-45, Feb 2016.