UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área Análises Clínicas

Análise molecular da expressão do fenótipo multi-droga resistente (MDR) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas após exposição *in vitro* ao Imipenem.

Mónica Alejandra Pavez Aguilar

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Co-orientador:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área Análises Clínicas

Análise molecular da expressão do fenótipo multi-droga resistente (MDR) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas após exposição *in vitro* ao Imipenem.

Mónica Alejandra Pavez Aguilar

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Co-orientador:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P337a Pavez Aguilar, Mónica Alejandra
Análise molecular da expressão do fenótipo multi-droga resistente (MDR) em enterobactérias isoladas de amostras clínicas após exposição *in vitro* ao Imipenem / Mónica Alejandra Pavez Aguilar. -- São Paulo, 2013.
134p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Mamizuka, Elsa Masae

Co-orientador: Lincopan, Nilton

1. Microbiologia clínica 2. Droga : Resistência em microorganismo : Microbiologia médica 3. Enterobacteriaceae : Bacteriologia I. T. II. Mamizuka, Elsa Masae, orientador. III. Lincopan, Nilton, co-orientador.

616.01 CDD

Mónica Alejandra Pavez Aguilar

**Análise molecular da expressão do fenótipo multi-droga resistente (MDR) em
enterobactérias isoladas de amostras clínicas após exposição *in vitro* ao Imipenem.**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

A. Alvaro e Gabriela.....

AGRADECIMENTOS

À professora Elsa Masae Mamizuka e o Professor Nilton Lincopan, pelo apoio e dedicação constantes durante estes 7 anos. Minha sincera gratidão.

À Comisión Nacional de Investigación Ciencia y Tecnología (CONICYT) do, pela bolsa concedida para a realização deste doutorado.

Aos professores, funcionários e auxiliares do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos centros hospitalares que aportaram as cepas para a realização deste estudo. Laboratório Médico Análises Clínicas de São Paulo, Hospital da Beneficência Portuguesa.

Aos diversos laboratórios de rotina e pesquisa que colaboraram na realização deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Jorge Sampaio, Dra. Marilis do Valle Marques e a Dra. Anna Sara Levin, pela importante contribuição na realização desta tese.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica, pelo compartilhar diário, o apoio e compreensão, durante estes 7 anos juntos.

Aos meus grandes amigos Lara Mendes de Almeida e Carlos Pires, pela amizade, ajuda e carinho durante estes 7 anos, vocês fizeram com que eu senti se o Brasil como a minha casa

À comunidade chilena-USP, por ter sido durante estes 7 anos minha família, muito obrigada pela amizade e por ser agora parte de minha vida.

A minha família, Álvaro meu companheiro de sonhos e desafios, obrigada pelo constante apoio e dedicação a nos duas. A minha pequena Gabriela, obrigada pelo teu sorriso meu amor, que da forças para seguir lutando dia a dia.

À Deus, por me bendizer cada dia e ser minha fortaleza em meus momentos fracos.

SUMARIO

	Pag.
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	30
3. Material e Métodos	
3.1 Amostras Bacterianas.....	31
3.2 Condições de cultura.....	31
3.3 Análises fenotípico da multi-droga re.....	32
3.4 Análise molecular da MDR.....	38
3.5 Técnica de passagem do Imipenem.....	43
3.6 3.6Análise estatística dos resultados.....	44
4. Resultados	
4.1 Perfil de sensibilidade dos grupos estudo.....	45
4.2 Tipagem molecular	48
4.3 Caracterização inicial do grupo submetido à indução de resistência aos carbapenêmicos.....	49
4.4 Caracterização do grupo controle fenótipo resistente a carbapenêmicos.....	53
4.5 Efeito da presença de BLA no perfil fenotípico de porinas de membrana externa.....	56
4.6 Caracterização fenotípica dos isolados após indução com antibiótico	

imipenem.....	57
4.7 <i>Fitness</i> bacteriano: Análise do crescimento bacteriano frente ao tratamento.....	61
4.8 Validação dos ensaios de qPCR.....	62
4.9 Efeito da indução do imipenem na expressão gênica dos determinantes do fenótipo MDR.....	64
4.10 Efeito da indução do imipenem na expressão gênica dos reguladores de MDR	73
4.11 Contribuição dos determinantes de resistência no perfil de CIM aos carbapênicos.....	79
4.12 Correlação da expressão dos genes reguladores com os genes determinantes de resistência.....	83
5. Discussão.....	86
6. Conclusões.....	103
7. Referências.....	104
ANEXOS.....	123

RESUMO

Após o surgimento e disseminação das β -lactamases de amplo espectro em membros da família Enterobacteriaceae, os antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem eertapenem) têm sido considerados a terapia de escolha devido à estabilidade apresentada contra estas enzimas. A desvantagem destes antibióticos é a sua capacidade de induzir resistência aos β -lactâmicos e a outros antibióticos quimicamente não relacionados. O imipenem tem favorecido a indução de cefalosporinases cromossômicas (AmpC) e também tem sido relacionado, in vivo, com a seleção de mecanismos intrínsecos de resistência, contribuindo com o perfil multi-droga resistente (MDR). Esse perfil é freqüentemente associado à diminuição da permeabilidade por alteração na síntese de porinas em conjunto com um aumento da atividade de bombas de efluxo, as quais não permitem o estabelecimento de uma concentração ativa do antibiótico no interior da célula bacteriana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o estabelecimento do perfil MDR em enterobactérias provenientes de isolados clínicos em função da exposição a diferentes concentrações de imipenem in vitro. A seleção do grupo das amostras estudadas foi feito por meio da determinação do perfil de sensibilidade dos isolados, tipagem molecular e ensaio de hidrólise de Imipenem. Nos isolados selecionados para a indução foi realizada numa etapa inicial (etapa basal) a análise de porinas de membrana externa por SDS-PAGE e o estudo de genes codificadores de β -lactamases pela técnica de PCR. O estudo do estabelecimento do perfil MDR foi feito por meio de passagens sucessivas das amostras em meio contendo concentrações sub-inibitórias de imipenem seguido de análise fenotípica (CIM e acúmulo do antibiótico intracelular e SDS-PAGE), e a análise da expressão gênica de genes associados a permeabilidade de membrana (ompC, ompF e AcrA) e genes reguladores (marA e ompR). Após a indução com o imipenem, 77% dos isolados induzidos aumentaram a CIM para os carbapenêmicos, mudando assim o perfil de resistência observado na etapa basal. Também foi afetado o perfil de resistência para outros antibióticos não relacionados a β -lactâmicos, porém numa percentagem menor. Com relação à alteração da permeabilidade, a perda de porina foi observada apenas para um isolado, no entanto a diminuição na expressão gênica de Omp36 foi significativa desde o começo da indução. A expressão da bomba de efluxo AcrAB foi afetada pela indução com imipenem, aumentando significativamente a expressão de AcrA, enquanto os reguladores estudados, MarA e OmpR tiveram a sua expressão induzida pelo imipenem. Foi possível observar também associação do nível de expressão gênica do regulador MarA com a expressão de AcrA, porém não foi possível observar uma associação estatisticamente significativa deste regulador com o perfil de expressão de OMPs. A indução de OmpR foi associado com um aumento da expressão de RNAm de Omp35, já para Omp36 foi possível observar apenas uma tendência na repressão deste gene. O estudo da resposta destes genes reguladores e determinantes de resistência, em resposta à exposição ao imipenem in vitro, permitiu reportar o comportamento molecular da bactéria numa resposta adaptativa no estágio inicial do estabelecimento do fenótipo MDR. A utilização de isolados clínicos com diversos determinantes de resistência permitiu observar a variabilidade nas respostas adaptativas das enterobactérias, o que é fundamental para a compreensão dos mecanismos de adaptação da bactéria e sua contribuição na falha terapêutica.

Palavras chaves: Enterobactérias, Perfil multi-droga resistência (MDR), Imipenem, Resistência a carbapenêmicos, Impermeabilidade de membrana, Porinas de membrana externa, Mecanismos de regulação de MDR.

ABSTRACT

After emergence and broad dissemination of extended spectrum β -lactamases into the Enterobacteriaceae family, the carbapenemic antibiotics (imipenem, meropenem and ertapenem) have been considered the chosen therapy in the treatment of nosocomial infections by the stability that these antibiotics show to these enzymes. The disadvantage of carbapenems is their capacity to induce resistance against β -lactams and to other chemically unrelated antibiotics. The imipenem has been shown to induce chromosomal cephalosporinases (AmpC) and it was also related, in vivo, with the selection of intrinsic mechanism leading to multi-drug resistance profile (MDR). This profile is usually associated with membrane impermeability due to reduced outer membrane porin synthesis with an incremented activity of efflux pumps, which results in a reduced concentration of antibiotics inside the bacteria. This study aimed to evaluate the establishment of the MDR profile in Enterobacteriaceae from clinical isolates by exposure to different concentrations of imipenem in vitro. The selection of the study group was performed by determination of antibiotic susceptibility profile, molecular typing and hydrolysis assay of imipenem. In the selected isolates submitted to induction, in an initial step (baseline), was performed the outer membrane porin analysis by SDS-PAGE and the gene-specific amplification of β -lactamase enzymes by PCR. The study of the establishment of MDR was performed by progressive passages with subclinical concentrations of imipenem, followed each one by the evaluation of phenotypic profile (MIC, accumulation antibiotic in cell and SDS-PAGE) and gene expression analysis of genes related to membrane permeability (ompC, ompF and acrA) and regulatory genes (MarA and ompR). After induction with imipenem, 77 % of the isolates increased the MIC for the carbapenems, changing the resistance profile at the baseline. In a lesser percentage, the resistance profile to other β -lactams-unrelated antibiotics was also affected. Loss of porin was observed only for an isolated, however a significantly decreased Omp36 mRNA expression was observed from the start of induction. The expression of the efflux pump AcrAB, was also affected by the imipenem induction, significantly increasing the AcrA gene expression, whereas the studied regulatory genes, MarA and OmpR, were induced by the imipenem. It was also possible to observe an association between the expression of the regulator MarA and the expression of AcrA, nevertheless no association was observed between this regulator and OMPs. OmpR induction was associated with an increased Omp35 mRNA expression, however only a trend for the repression of Omp36 was observed. The study of the response of these regulatory genes and genetic determinants of resistance, in response to the imipenem exposure in vitro, allowed to report the molecular behavior of the bacteria in an adaptive response in the initial stage of the establishment of a MDR phenotype. The use of clinical isolates with diverse resistance determinants allowed observing the variability in adaptive responses in enterobacteria, which is important to understand the adaptive mechanisms of bacteria to this antibiotic, the involvement in the emergence of the MDR profile and its contribution to the treatment failure.

Key words: Enterobacteriaceae, multi-drug resistance profile (MDR), imipenem, carbapenem resistance, Membrane impermeability, Outer membrane porin, Mechanisms of regulation of MDR.

LISTA DE ABREVIATURAS

APB	Acido Fenil Borônico	PBS	Tampão fosfato de sódio
BLA	B-lactamase	PCR	Reação em cadeia da polimerase
cDNA	DNA complementar	PFGE	Gel de eletroforese de campo pulsado
CIM	Concentração inibitória mínima	PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	RNA	Acido Ribonucleico
DNA	Acido deoxiribonucleico	RNA_m	RNA mensageiro
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>	RND	Bombas do tipo divisão-nodulação-resistência
ESBL	B-lactamase de espectro estendido	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel</i>
IC	Intervalo de confiança	SEM	Erro padrão da media
LB	Luria Bertani	sRNA	RNA pequenos
MDR	Multi-droga Resistencia	UFC	Unidade formadora de colônia
MH	Muller Hinton		
OMPs	Porinas de membrana externa		
OR	Odds ratio		
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina		

LISTA DE TABELAS

		PAG.
TABELA 1	<i>Primers</i> desenhados para carbapenemases.....	39
TABELA 2	<i>Primers</i> desenhados para ESBL e AmpC.....	40
TABELA 3	<i>Primers</i> desenhados para Qpcr.....	42
TABELA 4	Caracterização inicial do grupo selecionado para o tratamento de indução com imipenem.....	52
TABELA 5	Caracterização do grupo controle do perfil MDR, resistentes a carbapenêmicos.....	55
TABELA 6	Característica fenotípica dos isolados apor indução com imipenem.....	60
TABELA 7	Eficiência dos ensaios de qPCR.....	63

LISTA DE FIGURAS

		PAG
FIGURA 1	Frequência de resistência para classes de antibióticos não relacionados.....	46
FIGURA 2	Frequência de resistência para antibióticos β-lactâmicos	47
FIGURA 3	Presença de BLA v/s perfil fenotípico de porinas de membrana externa.....	57
FIGURA 4	Influencia do tratamento com imipenem no fitness bacteriano	62
FIGURA 5	Efeito do tratamento com imipenem na expressão do <i>AcrA</i>	64
FIGURA 6	Perfil de expressão do <i>AcrA</i> nos grupos resistente e sensível (induzidos) antes e após exposição ao imipenem.....	65
FIGURA 7	Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de genes de porinas.....	68
FIGURA 8	Efeito do tratamento com imipenem na expressão do <i>Omp35</i> de acordo com presença de enzimas β-lactamases.....	69
FIGURA 9	Perfil de expressão de (A) <i>Omp35</i> e (B) <i>OmpF</i> nos grupos resistente e sensível (induzido) antes e após exposição ao imipenem.....	70
FIGURA 10	Efeito do tratamento com imipenem na expressão do <i>Omp36</i> de acordo com presença de enzimas β-lactamases.....	71
FIGURA 11	Perfil de expressão de (A) <i>Omp36</i> e (B) <i>OmpC</i> nos grupos resistente e sensível (induzido) antes e após exposição ao imipenem.....	72
FIGURA 12	Efeito do tratamento com imipenem na expressão do <i>AmpC</i>	73
FIGURA 13	Perfil de expressão do <i>AmpC</i> nos grupos resistente e sensível antes e após exposição ao imipenem.....	74

FIGURA 14	Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de genes reguladores do fenótipo MDR	75
FIGURA 15	Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de <i>OmpR</i>.....	76
FIGURA 16	Perfil de expressão de genes reguladores do fenótipo MDR nos grupos resistente e sensível antes e após exposição ao imipenem	77
FIGURA 17	Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de <i>OmpR</i>	78
FIGURA 18	Efeito do tratamento com imipenem na expressão do <i>OmpR</i> de acordo com presença de enzimas β-lactamases.....	79
FIGURA 19	Perfil de expressão de <i>OmpR</i> nos grupos resistente e sensível antes e após exposição ao imipenem.....	80
FIGURA 20	Variação da expressão gênica de porinas de acordo com a variação da CIM de antibióticos carbapenêmicos	83
FIGURA 21	Variação da expressão de <i>AmpC</i> de acordo com a variação da CIM de antibióticos carbapenêmicos.....	84
FIGURA 22	Expressão gênica de (A) <i>AcraA</i>, (B) <i>Omp35</i> e (C) <i>Omp36</i> de acordo com o nível de expressão de <i>MarA</i>.....	85

1. INTRODUÇÃO

Bactérias Gram-Negativas têm adquirido um importante papel nas infecções hospitalares, sendo consideradas como um dos principais agentes de infecção e um problema para a saúde pública devido a sua prevalência e associação com índices elevados de resistência e mortalidade. A continua disseminação de essas bactérias multi-droga resistentes (MDR) reduz a eficácia dos antibióticos e conseqüentemente aumenta a frequência de falha no tratamento(Thomson e Bonomo, 2005)

No tratamento de essas infecções hospitalares, os carbapenêmicos têm se consagrado como uma das últimas alternativas terapêutica. Recentemente, os índices de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-Negativas de interesse médico têm aumentado de forma proporcional ao seu uso, como uma resposta adaptativa das bactérias (Hyle *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2011; Gales *et al.*, 2012). Em um estudo realizado na Korea, a exposição à carbapenêmicos (18 a 122 dias) desenvolveu altos níveis de resistência em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com tempo de hospitalização prolongado (Chia *et al.*, 2009). Além da resistência aos antibióticos carbapenêmicos, a terapia com imipenem tem contribuído a uma resposta adaptativa através de um mecanismo associado à impermeabilidade de membrana. Como conseqüência, pacientes com sérias condições que requerem internações prolongadas e avançados tratamentos estão cada vez mais susceptíveis à infecção por patógenos multi-resistentes (Bornet *et al.*, 2003; Chia *et al.*, 2010). Como última alternativa na terapia antimicrobiana, Falagas descreve a colistina e tigeciclina como os antibióticos mais ativos contra enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, porém a recomendação é apenas para bactérias produtoras de carbapenemases, pois a resistência por impermeabilidade de membrana também poderia afetar a susceptibilidade desses fármacos (Ruzin, Keeney e Bradford, 2005; Falagas, Karageorgopoulos e Nordmann, 2011)

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) são antibióticos β -lactâmicos com um amplo espectro de atividade desenvolvido com a finalidade de atender as necessidades médica na terapia de doenças infecciosas por bactérias multi-resistentes. Assim como todo antibiótico β -lactâmico, esses agem inibindo a síntese da parede bacteriana pela sua ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas – PBPs, sendo estáveis à degradação por β -lactamases do tipo AmpC cromossômica e β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Estes antibióticos atuam na fase extra citoplasmática da síntese da parede bacteriana bloqueando a transpeptidação, ligação covalente das cadeias lineais de fragmentos precursores de peptidoglicano catalisadas pelas transpeptidases (PBPs), desestruturando assim a camada de peptidoglicano da célula bacteriana e predispondo a bactéria à lise celular (Sampaio e Mello, 2007). Nas Enterobactérias, existem diversas proteínas ligadoras de penicilina com atividade trans-peptidase (PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3) e duas com atividade D-alanina carboxi-peptidase (PBP4 e PBP5). O efeito do antibiótico sobre a bactéria varia de acordo as afinidades do antimicrobiano pelas diferentes PBPs. Os antibióticos carbapenêmicos inibem a atividade trans-peptidase das PBP1a, PBP1b e PBP2 e a atividade das D-alanina carboxi-peptidases PBP4 e PBP5, levando à formação de um esferoplasto com uma subsequente plasmólise e morte bacteriana. Uma diferença dos antibióticos carbapenêmicos dos demais β -lactâmicos é a pouca afinidade pela PBP3, o que não induz o crescimento filamentosos septado das bactérias que leva a uma lenta lise celular (Rodloff, Goldstein e Torres, 2006).

Os antibióticos carbapenêmicos atualmente usados são o imipenem, meropenem, ertapenem e, mais recentemente, o doripenem. O imipenem, primeiro antibiótico carbapenêmico descoberto, apresenta uma estrutura de amidina derivada da tianomicina com substituições de grupos metila para incrementar a atividade bactericida e fornecer estabilidade contra as enzimas β -lactamases. A terapia com imipenem também permite reduzir a

quantidade de lipopolissacarídeos liberados durante a lise bacteriana, efeito clinicamente relevante quando comparado à terapia com ceftazidima. Os pacientes que recebem imipenem apresentam níveis menores de endotoxinas e uma tendência à normalização mais rápida dos níveis de citocinas (Prins *et al.*, 1995). Uma desvantagem desse antibiótico é a sua rápida degradação pela enzima dehidropeptidase-1 (DHP-1) localizada nos túbulos renais, necessitando, portanto, da administração combinada com um inibidor de DHP-1 como a cilastatina em proporção de 1:1. Mais tarde, os antibióticos meropenem e ertapenem demonstraram maior estabilidade para DHP-1, permitindo a administração sem a cilastatina (Zhanel *et al.*, 2007).

Os antibióticos do grupo dos carbapenêmicos tais como imipenem e meropenem possuem um amplo espectro de ação *in vitro*, o que inclui atividade contra cocos Gram-Positivos, bacilos Gram-Negativos e bactérias anaeróbias, com exceção de *Enterococcus faecium*, estafilococos resistentes à meticilina e *Stenotrophomonas maltophilia* (Zhanel *et al.*, 2007; Mohr, 2008). O seu uso é direcionado para uma variedade de infecções, incluindo infecções intra-abdominais graves de pele e partes moles, pneumonia nosocomial e infecções do trato urinário (Rodloff, Goldstein e Torres, 2006). Atualmente, o antibiótico meropenem foi aprovado pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para o tratamento de outras doenças além das relatadas, como meningites bacterianas em crianças maiores de três meses e para a terapia de febre neutropênica (Mohr, 2008). Quanto ao ertapenem, esta droga apresenta um espectro de ação mais limitado que o imipenem e meropenem, tendo uma eficiência limitada contra os bacilos Gram-Negativos não fermentadores, principalmente contra *Pseudomonas aeruginosa*, (Zhanel *et al.*, 2007). Por último, Doripenem, novo antibiótico carbapenêmico, apresenta um amplo espectro de ação com maior estabilidade frente as β -lactamases de espectro estendido e AmpC. Quanto às carbapenemases, o Doripenem tem taxas de hidrólise menores que os antibióticos imipenem e meropenem, exceto para a metalo- β -lactamase SPM-1 (Queenan *et al.*, 2010).

A desvantagem dos antibióticos carbapenêmicos é a sua capacidade de induzir resistência. O imipenem tem contribuído para a indução de cefalosporinases cromossômicas (AmpC) (Cornaglia *et al.*, 1995) e também tem sido relacionado à seleção de mecanismos de impermeabilidade de membrana, como o aumento da expressão de mecanismos de efluxo e diminuição da síntese de porinas, contribuindo na bactéria um perfil multi-droga resistente (MDR) (Bornet *et al.*, 2003).

Fenótipo MDR

Em isolados clínicos, a resistência a diversos antibióticos pode ser direcionada por respostas enzimáticas, mutações no gene alvo do antibiótico e modificações na permeabilidade da sua membrana, eventos geneticamente atribuídos à aquisição de elementos genéticos moveis como transposons e plasmídios que codificam diferentes mecanismos de resistência (Mallea *et al.*, 1998). No entanto, mecanismos adaptativos, presentes no DNA cromossômico, conferem à bactéria o fenótipo MDR (Aleksun e Levy, 1997). Este perfil MDR é freqüentemente associado às modificações nos processos de permeabilidade, seja pela diminuição da entrada (influxo) do antibiótico como a alteração de porinas ou aumento na atividade de efluxo do antibiótico pelas bombas de efluxo, impedindo o estabelecimento de uma concentração ativa do antibiótico no interior da célula bacteriana (Chollet *et al.*, 2004; Nikaido e Pages, 2011).

A resistência aos antibióticos, observada neste perfil MDR, se estende para fluoroquinolonas, ácido nalidíxico, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina e outros compostos químicos (Piddock, 2006a; Nikaido e Pages, 2011), porém, curiosamente, este perfil não está relacionado com resistência aos aminoglicosídeos (Bornet *et al.*, 2003).

Impermeabilidade de membrana

Porinas de Membrana externa (OMPs)

As porinas de membrana externa são as principais estruturas que determinam a permeabilidade da membrana externa para os solutos hidrofílicos através de canais hidrofílicos que selecionam por carga elétrica e tamanho da molécula, permitindo a difusão de um alto número de moléculas, incluindo antibióticos (Delcour, 2009).

As porinas têm uma estrutura diferente das proteínas de membrana, são formadas por folhas B antiparalelas com uma sequência predominantemente polar, sendo proteínas extremamente resistentes a detergentes. Existem três porinas maiores extensamente descritas em *E.coli*: PhoE, OmpF e OmpC, todas com uma alta similaridade entre elas (60-70%), porém a seletividade e condições de expressão diferem entre elas (Cowan *et al.*, 1992). PhoE com maior seletividade para moléculas aniônicas como fosfatos é regulada justamente pela necessidade de fosfatos na célula. OmpF (homóloga OmpK35) e OmpC (homóloga OmpK36) são as porinas mais abundantes em enterobactérias, com maior seletividade para moléculas catiônicas e regulação menos específica, influenciando na osmolaridade, pH, temperatura e nutrientes (Cowan *et al.*, 1992). Yoshimura e colaboradores, comprovaram a entrada dos antibióticos na célula através das duas porinas maiores, OmpC e OmpF, confirmando sua importância na susceptibilidade aos antibióticos (Yoshimura e Nikaido, 1985).

As porinas OmpC e OmpF, com similaridade de 60%, são geometricamente iguais, porém diferem no seu potencial elétrico. A maior distribuição de cargas negativas no loop L3 da OmpC, que confere a constrição do canal, leva a uma diminuição no interior do poro e uma seletividade mais catiônica, quando comparada com OmpF (Basle *et al.*, 2006). Tratamentos com antibióticos têm levado à diminuição da expressão de OMPs ou a substituições de aminoácidos que afetam o tamanho do poro ou o potencial elétrico do poro (García-Fernández *et al.*, 2010)

Existem diversos relatos de resistência mediada por porina em isolados clínicos de enterobactérias, afetando principalmente a sensibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (Martinez-Martinez *et al.*, 1996; Poirel *et al.*, 2004; Pavez *et al.*, 2008; Picao *et al.*, 2010). A resistência aos carbapenêmicos pela seleção *in vivo* de mutantes deficientes de porinas em isolados produtores de AmpC e ESBLs tem sido relatada após o tratamento do paciente com antibióticos carbapenêmicos ou cefalosporinas (Elliott *et al.*, 2006; Mena *et al.*, 2006; Oteo *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Findlay *et al.*, 2011). Doumith e colaboradores no ano de 2009 identificaram uma alta prevalência de lesões na sequência codificante para as duas porinas, como substituições e deleções que levaram a códons de parada prematuros e, mais freqüente ainda, interrupções pela presença de sequências de inserção (IS), porém a diminuição na expressão da porina em isolados que não apresentaram nenhuma destas lesões permaneceu sem explicação. O autor sugere a presença de mecanismos não identificados no nível regulatório ou de tradução que precisam de estudos adicionais (Doumith *et al.*, 2009).

Assim como previamente descrito, a expressão de porinas da membrana externa na resistência é regulada por diversos mecanismos, entre os quais esta a inativação do gene por sequências de inserção ou mutações presentes no promotor desse gene (Hernandez-Alles *et al.*, 1999; Kaczmarek *et al.*, 2006; Doumith *et al.*, 2009). Em uma condição fisiológica, sem pressão seletiva, a bactéria regula a expressão das porinas OmpC e OmpF segundo a osmolaridade, pH, temperatura e a presença de nutrientes, por meio de um sistema específico de dois componentes EnvZ/OmpR. EnvZ é uma histidina kinase com sensor transmembrana, sob baixa osmolaridade sua atividade fosfatase é maior que a de kinase, mantendo baixos níveis de OmpR fosforilado (OmpR-P), suficiente apenas para manter uma expressão de OmpF. Já sob uma alta osmolaridade, EnvZ tem atividade kinase, fosforilando altos níveis de OmpR, aumentando a expressão de OmpC e reprimindo OmpF (Yoshida *et al.*, 2006).

OmpR-P é o regulador de resposta ativado que se liga a sítios específicos do DNA localizados *downstream* da sequência codificante, aumentando a expressão gênica da porina.(Yoshida *et al.*, 2006). As porinas OmpF e OmpC tem 4(F) e 3(C) sítios de ligação para OmpR respectivamente, cada um consistindo de 20 pb, espaço adequado para duas moléculas de OmpR-P. Yoshida e colaboradores (2006) demonstraram que a ligação de OmpR-P nos sítios específicos do DNA tem uma ordem hierárquica F1-C1>F2-F3>C2>C3, o que permitiria a regulação passo a passo. A repressão de OmpF frente aos altos níveis de OmpR-P, é associada ao quarto sitio de ligação para OmpF, o qual ligaria OmpR-P no final da cadeia hierárquica, esta ligação fraca forma um loop que interatua com as moléculas OmpR-P dos sítios F1-F2-F3, para bloquear assim a transcrição da porina OmpF (Yoshida *et al.*, 2006).

Bombas de Efluxo: AcrAB-TolC

As bombas de efluxo bacterianas representam um mecanismo de proteção ativa contra compostos tóxicos, tendo assim um papel importante na resistência aos antibióticos baseada na diminuição da concentração do antibiótico no interior da célula bacteriana, o que permite sua maior adaptação e sobrevivência (Piddock, 2006b). Os sistemas de efluxo bacteriano com atividade para antimicrobianos são classificados em cinco classes: A superfamília facilitador major (MF), a família do cassete ligador de ATP (ABC), a família divisão-nodulação-resistência (RND), a família pequena multi-droga resistência (SMR) e a família de extrusão de multi-drogas e compostos tóxicos (MATE) (Poole, 2005). A maior preocupação com os sistemas de efluxo na resistência a antimicrobianos é a pouca seletividade das bombas, principalmente da classe RND, o que permite a expulsão de uma grande variedade de compostos, incluindo detergentes, compostos tóxicos e diversos antibióticos (Poole, 2005; Nikaido e Pages, 2011).

Em enterobactérias,o sistema de efluxo descrito com maior frequência na literatura é a bomba AcrAB-TolC que exporta substâncias nocivas para o microrganismo, permitindo a sua sobrevivência em ambientes hostis. O sistema AcrAB-TolC pertence à família RND e é

codificado pelo operón *acrRAB* que apresenta o gene regulador *acrR*, o gene *acrA* para a proteína periplasmática de fusão, seguido do gene *acrB* que codifica a produção da proteína transportadora de membrana citoplasmática, a qual é acoplada a uma proteína de membrana externa, TolC (Piddock, 2006a). A bomba AcrAB-TolC utiliza o gradiente de prótons para a sua energia, trocando um H^+ com o substrato a ser exportado, a proteína AcrB captura o substrato e o transporta até o meio externo via TolC, enquanto a proteína AcrA atua como fusão entre AcrB e TolC (Poole, 2005). A emergência de isolados clínicos resistentes de *E.aerogenes* e *K.pneumoniae* com um aumento na expressão de AcrAB tem sido relatado por diversos grupos (Davin-Regli *et al.*, 2008; Bratu *et al.*, 2009; Pages *et al.*, 2009). Para Swick e colaboradores, a poli especificidade da proteína exportadora AcrB faz com que a expressão de AcrAB seja um interessante marcador para o fenótipo MDR (Nikaido e Pages, 2011; Swick *et al.*, 2011). Os substratos da bomba AcrAB-TolC são: cloranfenicol, fluoroquinolonas, β -lactâmicos lipofílicos, tetraciclina, rifampicina, noboviocina, ácido nalidíxico, brometo de etídio, sais biliares, ácidos graxos de cadeias pequenas, SDS e triclosan (Piddock, 2006a).

O envolvimento de efluxo com resistência a antibióticos β -lactâmicos é ainda discutido. Já foi demonstrada a participação de bombas de efluxo em *P. aeruginosa*, porém, em enterobactérias, existem apenas sugestões de participação baseada na hipótese de diminuição na susceptibilidade para cefoxitina mediada por efluxo nos isolados que apresentaram altos níveis de expressão de AcrAB, quando comparado com isolados susceptíveis (Hasdemir *et al.*, 2004). Nos últimos anos, tem sido relatada a diminuição da susceptibilidade para tigeciclina associado a um aumento na expressão de AcrAB, diminuindo ainda mais as opções de tratamento, uma vez que esse antibiótico tem sido introduzido como uma alternativa para enterobactérias com múltipla resistência (Ruzin, Keeney e Bradford, 2005; Rosenblum *et al.*, 2011).

A regulação local da bomba AcrAB depende da atuação da proteína AcrR, localizada no início do *lôcus AcrRAB*. O mecanismo de regulação ainda não foi totalmente elucidado, sabe-se, porém que a proteína AcrR é um repressor transcripcional que possui dois domínios, o domínio pequeno N-terminal, no qual está localizado o motivo encarregado da ligação com DNA e o domínio maior C-terminal de ligação com uma cavidade interna que liga múltiplas drogas. AcrR regula tanto os níveis de AcrAB, reprimindo a expressão da bomba, como a sua própria expressão, funcionando, então, como um modelador secundário para prevenir a expressão excessiva de AcrAB. Gu e colaboradores, através de uma análise na estrutura de AcrR, demonstraram que a ligação da droga ao domínio C-terminal, leva a uma mudança na conformação do domínio N – terminal o que resulta numa liberação da AcrR do operador no DNA, funcionando então como um modelador secundário para prevenir a expressão excessiva de AcrAB (Gu *et al.*, 2008).

Existem diversos estudos sobre a super-expressão das bombas de efluxo em isolados clínicos, entre esses: mutação no gene repressor (*acrR*), mutação ou super-expressão dos genes reguladores globais de multi-resistência e seqüências de inserção no promotor do gene (Piddock, 2006a). Porém, dependendo do substrato, a indução é feita por vias diferentes. Ma e colaboradores identificaram que sob condições extremas de estresse os genes reguladores globais de multi-resistência não têm um papel importante no aumento da expressão de bombas (Ma *et al.*, 1996), mas em estudos de expressão em isolados clínicos multi-resistentes, o aumento de expressão da bomba AcrA foi relacionado a reguladores globais de multi-resistência como MarA, RamA, SoxS e Rob (Bratu *et al.*, 2009; Bialek-Davenet *et al.*, 2011; Findlay *et al.*, 2011)

Genes reguladores do fenótipo MDR

O desenvolvimento do fenótipo MDR em enterobactérias está associado a diversos mecanismos inespecíficos descritos anteriormente. A regulação destes mecanismos é realizada pelas modificações no transcriptoma das bactérias, por meio de reguladores locais específicos do genes estrutural ou de fatores transcripcionais globais denominados genes reguladores do fenótipo MDR.

Os genes reguladores de MDR têm sido estudados principalmente na família *Enterobacteriaceae*, entre eles, o operón *marRAB* e os genes *ramA*, *soxS* e *rob* (Chollet *et al.*, 2004; Abouzeed, Baucheron e Cloeckert, 2008; Rosner e Martin, 2009; Warner e Levy, 2010; Chubiz e Rao, 2011). O operón *marRAB* é o principal regulador do perfil MDR, controla a resistência a múltiplos compostos estruturalmente não relacionados, incluindo antibióticos, desinfetantes e solventes orgânicos. O operón *marRAB* é composto de três unidades transcripcionais, o gene repressor *marR*, o gene regulador *marA* e o gene *marB*, que codifica uma pequena proteína de função desconhecida (Randall e Woodward, 2002). A proteína MarA induz e reprime mais de 40 genes, porém a atividade importante para o fenótipo MDR é o aumento da expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC por uma via independente de AcrR e a produção de um RNA antisense (*micF*) que reduz a expressão da proteína de membrana externa OmpF, quando o ativador MarA é super expresso (Piddock, 2006a; Warner e Levy, 2010; Chubiz e Rao, 2011).

O mecanismo de regulação deste fator de transcrição é aumentar a afinidade da RNA-polimerase com o promotor que esta sendo regulado, a ativação depende não apenas da ligação do fator de transcrição com a sequência no DNA, a afinidade do RNA polimerase depende também da força da ligação da proteína reguladora (Rosenblum *et al.*, 2011). Chubiz e colaboradores, ao estudar a regulação da expressão de porinas em bactérias expostas a

salicilatos, identificou que além da diminuição de expressão de OmpF pelo sRNA micF, MarA atuava também por uma via independente do sRNA (Chubiz e Rao, 2011).

As proteínas SoxS e Rob pertencem a mesma família, AraC/XylS do MarA. No perfil MDR, os três fatores regulam os mesmos genes por meio de vias independentes, com exceção de Rob que também contribui com os níveis de expressão de MarARB, regulando o repressor MarR. A proteína SoxS é encarregada do regulon de resposta ao superóxido, atua por meio de um sistema de dois componentes SoxRS, onde SoxR poderia atuar como sensor, porém a interação não seria proteína-proteína. SoxR, em um primeiro estágio, ativaria a transcrição de *soxS* para ativar, finalmente, a expressão do gene alvo (Wu e Weiss, 1992).

O gene *ramA* foi descrito pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae* no ano de 1995, mas já foram descritos homólogos do fator em *Enterobacter sp.* e *Salmonella sp.*. O fator de transcrição RamA foi relacionado com alta resistência ao cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, ampicilina, norfloxacin e trimetropin pelo aumento da expressão da bomba AcrAB e uma diminuição na expressão de OmpF por meio dos mesmos genes alvo do operon *marRAB*, usando as vias de ativação independentes (George, Hall e Stokes, 1995; Rosenblum *et al.*, 2011). Porém, devido às seqüências que são conservadas para ambos ativadores, poderá haver indução da auto transcrição e de seu homólogo potencializando a expressão de AcrAB-TolC e a diminuição da expressão de proteína de membrana (Chollet *et al.*, 2004). A diminuição na sensibilidade à tigeciclina, pelo aumento na expressão de bombas de efluxo, tem sido associada apenas à expressão deste fator de transcrição (Bialek-Davenet *et al.*, 2011; Rosenblum *et al.*, 2011).

RNAs pequenos

Os pequenos RNA (sRNA) têm sido identificados em células eucariotas como reguladores de desenvolvimento, morte celular, silenciamento gênico e como uma ferramenta útil para inativar mensagens específicas. Em procariotos, também tem sido relatados pequenos RNAs não codificantes regulando a replicação e manutenção de elementos extra-cromossômicos e, mais recentemente, foram identificados sRNA com um papel regulatório essencial em bactérias como resposta a condições de estresse na virulência bacteriana. Os sRNA têm a capacidade de regular múltiplos genes com um grande efeito na fisiologia celular, elucidando diversos efeitos regulatórios (Gottesman, 2005).

A expressão dos sRNA de procariotos não difere muito da expressão gênica de outros genes bacterianos, eles apresentam promotores similares e são altamente regulados. Os sRNA bacteriano tem um comprimento de 80 a 100 nucleotídeos e geralmente não é processado como os seus homólogos na célula eucariota. A estrutura do sRNA ajuda na sua estabilidade, freqüentemente começa com uma sequência que forma uma alça estável e acaba com um terminador de transcrição dependente de Rho, formando outra alça estável, o que permite maior estabilidade do que a apresentada pelo RNA mensageiro (Vogel *et al.*, 2003). A apresentação do sRNA na sequência alvo é realizada pela proteína Hfq, o que estabiliza ainda mais o pequeno RNA. Existem dois mecanismos de ação, descritos para os sRNAs bacterianos, o primeiro e principal é a inibição da tradução e/ou degradação do RNAm, o segundo mecanismo, exclusivo de procariotos, é a regulação positiva de tradução e estabilidade do RNAm (Gottesman, 2005).

Os sRNA envolvidos na regulação de OMPs atuam por meio do pareamento de bases, o sRNA antisense se liga à porção 5' não codificante (UTR) do gene, o que bloqueia o sítio de ligação do ribossomo (RBS), impedindo assim a leitura do RNAm (Vogel e Papenfort, 2006).

A degradação subsequente do mRNA é atribuída à endoribonuclease RNaseE. O pareamento do sRNA com o RNA_m ocorre com aproximadamente apenas 20 nucleotídeos formando um duplex imperfeito com o gene.

Existem diversos pequenos RNAs, estimando-se uma quantidade igual a 5% dos genes que codificam proteínas. Novos sRNA ainda estão sendo pesquisados, aproximadamente 20 deles tem função conhecida, entre eles, os sRNA associados à regulação de porinas em *Escherichia coli* como: *micF*, *micC* e *micA* para OmpF, OmpC e OmpA, respectivamente (Vogel e Papenfort, 2006; Guillier e Gottesman, 2008). MicF foi o primeiro sRNA proposto em *E. coli*, localizado na região *upstream* do gene *ompC*, tem um comprimento de 93 nucleotídeos dos quais 20 tem pareamento com OmpF para inibir a expressão de OmpF. A regulação de MicF depende dos fatores de transcrição globais associados ao perfil multi-droga resistente (i.e MarA, Rob, e SoxS) (Vogel e Papenfort, 2006). MicC, identificado apenas no ano de 2004, tem um comprimento de 109 nucleotídeos e está localizado em uma região intergênica de *ompN* e *ydbK*. O sRNA é encontrado na IS603, porém o mecanismo de regulação deste sRNA não foi ainda totalmente elucidado (Chen *et al.*, 2004).

Prevalência de MDR:

Estudos multicêntricos realizados pelo SENTRY ou MYSTIC têm mostrado que entre os principais agentes de infecções em pacientes de UTI está a família *Enterobacteriaceae*, sendo *Klebsiella pneumoniae* a espécie mais prevalente. Segundo o estudo realizado pelo SENTRY, *Klebsiella pneumoniae* está entre os cinco patógenos mais isolados na América Latina, sendo a segunda causa de infecções do trato urinário, o terceiro em bacteremias e o quarto lugar em infecções do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados (Sader *et al.*, 2004). Em estudos atuais do SENTRY realizados em diversos países, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* são os principais patógenos da família

Enterobacteriaceae, sendo *Escherichia coli*, em algumas regiões do mundo, principalmente na Ásia, a bactéria Gram-negativa mais isolada e a segunda após *Staphylococcus aureus* (Farrell *et al.*, 2010; Gales *et al.*, 2012).

Estudos feitos pelo programa MYSTIC e SENTRY sobre o perfil de resistência apresentado por isolados da família *Enterobacteriaceae* de diversos sítios de infecção mostraram uma resistência moderada para cefalosporinas devido à presença de enzimas do tipo ESBL, principalmente em *E. coli* (4,9%), *K. pneumoniae* (7,2%) e *Proteus mirabilis* (1,6%), porém, no Brasil, atualmente a frequência de isolados de enterobactérias produtoras de ESBL é maior do que nos países de América do Norte ou Europa, alcançando quase 50% em *K. pneumoniae* e entre 13% em *E. coli* (Rossi, 2011; Gales *et al.*, 2012). A hiperexpressão de AmpC também aumenta a resistência para este tipo de antibiótico em *Citrobacter spp.* (17,7%), *Enterobacter spp.* (19,5%) e *Serratia spp.* (2,6%) (Turner, 2009). Uma importante mudança observada no perfil de susceptibilidade das enterobactérias foi o aumento de resistência às quinolonas. Um estudo retrospectivo do MYSTIC realizado nos Estados Unidos mostrou um aumento de 5 a 8 vezes nos últimos anos (4,8% a 31,8% para *E. coli*) nesta família (Rhomborg e Jones, 2009). Em outro estudo realizado com isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, 92% apresentaram diminuição na susceptibilidade às quinolonas, por meio da expulsão da droga por efluxo (Aathithan e French, 2011). A resistência aos carbapenêmicos foi inferior a 10%, porém com o surgimento da carbapenemase KPC essas porcentagens elevaram-se para 12% (Rhomborg e Jones, 2009), mas existem poucos dados epidemiológicos sobre a resistência ao imipenem por mecanismos de impermeabilidade de membrana. Num estudo de susceptibilidade realizado nos Estados Unidos entre os anos 2007-2009, Davies e colaboradores relataram uma mudança na resistência aos carbapenêmicos, com uma porcentagem de resistência entre 9% a 18%, dessa porcentagem 80% foi KPC

positivo e 20% foi associado só a perda de porina, porém 72,8% do total dos isolados resistentes apresentaram perda de porina (Davies *et al.*, 2011).

No Brasil, a resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias tem sido freqüentemente associada à carbapenemase KPC, esta unanimidade na resistência é atribuída, segundo Rossi, à falta de publicações oficiais e de descrição de características moleculares elucidando a resistência (Rossi, 2011). Em um estudo interno de nosso grupo de pesquisa, realizado no ano 2009, 74% (n=27) dos isolados obtidos de centros hospitalares do Estado de São Paulo, apresentaram resistência aos carbapenêmicos associada à impermeabilidade de membrana (Pavez, 2009).

Justificativa

A resistência aos antibióticos carbapenêmicos em infecções causadas por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* vem aumentando progressivamente nos últimos anos em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil. Aparentemente, o mecanismo de resistência aos antibióticos carbapenêmicos por enzimas carbapenemases, com exceção da produção da KPC, não é muito freqüente nesta família, indicando que a resistência estaria ligada a mecanismos adaptativos. Atualmente, os trabalhos nacionais que caracterizam a resistência aos carbapenêmicos em bacilos Gram-Negativos têm sido restritos à pesquisa de genes codificadores de carbapenemases (Lincopan *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2009; Pavez, Mamizuka e Lincopan, 2009; Figueiredo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). A relação da impermeabilidade de membrana com a resistência aos carbapenêmicos, no entanto, tem sido pouco estudada em nosso país, com exceção de alguns artigos que apenas notificaram o desenvolvimento *in vivo* da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias (Pavez *et al.*, 2008; Picao *et al.*, 2010).

Assim, existe um grande número de bactérias, não portadoras de genes de carbapenemases que apresentam resistência ao imipenem, sem a caracterização molecular do desenvolvimento da impermeabilidade.

Tem sido demonstrado, também, que o tratamento de infecções com imipenem por um período de cinco dias em cepas ATCC, seria suficiente para o surgimento de isolados resistentes, devido à diminuição da síntese da porina conjuntamente com a produção do sistema de bombas de efluxo (Bornet *et al.*, 2003). Porém ainda existe a necessidade de uma análise mais detalhada do desenvolvimento adaptativo da resistência e sua regulação gênica e o seu comportamento em isolados clínicos.

O mecanismo de impermeabilidade tem sido associado à regulação e envolve fatores de transcrição como os genes reguladores *marA*, *rob* e *ramA* que controlam a expressão dos transportadores de membrana (Davin-Regli *et al.*, 2006). Embora a impermeabilidade de membrana esteja associada aos diversos mecanismos de regulação previamente mencionados (Hasdemir *et al.*, 2004), existem poucos estudos que envolvem análise molecular dos processos de regulação do perfil de impermeabilidade em associação com a terapia antimicrobiana em isolados clínicos (Martinez-Martinez, 2008; Doumith *et al.*, 2009).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar os níveis de expressão dos genes reguladores y genes estruturais de MDR durante o estabelecimento dum perfil MDR em enterobactérias isoladas de amostras clínicas expostas a diferentes concentrações de imipenem.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar perfil fenotípico e genotípico de resistência emergente em isolados clínicos de enterobacterias do do Brasil
- Avaliar o comportamento fenotípico desenvolvido durante o estabelecimento dum perfil MDR em enterobacterias isoladas de amostras clínicas em função da exposição *in vitro* ao imipenem.
- Avaliar a expressão gênica dos determinantes genéticos relacionados à impermeabilidade de membrana no fenótipo MDR, em função da exposição *in vitro* ao imipenem.
- Avaliar a expressão gênica dos mecanismos reguladores de MDR no estabelecimento de resistência.
- Identificar a participação de mecanismo reguladores na regulação gênica dos determinantes de impermeabilidade de membrana
- Estudar a contribuição dos determinantes de impermeabilidade no perfil de resistência a carbapenêmicos, em função da exposição *in vitro* a imipenem.
- Analisar a associação de AmpC no estabelecimento de resistência para carbapenêmicos, em função da exposição *in vitro* a imipenem.

3. Material e métodos

3.1. Amostras

Inicialmente, foram incluídos 125 isolados clínicos de enterobactérias obtidos de diversos materiais clínicos coletados entre 2005 e 2009 em 3 centros hospitalares de São Paulo (anexo.1). As amostras foram divididas em quatro grupos segundo o perfil fenotípico de resistência apresentado: a) sensível, b) produtores de ESBL, c) produtores de AmpC e d) carbapenem-resistentes não carbapenemases.

De cada grupo foram selecionados isolados por meio da avaliação do perfil de susceptibilidade (Antibiograma e concentração inibitória mínima) e pela tipagem molecular (PFGE e ERIC-PCR) para um análise molecular detalhado e posterior indução com o antibiótico imipenem (anexo.2).

Serão utilizadas as cepas padrão para controle do estudo (cepas ATCC *Klebsiella Pneumoniae* 13883, *Escherichia coli* 25922, *Enterobacter aerogenes* 13048, *Escherichia coli* 35218 e *Klebsiella pneumoniae* 700603).

3.2 Condições de cultura

As cepas serão semeadas em ágar Mac Conkey (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) e incubadas por 24 h em estufa controlada a 37°C. As colônias foram semeadas em 3 ml de caldo Muller Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) e incubadas a 37°C por 24 h sob agitação constante em *shaker* rotativo a 150 rpm. Ao resultado dessa semeadura foram acrescentados 20% de glicerol para o congelamento.

3.3 Análises fenotípico da multi-droga resistência

3.3.1 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Foram realizados os antibiogramas utilizando o método de Kirby-Bauer, estabelecido pelo CLSI 2012, para obter o perfil de resistência aos antibióticos gentamicina, amicacina, ciprofloxacino, norfloxacino, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, ampicilina/sulbactam, imipenem, ertapenem, meropenem, doripenem, ceftazidima, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftriaxona, aztreonam, cefepime, piperacilina/sulbactam, cefoxitin e trimetoprim (OXOID, Cambridge, UK) (Clsi, 2012b).

3.3.2 Triagem de β -lactamases

A triagem para a produção de MBL foi realizada mediante sinergismo com o teste de dupla difusão com disco seguindo-se as recomendações do CLSI 2012 para os métodos de disco difusão. As amostras bacterianas suspensas em caldo Mueller-Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), ao atingir a escala 0,5 de McFarland, foram semeadas em ágar Mueller-Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Os discos contendo imipenem (10 µg) e ceftazidima (30 µg) foram alinhados a uma distância de dois cm de cada disco de filtro branco contendo 5 µL de cada um dos inibidores enzimáticos: EDTA (0.5 M), ácido 2-mercaptoacético e ácido 2-mercaptopropiônico, ambos em uma solução não diluído (Arakawa *et al.*, 2000)

Para avaliar a presença de ESBL foi feita uma triagem por meio do teste de dupla difusão com disco utilizando-se como substrato ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e aztreonam (30 µg). Os discos contendo antibióticos foram alinhados a uma distância de dois cm de um disco único com o inibidor ácido clavulânico em uma concentração de 4 µg/mL (Pellegrino *et al.*, 2006). Por último, para a triagem de AmpC, foram utilizados os métodos de dupla difusão com disco e a técnica de disco combinado descrito por Coudron no ano 2005. Para o teste de dupla difusão com disco, os antibióticos ceftazidima (30 µg) e cefoxitina (30 µg) foram alinhados com uma distância de 2 cm do disco de papel filtro contendo o inibidor APB em uma concentração de 400 µg. No método de

disco combinado, 20 µL de uma solução de APB (20 mg/mL) foram inoculados sobre os disco de ceftazidima (30 µg) e cefoxitina (30 µg) (Coudron, 2005).

3.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi realizada por microdiluição em caldo Muller-Hinton e Agar diluição segundo as normas do CLSI para os antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem), quinolonas (ciprofloxacino), aminoglicosídeos (gentamicina) tigeciclina, cloranfenicol e polimixina B (Clisi, 2013; Eucast, 2013).

3.3.3.1 CIM por diluição em agar:

O método de diluição em agar foi feito para as cefalosporinas, cefoxitina, ciprofloxacino, tetraciclina, carbapenêmicos na etapa inicial sem tratamento e cloranfenicol na etapa inicial e final do tratamento. Os agentes antimicrobianos foram testados em uma faixa de concentração entre 0,03 – 512 µg/mL. As diluições seriadas foram realizadas a partir de uma solução estoque em tubos contendo 19 mL de ágar Mueller-Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) previamente esterilizados e estabilizados a uma temperatura entre 45° a 50°C. Uma vez estabilizados, 1 mL da solução do antimicrobiano com concentração 20 vezes superior para cada diluição testada foi adicionado aos 19 mL de ágar Mueller-Hinton (BD, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Após homogeneização, o conteúdo foi depositado em placas de Petri estéreis de 90 x 15 mm.

Para cada amostra, 10 µL de cultura crescida *overnight* foram cultivados em 2 mL de caldo Mueller-Hinton (DIFCO, Lawrence, KS. USA) e incubadas a 37° C durante duas a três horas para atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland na fase de crescimento exponencial da bactéria, a qual foi confirmada no espectrofotômetro Spectronic 20 (ThermoSpectronic, Rochester, NY, USA) a uma absorvância entre 0,08 e 0,1 em um comprimento de onda de λ 625 nm. Este método de crescimento foi utilizado para todos os testes fenotípicos.

Para o teste de diluição em ágar, a suspensão bacteriana já atingida com turbidez equivalente ao 0,5 da escala de Mcfarland foi diluída em caldo Mueller-Hinton estéril na proporção 1:10, resultando em um inóculo de aproximadamente 10^7 UFC/ml. A seguir, 300 µL dessa suspensão foram transferidos para o inoculador de *Steers*. Desse modo, 1 a 3 µL de cada amostra foram inoculados simultaneamente em ágar Mueller-Hinton com uma concentração bacteriana final de 10^4 UFC/ML (CLSI 2012b) e as placas incubadas por 18 a 20 horas. A CIM foi definida como a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano e foram interpretadas de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pela CLSI para a família *Enterobacteriaceae* (CLSI 2012).

A determinação da CIM também foi realizada com inibidores de β -lactamases. Como inibidor de AmpC foi utilizado o ácido Fenil-Borônico (APB) (SIGMA-Aldrich, Stenheim, Alemanha) em uma concentração fixa de 400 µg/mL para os antibióticos cefoxitina, ceftazidima e imipenem (Coudron 2005).

3.3.3.2 CIM por microdiluição em caldo

O método de microdiluição foi utilizado nos antibióticos tigeciclina e polimixina B, também foi realizada a microdiluição para os antibióticos carbapenêmicos após cada etapa de indução com imipenem.

Os agentes antimicrobianos foram testados numa faixa de concentração de 0,015 – 32 ug/ml. As diluições seriada foram realizadas em cada placa a partir de uma solução inicial de 2 ml a 32 ug/ml utilizando um volume de 100 ul para cada diluição.

As amostras forma crescidas a 37 C *overnigth* em caldo Muller Hinton ou Muller Hinton cátion ajustado (DIFCO, Lawrence, KS. USA) no caso da tigeciclina e colistina. A partir desse cultivo foi atingida uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland e confirmada no espectrofotômetro Spectronic 20 (ThermoSpectronic, Rochester, NY, USA) a uma absorbância entre

0,08 e 0,1 em um comprimento de onda de λ 625 nm.. A suspensão bacteriana já atingida foi diluída 1:10 em caldo Muller Hinton estéril, resultando em um inóculo de aproximadamente 10^7 UFC/ml. e 5 μ l de essa suspensão foram depositados em cada um dos poços para obter assim um inóculo final de 10^4 UFC/ml (Clsi, 2012a).

O inibidor de bombas de efluxo, CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), foi utilizado em uma concentração fixa de 50 μ M (Hasdemir *et al.*, 2004)

3.3.4 Extração de porinas da membrana externa

Células bacterianas crescidas em fase estacionária serão coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos e lavadas com 10mM de tampão de fosfato de sódio (PBS), pH 7,0. O pellet será ressuspensão com o mesmo tampão acrescido de 1mM de fenil metil sulfonyl fluoreto (PMSF) e as células serão rompidas com o auxílio de sonicador, utilizando 3 pulsos de 1 minuto cada um, com intervalos de 1 minuto de resfriamento entre cada pulso para preservação das proteínas. Restos celulares serão removidos por meio de centrifugação a 4.300 rpm durante 15 minutos e o resultado do sobrenadante será submetido a ultra centrifugação a 30.000 rpm durante 120 minutos a 4°C para que sejam coletadas as frações de membrana. O sobrenadante dessa centrifugação será descartado e o pellet resultante será ressuspensão em 150 μ L de solução tampão PBS 10mM, pH 7,0, acrescido de PMSF na concentração final de 1mM. 100 μ L do volume final do lisado será tratado com 800 μ L de solução de sarcosil a 2% por 20 minutos à temperatura ambiente. A membrana externa será obtida por meio de centrifugação a 15.000 rpm durante 60 minutos a 4°C. O sobrenadante será descartado e o pellet será ressuspensão em 50 μ l de solução tampão PBS 10mM, pH 7,0 acrescido de 1mM de PMSF e mantido sob refrigeração (4°C) durante 24 horas para

solubilização. Posteriormente, será estocado a -20°C (Achtman *et al.*, 1983; Fung-Tomc *et al.*, 1995).

3.3.5 Análise das porinas de membrana externa

A análise das proteínas de membrana externa será realizada por meio de eletroforese SDS-PAGE. O material obtido será preparado de acordo com a metodologia descrita por Laemmli para análise de proteínas em SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Como controle serão utilizadas as cepas ATCC de *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Escherichia coli* 25922, *Enterobacter aerogenes* 13048 e a *Escherichia coli* K12, conhecidas previamente como sensíveis ao imipenem (cepas portadoras de porina 35 e 36 kDa). As amostras e o padrão de peso molecular serão aplicados no gel concentrado a 12% em volumes de 10 µL por poço e submetidas à eletroforese a fim de se obter a separação das proteínas para verificar a presença ou ausência de proteína que possui peso molecular de 35 e 36 KDa. Após a eletroforese, o gel será corado por Coomassie blue.

3.3.6 Hidrolise

Para excluir a presença de carbapenemases foi realizado uma triagem através do teste de Hodge Modificado (THM) para todos os isolados do grupo ESBL, AmpC e carbapenem resistente. Detalhadamente foi preparado um inóculo da cepa *E. coli* ATCC 25922 c a 0,5 da escala de McFarland, por meio do da suspensão direta da colônia, este inóculo foi semeado em uma placa de ágar Mueller-Hinton e no centro da placa colocado um disco de imipenem ou ertapenem de 10 µg.

Na preparação da amostra, foram tomadas 4 ou 5 colônias desde o Agar Mconkey previamente semeado e com auxílio de uma alça estriada amostra teste do centro do disco de β-lactâmico até a periferia da placa de Petri, da mesma maneira foi semeada a *K.*

pneumoniae ATCC 700603 como controle negativo. Após incubação à temperatura de 37°C, por 18-20 horas foi observado o crescimento da *E. coli* ATCC 25922 no halo de inibição do imipenem (distorção do halo de inibição). O crescimento da *E. coli* ATCC 25922 dentro do halo confirma a produção da enzima que foi capaz de inativar o imipenem.

As amostras que tiveram uma CIM >32 ug/ml no grupo resistente e os que tiveram um aumento significativo da CIM de carbapenêmicos (>2 diluições) após tratamento, foram submetidas a um novo estudo de hidrolise . As amostras semeadas previamente em Agar Muller Hinton, foram re-semeadas em caldo LB inoculando 4 a 5 colônias em 3 ml de caldo , após incubação overnight a 37°C, a amostra foi centrifugada a 3000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* resuspendido em 2 mL de tampão fosfato e transferidos para um eppendorf . As células foram rompidas por sonicação com 3 pulsos de 30 segundos numa amplitude de 30 %, com intervalos do mesmo período em gelo para preservação das proteínas. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 15.000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo o extrato protéico foi mantido a -20°C até a realização da hidrolise. Para medir a hidrolise 100 µl do extrato protéico foram introduzidos em uma solução de 100µM de imipenem e submetidos a um estudo de cinética por espectrofotometria (Evolution 201, Thermofisher, Waltham MA, USA) num comprimento de onda de 297nm. A medição de absorbância foi realizada cada 30 segundo durante os primeiros 10 minutos, após esse período foi realizada a medição em intervalos de 5 minutos durante 2 horas a 37°C, esta última para observar hidrolizadores lentos de imipenem. Foi utilizado em cada corrida de 7 amostras , uma suspensão de imipenem sem extrato protéico como controle da hidrolise natural do imipenem. Também foram utilizadas como controle e calibrador as amostras portadoras de carbapenemases, como IMP-1, VIM-1, NDM, KPC-2 e OXA-48.

3.4 *Análise molecular da MDR*

3.4.1 *Extração de DNA, PCR e sequenciamento*

Para a extração do DNA foi utilizado o método de fervura. A partir de uma cultura em caldo LB, *overnight*, alíquotas de 1 mL foram submetidas a centrifugação durante 1 minuto a 4.000 rpm. O sobrenadante será descartado e o pellet obtido será ressuspensão em 100 µL de água, qualidade milli-Q, estéril. Posteriormente, os microtubos contendo os *pellets* ressuspensos serão fervidos durante 10 minutos. Finalmente, após 5 minutos de centrifugação a 10.000 rpm, 100 µL de cada sobrenadante será transferido para um micro tubo estéril e congelado a - 20 °C.

A confirmação genética de β -lactamases será realizada por PCR utilizando *primers* específicos desenhados pelo programa Primer3 para amplificar os genes de carbapenemases, ESBL e AmpC tabela.1.

Tabela.1 Primers desenhados para carbapenemases

Primer	Gene alvo	Sequencia (5' - 3')	Tamanho amplicon	Referencia
Carbapenemases				
KPC_Fw	<i>bla_{KPC}</i>	TATCGCCGTCTAGTTCTGCT	865 pb	*
KPC_Rv		CGTTGACGCCCAATCC		
SME_Fw	<i>bla_{SME}</i>	TGCGGCAAAACAAATAAAA	771pb	*
SME_Rv		TGCAATACGTGATGCTTCC		
IMI/NMC_Fw	<i>bla_{IMI/NMC}</i>	TTTTCTCACAGGCCAATAC	756 pb	*
IMI/NMC_Rv		TGCTTGCTTCTTTTTTCG		
OXA-48_Fw	<i>bla_{OXA-48}</i>	GTGTTTTTGGTGGCATCG		*
OXA-48_Rv		TTCTTTTGTGATGGCTTGG		
VIM_Fw	<i>bla_{VIM}</i>	ATCCGACAGTCAGCGAAA	694 pb	*
VIM_Rv		GACTGAGCGATTTGTGTG		
SIM_Fw	<i>bla_{SIM}</i>	AAGAAGCCCAGCCAGATT	682 pb	*
SIM_Rv		ATTAATGAGCGGCGGTTT		
NDM_Fw	<i>bla_{NDM}</i>	AAGCTGAGCACCGCATTA	755 pb	*
NDM_Rv		GGCCGTATGAGTGATTGC		
GIM_Fw	<i>bla_{GIM}</i>	TTGTAGCGTTGCCAGCTT	633 pb	*
GIM_Rv		CTTCCAACTTTGCCATGC		
IMP_Fw	<i>bla_{IMP}</i>	GGAATAGRRTGGCTTAAYT	232 pb	Balsalobre <i>et al.</i> 2009
IMP_Rv		GGTTTAAYAAARCAMCCACC		
SPM_Fw	<i>bla_{SPM}</i>	CCTACAATCTAACGGCGACC	648 pb	Gales <i>et al.</i> 2003
SPM_Rv		TCGCCGTGTCCAGGTATAAC		

(*) Desenhados para esse estudo. (Gales *et al.*, 2003; Balsalobre *et al.*, 2009).

Tabela. 2 Primers desenhados para ESBL e AmpC

Primer	Gene alvo	Sequencia (5' – 3')	Tamanho amplicon	Referencia
ESBL				
SHV_Fw	<i>bla_{SHV}</i>	CGCGTAGGCATGATAGAAA	746 pb	*
SHV_Rv		TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
CTXM-1_Fw	<i>Bla_{CTXM-1}</i>	TTAGGAARTGTGCCGCTGT	815 pb	*
CTXM-1_Rv		TACAAACCGTTGGTGACGA		
CTXM-9_Fw	<i>Bla_{CTXM-9}</i>	TGGTGACAAAGAGARTGCAA	856 pb	*
CTXM-9_Rv		GATTCTCGCCGCTGAAG		
CTXM-2_Fw	<i>Bla_{CTXM-2}</i>	GACGCTACCCCTGCTATTTA	829 pb	*
CTXM-2_Rv		AGAAACCGTGGGTTACGATT		
CTXM-8_Fw	<i>Bla_{CTXM-8}</i>	TCGCGTTAAGCGGATGATGCT	828 pb	**
CTXM-8_Rv		TCGGTGACGATTTTCGCGGCA		
CTXM-25_Fw	<i>Bla_{CTXM-25}</i>	CGACAGCCTGTGTTTCGCTGC	854 pb	**
CTXM-25_Rv		TCGGTGACWATTCTGGCGGCA		
VEB_Fw	<i>bla_{VEB}</i>	TTCAAATGCTCAARCTGACAA	820 pb	*
VEB_Rv		TCCACGTTATTTTGCAATG		
BES-1_Fw	<i>Bla_{BES-1}</i>	GTGCGGTGGTGGTTGCTGGTGGT	818 pb	**
BES-1_Rv		TCGGGTGGCTTCGGCCAGTA		
TEM_Fw	<i>bla_{TEM}</i>	GTGCGCGGAACCCCTATT	968 pb	**
TEM_Rv		TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC		
GES_Fw	<i>bla_{GES}</i>	CGCTTCATTACGCACTATT	851 pb	*
GES_Rv		CGTGCTCAGGATGAGTTGTG		
AmpC				
MOX/CMY1_Fw	<i>Bla_{MOX/CMY-1}</i>	CAACAACGACAATCCATCCT	1070 pb	*
MOX/CMY1_Rv		CATGACGAYGCCGATCC		
CMY2_Fw	<i>Bla_{CMY-2}</i>	ATCGTTAAYCGCACCATCA	912 pb	*
CMY2_Rv		TATGYACCCABGAGGCTTT		
EBC/ACT_Fw	<i>Bla_{ACT/EBC}</i>	TTACSCCGCTGATGAAAG	996 pb	*
EBC/ACT_Rv		GCCRGTAGAGCCYGTITT		
DHA_Fw	<i>bla_{DHA}</i>	CTGCCGCTGATAATGTCG	1001 pb	*
DHA_Rv		CACAATCGCCACCTGTTT		
ACC_Fw	<i>bla_{ACC}</i>	TGTTATCCGTGATTACCTGTCT	983 pb	*
ACC_Rv		TCCAYACATTTTCCTGTGG		
FOX_Fw		ATGGCAARGCCCACTATT	981 pb	*
FOX_Rv	<i>bla_{FOX}</i>	CACTCGGCCAACTGACTC		

(*) desenhado para esse estudo. (**) cedidos pelo professor. Jorge Sampaio.

3.4.2 Análise da expressão gênica

3.4.2.1 Isolamento e avaliação do RNA total dos isolados bacterianos

O RNA foi extraído na fase exponencial do crescimento bacteriano a partir de uma suspensão de células contendo de 8×10^8 a 10×10^8 células/mL, lisadas utilizando-se o kit RNeasy mini-kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). O RNA total foi extraído em cada passagem para análise da expressão gênica dos genes reguladores, bombas de efluxo e porinas de membrana externa.

O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® e o grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260nm/A280nm (Sambrook, 2001).

3.4.2.2 Quantificação relativa de RNAm

A expressão do RNAm dos genes reguladores (*marA*, e *soxS*), de bombas de efluxo e porinas de membrana externa (*acrA*, *ompC*, *ompF*) das cepas em estudo foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real (RT-PCR). Os *primers* para a PCR em tempo real foram desenhados pelo programa primer3 (University of Massachuset, USA), em regiões consenso das sequência das diferentes espécies de enterobactérias coletadas para este estudo. Nos genes que não foi possível realizar o desenho nas regiões consenso, os *primers* foram desenhados separadamente (Tabela 3).

O cDNA foi gerado a partir de 800 ng de RNA utilizando-se 200 ng de *primers* aleatórios (*random primers*), DTT 10 mmol/L, 500 µmol/L dNTPs, 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript™ II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM]. A reação de RT foi realizada com as seguintes etapas: 25°C por 10min, 42°C por 50min e 70°C por 15min. O cDNA obtido foi armazenado a

–20°C até a realização da PCR utilizando os *primers* previamente desenhados para este estudo.

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação por *Sybrgreen*. O sinal de fluorescência foi detectado em tempo real no equipamento StepOne plus (Applied Biosystems, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada pelo método de quantificação relativa utilizando-se como gene de referência endógena (housekeeping) o *gapA*. O cálculo da expressão de RNAm dos genes estudados foi realizado utilizando-se o método do Ct comparativo com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Com a finalidade de monitorar a precisão dos resultados das reações de amplificação realizadas por RT-PCR, as amostras serão analisadas em duplicatas.

Tabela.3. Primers desenhados para qPCR

Primer	Gene alvo	Sequencia 5'-3'	Enterobacteria
OmpC1_exp Fw OmpC1_exp Rv	OmpC	ATCAGATTTCAGGGCAACAGC TGTCAGAACCGTAGGTGTCG	<i>E. coli</i>
Omp36_2_exp Fw Omp36_2_exp Rv	Omp36	G TTCAGGCGAACAACACTGA AGTTGTCGGAACCGTAGGTG	<i>E. aerogenes</i>
Omp36_3_exp Fw Omp36_3_exp Rv	Omp36	GATCGTTCTGGGAGCTGGTA GGTAAAAACGGTAGCGCAAG	<i>E. cloacae</i>
OmpK36_4_exp Fw OmpK36_4_exp Rv	OmpK36	GATCAGGCATGGACTCGTCT TGTCAGAACCGTAGGTGTCG	<i>K. pneumoniae</i>
OmpC exp 5_Fw OmpC exp 5_Rv	OmpC (41kDa)	ACCTGAACCACGCTGAAAAC CTCAGGCTGCAAGTCGGTAT	<i>S. marcescens</i>
Omp35-1_Exp Fw Omp35-1_Exp Rv	OmpF	TGACTTCTTCGTTGGTCGTG TTTTTACCGTTGCCAAGAGG	<i>E. coli</i>
Omp35-4.2_Exp Fw Omp35-4.2_Exp Rv	OmpK35	GCAGCGACGATACCACCTAT CCCCATTCAACCAGCATATC	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. aerogenes</i>
Omp35 exp 3_Fw Omp35 exp 3_Rv	Omp35	CCGGCGTGAGCGATAACTTCTTCT AACGCATCGGTACGCTCATTTTTG	<i>E. cloacae</i>
Ompf exp 5_Fw Ompf exp 5_Rv	OmpF (42kDa)	CAATACCAGGGCAAAAACCA AGTTTCTGGTCGTTCGGTACG	<i>S. marcescens</i>
AcrA1_Exp Fw AcrA1_Exp Rv	AcrA	TGATGCTCTCAGGCAGCTTA CTTTCGCCAGATCACCTTTC	<i>E. coli</i>
AcrA exp 2_Fw AcrA exp 2_Rv	AcrA	ATCGGCGACAAGTGGT TAGT TGCTGTTGGTTGTCTGAAGC	<i>E. aerogenes</i>

Cont. Tabela 3. Primers desenhados par qPCR

Primer	Gene alvo	Sequencia	<i>enterobacteria</i>
AcrA3_exp Fw	AcrA	AGCAGCTTGACCCGATCTAC	<i>E.cloacae</i>
AcrA3_exp Rv		TCGACGGTCACATCAGAAAA	
Acr4_Exp Fw	AcrA	AGACTACGATACCGCCGT	<i>K. pneumoniae</i>
Acr4_Exp Rv		CTTTGCCGTTTTCCTGTTTC	
SdeR exp 5_Fw	SdeR	CGGGCTTTATTACCGATTTG	<i>S. marcescens</i>
SdeR exp 5_Rv		CGCCGACACTTTCAGTTTTT	
AmpC exp 2_Fw	AmpC	CCGGGTAGTAAACGGCTGTA	<i>E. aerogenes</i>
AmpC exp 2_Rv		GATAACCCCAGGCGTAGTCC	
AmpC exp 3_Fw	AmpC	GGCATCTCTTGCTCTGCTCT	<i>E. cloacae</i>
AmpC exp 3_Rv		AATAGTGCGGTTTTCCCTGA	
AmpC5_exp Fw	AmpC	AGCTACCGCGTCTATTCCAA	<i>S. marcescens</i>
AmpC5_exp Rv		CTGAACGTAGGTGTGGCTCA	
MarA1_Exp Fw	MarA	TAGCATTTTGGACTGGATCG	<i>E. coli</i>
MarA1_Exp Rv		TGCATATTGGTCATCCGGTA	
MarA2_Exp Fw	MarA	ACGACGCCATCACTATCCAT	<i>E. aerogenes</i>
MarA2_Exp Rv		TGTTGCGATTCAAAACCGTA	
MarA_exp Fw	MarA	TGTCCAGACGYAAYAMTGA	<i>K. pneumoniae</i>
MarA_exp Rv		ATMCGTTGCAGGTGCCAYTT	<i>E. cloacae</i>
SdeR exp 5_Fw	SdeR	CGGGCTTTATTACCGATTTG	<i>S. marcescens</i>
SdeR exp 5_Rv		CGCCGACACTTTCAGTTTTT	
OmpR1_Exp Fw	OmpR	GGGGAAGAAGTGGACCGTAT	<i>E. coli</i>
OmpR1_Exp Rv		GCCTTCAGTACCGCAAATC	
OmpR2.4_Exp Fw	OmpR	GCGAGATGTTCCGTGAAGAC	<i>K. pneumoniae</i>
OmpR2.4_Exp Rv		GACGAAGACGTAGCCCAGAC	<i>E. aerogenes</i>

3.5 Técnica de passagem do Imipenem

Os isolados numa concentração de 1×10^7 UFC serão semeados em 60 ml de caldo LB acrescidos com o antibiótico imipenem numa concentração de 0,5 x CIM do antibiótico. Após 6 horas de incubação, na fase exponencial do crescimento bacteriano, 10 ml do caldo semeado serão separados e utilizadas para medir o crescimento por densidade óptica a 625 nm e realizar a extração do RNA (item 3.4.2.1) (Bornet *et al.*, 2003). Após uma incubação *overnight* dos 50 ml restantes serão realizada a extração de OMPs, a CIM para os carbapenêmicos e a extração do DNA. A confirmação da CIM será realizada semeando-se a cultura em ágar acrescido com a maior concentração de imipenem, onde a bactéria mostrou

crescimento. Os isolados serão submetidos a esta técnica de passagem de cinco a seis vezes (Noto, Fox e Archer, 2008)

3.6 Análise estatística dos resultados

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos dados obtidos. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa *GraphPadPrism* (GraphPad Software Inc., CA, EUA). A associação da presença de determinantes genéticos de resistência com perda da permeabilidade de membrana foi analisada pelo teste de qui-quadrado. O oddsratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados. A influência do tratamento com imipenem sobre o perfil de expressão de RNAm foi avaliada pelo teste de *oneway* ANOVA para amostras pareadas seguido do teste de Tukey. Para avaliar o efeito dos diferentes genes de resistência para antibióticos β -lactâmicos na variação da expressão gênica em resposta ao imipenem foi usado o teste *twoway* ANOVA seguido do teste de bonferroni. A diferença de expressão entre cepas resistentes e sensíveis, assim com entre aquelas que mantiveram e aumentaram a CIM foram estudadas pelo teste de *t* para amostras independentes. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil de sensibilidade dos grupos estudo.

As análises dos antibiogramas de cada grupo permitiram identificar diferenças no perfil de sensibilidade entre os grupos selecionados. Com relação aos antibióticos não β -lactâmicos foram observados diferentes níveis de resistência, porém não foi identificada nenhuma entre os grupos que foram classificados segundo a sensibilidade apresentada para os antibióticos β -lactâmicos (Figura 1). A resistência para os antibióticos cloranfenicol, quinolonas e sulfa-trimetropim foi maior nos grupos produtores de ESBL e carbapenem-resistentes do que nos grupos AmpC e sensíveis. Essa diferença pode estar relacionada com a possibilidade de uma maior modificação genética nos grupos ESBL e carbapenem-resistentes, uma vez que a produção de ESBL em isolados de enterobactérias ocorre, geralmente, pela obtenção de material extra cromossômico que carrega os genes de β -lactamases (Bradford, 2001) acompanhada de uma pressão seletiva provocada pela exposição aos antibióticos. Diversos ensaios clínicos relatam a relação direta da exposição a antibióticos com a expressão do perfil MDR (Hyle *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2011). A resistência aos carbapenêmicos também tem sido relacionada ao mesmo acontecimento.

Em contrapartida, o perfil apresentado pelos grupos produtores de AmpC e isolados multi-sensíveis pode estar associado a uma condição natural da bactéria, com menor exposição a antibióticos, uma vez que o grupo AmpC é formado apenas por espécies produtoras de AmpC cromossômicas (Anexo 1), as quais tem uma expressão basal da enzima que é possível observar no perfil de resistência aos β -lactâmicos (Figura 2). O perfil de resistência para tetraciclina obtido pelo antibiograma mostrou, curiosamente, um comportamento inverso à classificação realizada para os β -lactâmicos, porém esta tendência não foi tão clara frente a CIM deste antibiótico, onde nos grupos AmpC e carbapenem-resistentes a co-relação entre o antibiograma e a CIM foi menor do que entre os grupos ESBL e sensível.

O perfil de sensibilidade aos aminoglicosídeos manteve-se similar entre os grupos classificados. Em um estudo do monitoramento da sensibilidade á antibióticos na América do Norte, o perfil de resistência a aminoglicosídeos durante os anos de 2002 a 2008 não apresentou modificações significativas, se mantendo constante, o que sugere pouca capacidade de indução frente a uma pressão seletiva (Rhomborg e Jones, 2009). Finalmente, à tigeciclina, novo antibiótico da família das glicilciclinas, houve baixa porcentagem de resistência.

Figura 1. Frequência de resistência para classes de antibióticos não relacionados. S: grupo multi-sensível, ESBL: grupo produtores de ESBL, AmpC: grupo produtores de AmpC, CR: grupo carbapenêmicos resistentes. AMG: aminoglicosídeos, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, QUI: quinolonas, SXT: sulfa/trimetopim, TIG: tigeciclina.

O perfil de sensibilidade observado para os antibióticos β -lactâmicos teve uma distribuição esperada segundo a classificação de cada grupo (Figura.2). A resistência à ampicilina foi encontrada praticamente em todos os isolados (57% para os isolados do grupo sensível. A alta porcentagem de resistência, identificada no antibiograma para penicilina com inibidores de β -lactamases, foi atribuída aos inibidores ácido clavulânico e sulbactam. Frente a combinação de piperacilina/tazobactam, os grupos sensível, ESBL e AmpC apresentaram sensibilidade de 100%, 82% e 75%, respectivamente, além do grupo carbapenem-resistentes que apresentou isolados com

sensibilidade a esta droga. O grupo AmpC apresentou um perfil de sensibilidade decrescente para as cefalosporinas e monobactâmicos: cefepime> ceftazidima>aztreonam> cefotaxima, diretamente relacionado aos substratos da enzima AmpC .

A pequena porcentagem de resistência aos carbapenêmicos apresentada pelo grupo sensível foi atribuída a dois isolados clínicos, um isolado de *Proteus mirabilis* (S-4), espécie para a qual tem se relatado pouca co-relação do disco difusão para o antibiótico imipenem (Clsi, 2013) e outro isolado de *K. pneumoniae*, que apresentou alto nível de sensibilidade a diversos β -lactâmicos, porém sensibilidade diminuída para o ertapenem. No grupo AmpC, duas cepas de *Enterobacter sp.* também apresentaram sensibilidade diminuída para um dos carbapenêmico .

Figura 2. Frequência de resistência para antibióticos β -lactâmicos. S: grupo sensível, ESBL: grupo produtor ESBL, AmpC: grupo produtos de AmpC, Cr: grupo carbapenem-resistente. AMP:ampicilina, PEN/IN:penicilina/inibidor β -lactamase, CFL: cefalosporinas e monobactâmico, FOX: ceftazidima, CAR: carbapenêmicos

4.2 Tipagem molecular

Para estudar a endemicidade dos isolados clínicos de cada espécie, independente do grupo, foi realizada a tipagem molecular. Para os isolados da espécie *Serratia marcescens* não foi possível realizar a técnica de ERIC-PCR, apenas a técnica de PFGE.

As espécies de *E. cloacae* não apresentaram uma importante relação clonal, foram observados 4 clusters entre os 6 isolados da espécie. Os isolados da espécie *E. aerogenes* apresentaram alta relação clonal, entre os isolados carbapenem-resistentes foram identificados dois grandes grupos e, interessante, houve relação clonal entre os isolados dos diferentes grupos.

Para as espécie *E. coli* foram identificados 8 grupos de clonalidade e observou-se pouca similaridade entre os grupos, com exceção do cluster Ec7. Para os isolados da espécie *K. pneumoniae*, a diversidade clonal foi grande, identificando-se 19 grupos clonais, sem similaridade entre os grupos, com exceção de 5 clusters que apresentaram relação clonal entre os grupos. A pouca relação clonal entre os isolados dos diversos grupos, em conjunto com a endemicidade de algumas espécies em grupos específicos, principalmente no grupo carbapenem-resistente, sugere uma contribuição da estirpe no estabelecimento dos perfis de resistência (anexo 2).

Já na espécie de *S. marcescens*, através da técnica de PFGE, foi identificado apenas um grupo clonal que relacionou isolados com perfil de resistência diferentes denominado perfil clonal Sm1 (Anexo.2). Para os demais isolados observou-se pouca similaridade (< 85%), pelo qual foram classificados como isolados não relacionados.

A caracterização fenotípica dos isolados, feita pela identificação do perfil de susceptibilidade, CIM, triagem de β -lactamases e o perfil clonal das cepas estudadas, foi utilizado para realizar a seleção dos isolados que serão submetidos a indução de resistência.

4.3 Caracterização inicial do grupo submetido à indução de resistência aos carbapenêmicos.

4.3.1 Fenótipo multi-sensível

Após o estudo fenotípico do perfil de resistência dos vinte e oito isolados multi-sensíveis, foram escolhidos 6 representantes não relacionados, com resistência apenas para tetraciclina (33,3%) e aminoglicosídeos (33,3%). A CIM₉₀ dos carbapenêmicos foi 0,125ug/ml para imipenem, 0,03 ug/ml para meropenem e 0,03 ug/ml para ertapenem. A triagem fenotípica de β -lactamases foi negativa para os 6 isolados e o perfil fenotípico de OMPs mostrou a presença das duas porinas OmpC e OmpF (Tabela.4)

4.3.2 Fenótipo ESBL

Após o estudo do perfil de resistência das vinte e quatro isolados sugestivas de ESBL (Anexo.1), foram escolhidos 6 representantes não relacionados . Os isolados apresentaram uma 100% de resistência á penicilinas e cefalosporinas, apenas o isolado E-23 se mostrou sensível para ceftazidima. Na presença de inibidores os isolados deste grupo tiveram variação na sua resistência, sendo 100% resistente a ampicilina-sulbactam, 85% de resistência para amoxicilina com ácido clavulânico e apenas 14% de resistência para piperacilina tazobactam, os isolados não apresentaram resistência para os carbapenêmicos e um 33% foi resistente a cefoxitina.

Quanto a outras classes de antibióticos, o perfil do grupo ESBL, teve um alto percentagem de resistência para, sulfas (86%), quinolonas (86%) e cloranfenicol(100%). Para os aminoglicosídeos e tetraciclina apresentaram uma resistência de 28% e 43% respectivamente. A tigeciclina e polimixina tiveram um alto percentagem de sensibilidade nas CIM, porém a cepa E-23 teve um resistência para polimixina de 64 ug/ml. A CIM₉₀ dos antibióticos carbapenêmicos foi de 0,5 ug/ml para imipenem, 0,125 ug/ml para meropenem e

0,25 ug/ml para ertapenem. A utilização de inibidores na CIM, permitiu analisar a participação de β -lactamases na resistência para os β -lactâmicos, nos antibiótico carbapenêmicos, imipenem teve uma queda na sua CIM ≥ 3 diluições (cor cinza na CIM da Tabela 4) em dois isolados frente ao inibidor Ac. Clavulânico, sugerindo a atividade de ESBL frente a esse antibiótico. A atividade da ESBL frente à ceftazidima foi confirmada pela queda da CIM para esse antibiótico frente ao Ac. Clavulânico. Além da inibição por Ac. Clavulânico, o isolado E-12 teve uma queda da CIM frente ao ácido borônico. Nos testes de triagem, foi identificada a produção de ESBL em 100% dos isolados (Tabela 4). A identificação das ESBL pela PCR, mostrou a presença de SHV(52%) , CTX-M do grupo 2 (100%) e TEM(100%). O isolado E-12 carregava a enzima CTX-M do grupo 2, a qual após seqüenciamento foi identificada como uma nova variante CTX-M-141, presente num plasmídeo de 150 Kb carregada dentro de um integron de classe 1 complexo (Anexo.3). No perfil de OMPs nas cepas sugestivas de ESBL foi prevalente a presença de ambas porinas do tipo Omp35 e Omp36, porém duas cepas E-24 e E-23 tiveram ausência de uma porina (Tabela 4).

4.3.3 Fenótipo AmpC

Após o estudo do perfil de resistência dos 20 isolados sugestivos de AmpC, nove amostras não relacionadas foram escolhidas. O grupo apresentou 100% de resistência à cefamicina. Para os β -lactâmicos como penicilina com inibidores e cefalosporinas, a porcentagem de resistência foi de 100% para amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina/tazobactam, com uma taxa menor de resistência apenas para piperacilina/tazobactam (11%). Para as cefalosporinas o fenótipo AmpC teve percentagem de resistência diversos para as diferentes cefalosporinas (11 – 67%) e para os carbapenêmicos não se apresentou resistência.

Para outras classes de antibióticos a resistência foi de 67% para cloranfenicol, seguido de uma percentagem de 55 % e 33% para quinolonas e tetraciclinas respectivamente, já aminoglicosídeos e sulfas tiveram uma percentagem de resistência de 33 e 22% respectivamente. As CIM₉₀ de tigeciclina e polimixina foram 2 e >32 ug/ml respectivamente, valores resistentes segundo as normas da EUCAST, apresentando assim percentagem de resistência entre 44 e 55% (Tabela 4). A CIM₉₀ dos antibióticos carbapenêmicos foi de 1 ug/ml para imipenem, 0,25 para meropenem e 0,5 para ertapenem. O perfil de ação dos inibidores neste grupo foi completamente diferente ao grupo anterior, o que era de esperar em produtores de AmpC. O Ac. Borônico produz uma queda na CIM para ceftazidima e cefoxitina, antibióticos alvos das cefalosporinases AmpC, o isolado 686-1 teve uma diminuição da CIM frente ao ácido clavulânico. Para o antibiótico ertapenem, o Ácido Borônico, também diminuiu a CIM de dois isolados, sugerindo a participação da enzima nesse antibiótico (cor cinza na CIM, tabela.4). Frente ao inibidor de bombas de efluxo CCCP as cepas A-42 e A-26 tiveram uma diminuição ≥ 3 diluições nos antibióticos ertapenem e tigeciclina, sugerindo a contribuição de bomba de efluxo na resistência destes isolados.

Na triagem de β -lactamases, 100% dos isolados foram positivos para AmpC. Para ESBL, apenas dois dos isolados foram positivos. A identificação de β -lactamases por PCR mostrou a presença de ESBL do tipo CTX-M-2, CTX-M-1 e TEM. A presença de AmpC plasmidial foi identificada apenas na cepa A-42 de *Escherichia coli*, pertencente à família MIR/ACT, os demais isolados foram inclusos pela presença de AmpC cromossômica com expressão fenotípica. Finalmente, quanto ao perfil de OMPs, 66,7% dos isolados mostraram ausência de alguma das porinas de interesse.

Tabela 4. Caracterização inicial do grupo selecionado para o tratamento de indução com imipenem

ID	Bacteria	ANTIBIOGRAMA																CIM agar dilución																			Hodge				especie	PCR		porinas																																							
		AMK GENT	TET	CIP	NOR	CLO	AMP	AMX/AC	PIP/TZ	AMP/SL	ERT	IMP	DOR	FEP	AZT	CTX	FOX	SXT	TIG	IMP	IMP/AB	IMP/EDTA	IMP/AC	IMP/CCCP	MER	ERT	ERT/AB	ERT/AC	ERT/CCCP	CAZ/AB	CAZ/AC	CTX	CPM	FOX	FOX/AB	CLO	CLO/CCCP	TET	GEN	CIP		TIG	TIG/CCCP		POL	ESBL	MER	ERT	DC	DDD	bla																																
																																																					ESBL	MER	ERT	DC	DDD	bla																									
S16-1	E. coli	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,125				0,125	0,015	0,03			0,015	0,125	0,06	0,015	4		8		8		>64	16	0,125	0,125	0,06	0,06	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ec4	-	OmpC, OmpF																															
S16-2	E. coli	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,06				0,125	0,015	0,06			0,015	0,015	0,03	0,015	2		2	16	64	16	0,06	0,125	0,06	0,03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ec6	-	OmpC, OmpF																																	
S-23	K. pneumoniae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,125				0,125	0,03	0,03			0,015	0,25	0,06	0,03	2		4		2	0,5	0,015	0,03	0,03	ND	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Kp11	-	OmpK35, OmpK36																																	
S-13	K. pneumoniae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,125				0,25	0,03	0,03			0,03	0,125	0,06	0,03	4		8	8	2	0,5	0,125	0,5	0,25	0,06	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Kp10	-	OmpK35, OmpK36																																	
S-21	E. cloacae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,125				0,125	0,03	0,03			0,015	0,125	0,06	0,03	4		4	16	2	1	0,015	0,125	0,06	0,03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ecl1	-	Omp35, Omp36																																	
S-7	E. cloacae	S	ND	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,06				0,125	0,015	0,03			0,015	0,125	0,06	0,015	8		8	8	4	1	0,015	0,25	0,06	0,13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ecl2	-	Omp35, Omp36																																	
E-12	K. pneumoniae	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	0,125	0,125	ND	0,125	0,125	0,125	0,125	0,03	ND	16	2	1	32	16	8	16	>128	>256	4	ND	>32	0,5	0,25	0,06	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	HG	Kp14	SHV, CTX2*, TEM	OmpK35, OmpK36																															
E-1	K. pneumoniae	S	S	S	R	R	R	R	I	I	R	S	S	S	R	I	R	R	S	0,125	0,25	ND	0,03	0,125	0,06	0,25	0,125	0,06	0,25	8	4	1	128	64	16	8	>128	>256	4	ND	>32	0,25	0,5	0,06	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	Kp9	SHV, CTX2, TEM	OmpK35, OmpK36																															
E-4	E. coli	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	I	I	R	R	S	0,25	1	0,5	0,03	0,25	0,03	0,06	0,03	0,06	8	4	0,5	0,125	2	4	16	>128	256	>64	2	>32	0,5	0,13	0,03	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	HG	Ec7	CTX2, TEM	OmpC, OmpF																															
E-24	K. pneumoniae	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	0,5	2	0,5	0,25	0,5	0,125	0,06	0,03	0,03	0,06	4	8	1	64	16	4	8	32	ND	2	>128	16	0,5	0,5	0,06	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	HG	Ec7	SHV, CTX2, TEM	OmpK35																														
E-7	E. coli	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	0,5	1	0,25	0,03	0,25	0,03	0,06	0,03	0,03	0,03	8	2	0,5	32	16	8	8	>128	>256	>64	1	>32	0,125	0,03	0,06	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	HG	Ec8	CTX2, CTX25,TEM	OmpC, OmpF																														
E-23	S. marcescens	S	R	I	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	I	R	R	S	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,125	0,06	0,06	0,06	0,06	4	2	0,5	128	16	64	64	>128	128	ND	4	0,5	1	0,5	>32	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	Sm1	TEM, CTX2	OmpC																															
A-7	E. cloacae	S	S	S	S	S	R	R			S	S	S	R	S	I	R	R	S	0,5	ND	2	0,5	0,5	0,25	0,5	0,03	0,5	ND	128	1	64	64	1	256	16	8	16	4	0,5	0,015	0,25	0,5	0,13	A	(-)	(-)	(+)	(+)	Ecl4	-	Omp35																															
A-4	E. aerogenes	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	R	S	I	S	S	0,5	2	1	0,25	0,5	0,25	0,03	0,03	0,06	0,03	8	1	16	2	0,25	256	32	16	16	8	0,5	0,015	2	0,25	0,03	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	Ea4	TEM	Omp35																															
A-42	E. coli	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	0,5	0,125	0,5	0,5	0,5	0,125	0,5	0,03	0,5	ND	8	2	32	2	0,047	>256	64	8	8	2	1	0,03	0,5	0,5	0,03-8	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	Ec7	MIR/ACT	OmpF																															
A-16	S. marcescens	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	I	R	R	0,5	2	0,25	1	0,5	0,06	0,125	0,25	0,125	ND	256	2	128	64	8	>256	256	128	64	64	32	>32	2	1	>32	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	Sm5	-	OmpF																															
A-17	S. marcescens	R	S	S	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	1	1	0,25	0,5	0,25	0,03	0,25	0,25	0,25	0,06	4	1	2	32	2	128	128	128	64	64	32	>32	1	1	0,25-2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	Sm4	-	OmpC, OmpF																															
A25-1	S. marcescens	S	R	R	I	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	I	0,5	2	0,5	0,5	0,25	0,25	0,125	0,03	0,125	0,06	4	1	2	64	2	128	256	>128	>256	>64	1	2	8	4	8-32	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	HG	Sm8	TEM	OmpC, OmpF																														
A-26	S. marcescens	S	S	R	S	S	I	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	0,5	2	0,5	1	0,25	0,03	0,25	0,25	0,06	0,03	1	1	0,5	4	0,25	128	128	64	16	32	1	0,25	2	0,25	>32	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	Sm9	TEM,CTX1	OmpC, OmpF																															
A-38	S. marcescens	S	S	I	I	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	1	2	0,5	0,5	0,5	0,06	0,25	0,125	0,25	0,06	1	1	1	8	1	128	256	>128	128	64	1	4	1	0,5	1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	Sm3	-	OmpF																															
686-1	S. marcescens	S	R	S	I	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	I	R	0,5	2	2	1	0,5	0,125	0,125	0,03	0,06	0,06	4	4	0,5	>32	16	64	128	>128	256	16	2	0,5	1	0,5	>32	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	Sm1	CTX2	OmpC																															
		% resistencia																CIM90																Características por grupo																																																	
grupo	sensible	33.30%	0%	33.30%	0%												0,125				0,03				0,03				0,125				0,06				0,03				4				8				64				16				0,13				0,25				0,06				0%				(-)				(-)				-		
	grupo ESBL	28.60%	42.80%	85.70%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	85.7%	100%	100%	100%	100%	0%	0,5				0,125				0,25				16				128				16				>128				>64				128				>32				1				0,5				100%				(-)				(-)				SHV 57%, CTXM-2 E TEM 100%						
	grupo AmpC	22.2%	33.30%	55.50%	66.70%	66.70%	100%	100%	100%	100%	0%	85.7%	100%	100%	100%	100%	0%	1				0,25				0,5				128				64				8				>256				>128				64				32				>32				2				>32				22.20%				(-)				100%				33,3% TEM 11, 1%CTX2E 11,1%CTX1	

ID: identificam os isolados selecionados para indução. Antibióticos: Cores das células identificam a classe do antibiótico e os isolados resistente
 GEN: gentamicina, AMK: amicacina, TET: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, AMX/AC: amoxicilina/ac. Clavulanico, ERT: ertapenem, CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, FEP: cefepime, AZT: aztreonam, FOX: cefoxitina, MER: meropenem, SXT:sulfa/trimetopim, TIG:tigeciclina, PIP/TZ: piperacilina/tazobactam, CTX: cefotaxima, DOR: doripenem, AMP/SL:ampicilina/sulbactam, NOR: norfloxacina, AMP: ampicilina. AB: ácido borônico, AC: ácido clavulânico, CEP: cefepime, CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, POL: polimixina B,DC: disco combinado, DDD: dupla difusão de disco, bla:β-lactamaseo. ND::não determinado, HG: halo grande, A: antagonismo (*): nova CTX-M-141.CIM90: ug/ml.

4.4 Caracterização do grupo controle fenótipo resistente a carbapenêmicos.

Dos cinquenta e três isolados resistentes a carbapenêmicos coletados, estudados e triados para produção de carbapenemases, 24 representantes foram selecionados. Todos os isolados pertencentes ao grupo apresentaram resistência para os diferentes grupos de β -lactâmicos mostrando diferença apenas em alguns antibióticos específicos desta família. O perfil de MDR, também é demonstrado em quase todos os isolados com resistências de 88%, 96% e 92% para os antibióticos cloranfenicol, quinolonas e sulfas, respectivamente. Os isolados mostraram pouca resistência aos aminoglicosídeos e tetraciclinas com porcentagens de 25%. As CIM de tigeciclina e polimixina mostrou susceptibilidade diminuída em três e quatro isolados respectivamente.

No isolado C-52 foi observado uma sensibilidade pouco usual para ceftazidima e outras cefalosporinas (tabela.5). Esta característica observada, poderia estar relacionada a uma produção de AmpC, uma vez que algumas dessas enzimas não conseguem hidrolizar cefalosporinas de terceira geração (Pavez, 2009).

A CIM₉₀ dos carbapenêmicos foi 64ug/ml para os três antibióticos e com a utilização dos inibidores na microdiluição, observou-se que o ácido borônico foi o inibidor que teve maior participação na sensibilidade aos carbapenêmicos, 29% dos isolados tiveram uma queda significativa da CIM para o imipenem ou ertapenem frente ao ácido borônico, 8% dos isolados diminuíram sua CIM frente ao ácido clavulânico, sugerindo então que enzimas do tipo ESBL e AmpC poderiam estar promovendo o perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos (cor cinza na CIM). O EDTA, não teve nenhuma atividade frente aos isolados, já o isolado C-33 teve uma queda da CIM de ertapenem frente ao inibidor de bombas de efluxo CCCP. Quando o Ácido Borônico foi combinado cefoxitina, a percentagem de isolados que tiveram diminuição da CIM, foi apenas de 7%, o que associa ainda mais a resistência a uma alteração na impermeabilidade, já que a

alteração de porinas influi muito sobre a resistência observada para cefoxitina (Hernandez-Alles *et al.*, 1999; Martinez-Martinez *et al.*, 1999).

A triagem de β -lactamases, identificou produtores de ESBL em 46% dos isolados e AmpC em um 96%, 33% dos isolados tiveram algum grau de positividade na triagem de MBL, especialmente frente aos inibidores derivados de compostos tiólicos, como o Ac. Mercaptopropionico (MPP) e Ac. Mercaptoacetico (MPA) em combinação com ceftazidima. Segundo Picão e colaboradores EDTA tem uma melhor co-relação na produção de MBL em enterobacterias, principalmente com imipenem, já os ácidos derivados de compostos tiólicos, tem baixa especificidade e sensibilidade frente a ceftazidima numa distancia de 2 cm (Picao *et al.*, 2008).

Nossos resultados parecem ser concordantes com o descrito por Picão e colaboradores, uma vez que em nossos isolados não foi observada nenhuma diminuição da CIM frente ao inibidor EDTA junto com a pouca prevalência de THM positivo, com 25% apenas para o antibiótico ertapenem, com exceção do isolado C43-2 que apresentou positividade com ambos antibióticos ertapenem e meropenem. Este isolado e todos aqueles com valor da CIM >32 ug/ml foram analisados por uma segunda triagem de hidrolise, neste procedimento 6 amostras com PCR negativo para carbapenemases foram excluídas do grupo devido a um nível de hidrolise > 7 umoles/h de imipenem (cepas cor vermelho na tabela.5) Na pesquisa de outras β -lactamases por PCR, foram identificadas ESBL do tipo SHV em 63%, CTX-M-2 em 54% e TEM em 21% dos isolados, na pesquisa de AmpC, foi identificada CMY-2 em 8% dos isolados e 33% tem uma AmpC cromossômica com reação cruzada para a AmpC plasmidial do tipo MIR/ACT.

O perfil de OMPs para o grupo controle foi bem diverso, com 66,7% dos isolados com a ausência de uma das porinas de interesse na impermeabilidade de membrana.

Tabela 5. Caracterização do grupo controle do perfil MDR, resistentes a carbapenêmicos

ID	Bacteria	ANTIBIOGRAMA														CIM agar dilución																		POL	THM					AmpC	MBL	TIPAGEM	PCR																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
		GEN	TET	CIP	NOR	CLO	AMX/AC	AMP/SL	PIP/TZ	DOR	MER	IMP	ERT	TIG	SXT	FOX	CTX	AZT	FEP	CAZ	IMP/AB	IMP/EDTA	IMP/AC	IMP/CCP	MER	ERT	ERT/AB	ERT/AC	ERT/CCP	CAZ	CAZ/AB	CAZ/AC	CTX		CPM	FOX	FOX/AB	CLO	CLO/CCP							TET	GEN	CIP	TIG	TIG/CCP	ESBL	MER	D/C	DDD	EDTA	MPP	M/PA	grupo	Especie																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

ID: identifica os isolados multi-droga resistentes. Antibióticos: Cores das células identificam a classe do antibiótico e os isolados resistentes GEN: gentamicina, AMK: amicacina, TET: tetraciclina, CIP: ciprofloxacino, CLO: cloranfenicol, AMX/AC: amoxicilina/ac. Clavulanico, ERT: ertapenem, CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, FEP: cefepime, AZT: aztreonam, FOX: cefoxitina, MER: meropenem, SXT:sulfa/trimetopim, TIG:tigeciclina, PIP/TZ: piperacilina/tazobactam, CTX: cefotaxima, DOR: doripenem, AMP/SL:ampicilina/sulbactam, NOR: norfloxacino, AMP: ampicilina. AB: ácido borônico, AC: ácido clavulânico, CEP: cefepime, CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, POL: polimixina B, DC: disco combinado, DDD: dupla difusão de disco, bla:β-lactamaseo. ND::não determinado, HG: halo grande, A: antagonismo (*):OmpK 36 com tamanho aumentado ao comparar com *E.coli*. ATCC e K-12..

4.5 Efeito da presença de BLA no perfil fenotípico de porinas de membrana externa

Todas as cepas na etapa basal foram estudadas para obter o perfil de OMPs. Um 67% das cepas resistentes ao imipenem e 38% das cepas sensíveis ao imipenem tiveram ausência de uma das duas porinas de interesse. Quando analisado fenotípico de porinas segundo a presença de β -lactamases, a frequência de cepas que apresentaram perda de porinas foi diferente entre as cepas produtoras e não produtoras de AmpC ($p=0,007$). Enquanto as cepas produtoras de AmpC apresentaram uma alta porcentagem de ausência (67%) de uma das duas porinas, a frequência de perda nas cepas negativas para AmpC foi apenas de um 33% (Figura 3A). Essa frequência invertida do perfil de OMPs sugere que a presença de AmpC se relaciona com a impermeabilidade, tendo as cepas portadoras de AmpC uma chance de perda de porinas 7 vezes maior que aquelas que não apresentam essa enzima (OR:7.0; IC:1,59-30,81).

Quando comparada a presença de ESBL, não foi observada diferença significativa no perfil de OMPs das cepas produtoras ou não produtoras de ESBL (Fig 3.B), o qual sugere que a presença de ESBL não afeta a permeabilidade mediada pelas porinas (OR:1,25; IC: 0,34-4,64; $p>0,05$).

Ao analisar a presença conjunta de ambas as enzimas numa cepa foi observado que o risco de perda de porinas é 30 vezes aumentado (OR:30.0; IC: 1.47-677.83 $p=0,043$), quando comparado com cepas que não carregam enzimas do tipo BLA (Fig. 3.C).

Figura 3. Presença de BLA v/s perfil fenotípico de porinas de membrana externa. As frequências de enzimas AmpC e ESBL são apresentadas como percentagens e foram comparadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

4.6 Caracterização fenotípica dos isolados após indução com antibiótico imipenem

Após a indução com imipenem, o perfil fenotípico de resistência para os carbapenêmicos mudou para 77% dos isolados induzidos. O grupo com fenótipo multi-

sensível e sem enzimas BLA teve aumento no CIM₉₀ de imipenem de 3 diluições (1 ug/ml), já para ertapenem e meropenem não houve variação significativa (Tabela.6). As cepas S16-2, S16-1 e S-23 tiveram um aumento na CIM para imipenem, meropenem e ertapenem respectivamente, porém nenhum dos isolados mudou o perfil sensível para os carbapenêmicos. Ao utilizar o inibidor de bombas de efluxo CCCP, observou-se a diminuição da CIM frente ao inibidor no ponto final do tratamento em dois isolados. Já o perfil de OMPs se manteve durante todo o tratamento, apenas um aumento na expressão fenotípica de uma das porinas foi observada na cepa S-23. Quanto ao perfil fenotípico para outros antibióticos, este grupo teve um aumento da CIM >2 diluições para cloranfenicol e polimixina B. Para a tigeciclina não houve mudanças, com exceção da cepa S-21 que mostrou um aumento da CIM para 0,5 ug/ml e quando utilizado o inibidor CCCP houve uma diminuição significativa da CIM. Estes resultados sugerem indução de impermeabilidade de membrana produzida pelo antibiótico imipenem.

O grupo produtor de ESBL teve uma mudança importante no perfil de resistência para carbapenêmicos com CIM₉₀ de 2, 8 e 32 ug/ml para imipenem, meropenem ,ertapenem. A variação mais significativa foi para meropenem e ertapenem com aumento de 6 e 7 diluições. Ao observar por isolados, praticamente todos os isolados tiveram um aumento significativo da CIM de algum carbapenêmico. Dos 7 isolados 4 chegaram a valores resistentes da CIM (Tabela.6). Quanto à contribuição das bombas de efluxo na resistência aos carbapenêmicos, os isolados E-23 e E-7 apresentaram diminuição da CIM frente ao inibidor CCCP, mas apenas no final do tratamento. O perfil de OMPs se manteve na maioria dos isolados do grupo ESBL. A *K. pneumoniae* E-1 foi o único isolado do grupo que perdeu a porina desde a passagem 3 , também foi observado um aumento na expressão fenotípica da porina que se manteve. O isolado E-24 teve ausência da porina desde antes de começar o tratamento.

Já o perfil de resistência a outros antibióticos neste grupo não teve mudanças significativa no final da indução, exceto para a polimixina que teve um aumento da CIM₉₀ de 3 diluições. O isolado E-7 também teve um aumento da CIM de tigeciclina, a qual se mostrou afetada pelo inibidor de bombas no final do tratamento.

O grupo produtor de AmpC, assim como o grupo ESBL, teve mudanças importantes no perfil de resistência aos carbapenêmicos (Tabela.6). Dos 9 isolados, 6 tiveram mudanças significativas da CIM chegando a níveis considerado resistente para os carbapenêmicos. Frente ao inibidor de bombas de efluxo, A-26 e A-38 tiveram uma diminuição da CIM dos carbapenêmicos no início e no final do tratamento, respectivamente.

O perfil fenotípico de OMPs não teve grandes mudanças durante o tratamento, apenas o isolado 686-1 teve perda de porina, porém 5 dos 9 isolados mostraram ausência de porinas antes de começar a indução com o imipenem. Finalmente, para os outros antibióticos não houve grandes mudanças nas CIM₉₀. Foi observada uma queda da CIM no final do tratamento quando utilizado o inibidor de efluxo CCCP no isolado A-26, demonstrando assim a participação da bomba de efluxo no estabelecimento da resistência para esta cepa (Tabela.6).

Foi realizada uma hidrolise para todos os isolados que tiveram variação na CIM de carbapenêmicos, do período basal e final do tratamento. Todos os isolados tiveram um grau de hidrolise do antibiótico imipenem, porém foi considerado uma hidrolise significativa os valores observados nos controles positivos de carbapenemase que foi de 8 umoles de imipenem por hora obtida pela NDM. As amostras que tiveram maior hidrolise foram E-12, E-1 e E-24, interessante todas as cepas tiveram uma diminuição da hidrolise após o tratamento, com exceção dos isolados S-23, S-7 e E-7 (Tabela.6).

Tabela 6. Característica fenotípica dos isolados apor indução com imipenem

ID	Bacteria	CIM agar diluição																											POL FINAL	HID. BASAL	HID. FINAL	porina						
		passagem S ≤1 R ≥4						IMP/CCCP F	MER	passagem S ≤1 R ≥4						MER/CCCP	ERT	passagem S ≤0,5 R ≥2						ERT/CCCP	CLO	CLO FINAL	CLO/CCCP	TIG					TIG FINAL	TIG/CCCP F	POL			
		IMP	1	2	3	4	5			6	1	2	3	4	5			6	1	2	3	4	5													6		
S16-1	<i>E. coli</i>	0,125	0,25	0,25	ND	0,5	0,25	(-)	0,5	0,015	0,03	0,03	ND	0,06	0,06	(-)	0,03	0,03	0,03	0,03	ND	0,03	0,03	(-)	0,015	8	4	4	0,125	0,125	0,125	0,06	0,06	2	1,45	mantem		
S16-2	<i>E. coli</i>	0,06	0,25	0,25	0,5	1	1	(-)	1	0,015	0,015	0,03	0,03	ND	0,03	(-)	2	0,06	0,03	0,03	0,03	ND	0,015	(-)	16	2	>32	>32	0,125	0,25	0,25	0,03	0,125	3,13	3,24	mantem		
S-23	<i>K. pneumoniae</i>	0,125	0,25	0,125	ND	0,25	0,25	(-)	0,25	0,03	0,015	0,06	ND	0,03	0,03	(-)	0,03	0,03	0,03	0,125	ND	0,125	0,125	(-)	0,015	4	4	2	0,03	0,06	0,03	ND	0,25	1,93	2,64	mantem**		
S-13	<i>K. pneumoniae</i>	0,125	0,125	0,25	ND	0,5	0,25	(-)	0,5	0,03	0,03	ND	ND	0,03	0,06	(-)	0,125	0,03	0,03	0,03	ND	0,03	0,06	(-)	0,25	8	4	4	0,5	0,5	0,5	0,06	0,125	(-)	(-)	mantem		
S-21	<i>E. cloacae</i>	0,125	0,5	0,25	ND	0,25	0,25	(-)	0,25	0,03	0,03	0,03	ND	0,03	0,03	(-)	0,015	0,03	0,03	0,03	ND	0,03	0,03	(-)	0,015	4	4	2	0,125	4-0,5	0,03	0,03	0,125	(-)	(-)	mantem		
S-7	<i>E. cloacae</i>	0,06	0,25	0,5	1	1	2	(-)	0,25	0,015	0,03	0,03	0,06	ND	0,03	(-)	1	0,03	0,03	0,03	0,03	ND	0,015	(-)	8	8	>32	>32	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25_8_>32	1,55	1,97	mantem		
E-12	<i>K. pneumoniae</i>	0,125	0,25	0,5	ND	0,5	0,5	(-)	0,5	0,125	0,03	0,03	ND	0,06	0,125	(-)	0,06	0,125	0,25	0,25		0,25	0,5	(-)	0,5	>128	>32	>32	0,5	0,5	0,5	0,06	0,25	6,11	4,96	mantem		
E-3	<i>K. pneumoniae</i>	0,25	0,25	0,25	0,5	1	2	(-)	0,5	0,06	0,5	0,03	0,03	ND	1	(-)	2	0,25	4	0,25	0,125	ND	2	(-)	16	>128	>32	>32	1	0,5	0,5	0,125	0,125	4,05	2,37	mantem		
E-1	<i>K. pneumoniae</i>	0,125	0,25	0,5	1	2	8	4	2	0,06	0,25	1	2	ND	4	8	4	0,25	16	16	4	ND	32	32	>128	>32	>32	0,25	0,5	0,25	0,06	0,125	5,78	2,65	perda*			
E-4	<i>E. coli</i>	0,25	0,25	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,03	0,03	0,03	0,03	ND	0,06	0,06	0,125	0,06	0,06	0,125	0,06	ND	0,25	0,125	0,125	>128	>32	>32	0,5	0,25	0,25	0,03	0,125	0,68	1,29	mantem		
E-24	<i>K. pneumoniae</i>	0,5	0,5	0,25	1	0,5	1	2	4	0,375	0,25	4	4	ND	8	8	4	0,06	0,06	32	32	ND	64	128	>32	32	32	>32	0,5	0,5	0,25	0,06	4	5,6	3,13	mantem		
E-7	<i>E. coli</i>	0,5	1	0,25	0,25	0,25	0,125	1	1	0,03	0,06	0,06	0,03	ND	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125	0,06	0,125	ND	0,125	0,5	0,015	>128	>32	>32	0,125	2_1	0,125	0,06	0,125	1,78	1,78	mantem**		
E-23	<i>S. marcescens</i>	1	0,25	0,5	0,25	1	0,5	2	0,5	0,125	0,03	0,06	0,03	0,125	0,06	0,5	0,03	0,06	0,06	0,125	0,06	0,125	0,06	0,125	0,25	1	0,125	>128	>32	>32	1	1	1	>32	>32	2,23	3,89	mantem
A-7	<i>E. cloacae</i>	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	2	2	0,25	0,5	1	0,5	ND	8	4	4	0,5	2	4	8	ND	>32	64	>32	8	32	32	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	4,62	2,61	mantem*		
A-4	<i>E. aerogenes</i>	0,5	0,5	1	2	2	4	16	8	0,25	0,25	2	2	ND	16	8	4	0,03	0,06	16	16	ND	64	64	32	16	8	4	2	2	0,25	0,03	0,06	3,35	0,87	mantem*		
A-42	<i>E. coli</i>	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,125	0,5	1	0,125	0,125	0,25	0,125	ND	0,125	0,125	0,125	0,5	0,5	2	1	ND	1	0,5	0,5	8	4	2	0,5	0,5	0,5	0,03-8	>32	(-)	(-)	mantem*		
A-16	<i>S. marcescens</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	(-)	(-)	4	0,06	0,06	0,03	0,03	0,06	(-)	(-)	0,5	0,125	0,125	0,125	0,03	0,125	(-)	(-)	4	128	16	8	2	1	1	>32	>32	(-)	(-)	mantem*		
A-17	<i>S. marcescens</i>	1	1	2	0,5	1	1	4	8	0,03	0,125	0,5	0,06	0,125	0,5	0,5	0,125	0,25	0,5	1	0,06	0,125	16	4	2	128	32	32	1	8_4	0,5	0,25-2	>32	1,51	0,54	mantem		
A25-1	<i>S. marcescens</i>	0,5	0,25	0,25	0,25	(-)	(-)	(-)	1	0,25	0,03	0,03	0,03	(-)	(-)	(-)	4	0,125	0,06	0,06	0,06	(-)	(-)	(-)	1	>128	>32	>32	8	4	4	8_32	>32	(-)	(-)	mantem		
A-26	<i>S. marcescens</i>	0,5	1	1	1	ND	2	4	1	0,03	0,06	0,06	0,03	0,125	0,125	0,125	1	0,25	0,25	0,5	0,06	0,25	1	0,25	0,25	64	>32	4	2	2	1	>32	>32	18	0,78	mantem		
A-38	<i>S. marcescens</i>	1	0,5	1	2	2	2	2	1	0,06	0,06	0,5	0,03	0,5	0,5	1	0,25	0,25	0,5	2	0,06	0,25	0,5	8	1	>128	>32	>32	1	1	1	1	0,5	3,92	3,58	mantem*		
686-1	<i>S. marcescens</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	1	2	1	0,125	0,06	0,03	0,03	0,25	0,06	0,125	0,06	0,125	0,13	0,125	0,03	0,25	0,25	0,25	0,06	>128	>32	>32	1	0,5	1	>32	>32	3,55	3,47	perda		
CIM90 ug/ml																																						
	sensivel	0,125						1	0,03								0,06	0,03							0,06	8	>32	0,25	0,5	0,06		0,25						
	esbl	0,5						2	0,125								8	0,25							32	>128	>32		1	1	0,5		4					
	ampc	1						4	0,25								4	0,5							64	>128	>32		2	4	>32	>32						

ID: identifica os isolados multi-droga resistentes. Antibióticos: Cores das células identificam os isolados que tiveram mudança significativa na CIM, a intensificação da cor demonstra maior aumento da CIM, CLO: cloranfenicol, ERT: ertapenem, IMP: imipenem, MER: meropenem, TIG:tigeciclina, CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, POL: polymixina B., ND::não determinado, HID:hidrolise (*):Aumento na expressão fenotípica da porina.(**) : aumento de tamanho da porina comparado com *E.coli* ATCC e K-12.

4.7 *Fitness* bacteriano: Análise do crescimento bacteriano frente ao tratamento

As cepas selecionadas para indução foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de imipenem durante 24 horas. Após as primeiras 6 horas, na fase exponencial de crescimento, uma alíquota das amostras foi retirada para estudar a capacidade de adaptação ou *fitness* bacteriano, e realizar a extração de RNA total. O crescimento bacteriano se detectou pelo aumento na turbidez do meio LB semeado com um inoculo final de 1×10^7 UFC/ml, medido pela absorbância obtida às 6 horas de tratamento, em um comprimento de onda de 625 nm.

No estudo do crescimento foi observado que as amostras bacterianas conseguiram aumentar a taxa de crescimento mantendo assim um *fitness* positivo até a passagem 3 do tratamento onde a taxa de crescimento teve um aumento significativamente maior que a primeira indução. Já a partir da quarta indução o *fitness* da bactéria se viu afetado pela presença do antibiótico, tendo uma perda significativa ($p < 0,001$) a partir da passagem 5 com imipenem (Fig.4). Desta forma, em algumas amostras não foi possível realizar a extração de RNA devido ao baixo crescimento após 6 horas da 5ª ou 6ª indução.

A diminuição significativa do *fitness* leva a uma mudança na expressão dos genes bacterianos, incluído o gene endógeno que também pode ser afetado. Desta forma, foram excluídas da análise de expressão gênica as passagens 5 e 6 do tratamento, com a finalidade de evitar variações causadas por este fenômeno e para obter um análise mais homogênea das amostras.

Figura 4. Influencia do tratamento com imipenem no fitness bacteriano. Dados são apresentados como média e erro padrão, e comparados pelo teste one way ANOVA para medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey. Absorbância foi medida a 625nm após 6 h de tratamento com imipenem. (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem; P5, quinta passagem; P6, sexta passagem.

4.8 Validação dos ensaios de qPCR

4.8.1 Análise de eficiência dos ensaios

Foi verificada a eficiência da reação para os ensaios utilizados na quantificação relativa de RNAm neste estudo, sendo consideradas as eficiências entre 90 e 110% como adequadas para a execução dos experimentos. Essas eficiências foram calculadas mediante realização de curvas padrão utilizando diluições seriadas do cDNA, onde a inclinação da curva (*slope*) determina a eficiência da reação – um *slope* de -3,32 indica 100% de eficiência (Tabela.7).

Tabela 7. Eficiência dos ensaios de qPCR

Gene	<i>slope</i>	R ²	Eficiência (%)
AcrA(1)	-3,135	0,992	108,4
AcrA(2)	-3,372	0,940	97,9
AcrA(3)	-3,536	0,993	91,8
AcrA(4)	-3,308	0,984	100,6
OmpF(1)	-3,174	0,994	106,6
Omp35(2,4)	-3,174	0,997	106,5
Omp35 (3)	-3,268	0,979	102,3
OmpF (5)	-3,1	0,998	110
OmpC (1)	-3,114	0,993	109,5
Omp36(2)	-3,473	0,979	94,1
Omp36 (4)	-3,130	0,988	108,7
OmpC(5)	-3,1	0,998	110
AmpC(2)	-3,220	0,961	104,3
AmpC(3)	-3,351	0,996	98,8
AmpC(5)	-3,477	0,984	93,9
MarA (1)	-3,105	0,990	109,9
MarA(2)	-3,097	0,992	110
MarA (3,4)	-3,512	0,989	92,6
SdeR(5)	-3,112	0,989	109,5
OmpR (1,3)	-3,12	0,996	109,2
OmpR (2,4)	-3,163	0,989	107,1

NOTA: Slope: inclinação da curva de eficiência; R²: coeficiente de regressão lineal da curva de eficiência. Um slope igual a -3,32 indica um 100% de eficiência e um R2 igual a 1 indica uma ajuste perfeito dos diferentes pontos na curva de eficiência. (1): *E. coli*; (2): *E. aerogenes*; (3): *E. cloacae*; (4): *K. pneumoniae*; (5) *S. marcescens*.

4.9 Efeito da indução do imipenem na expressão gênica dos determinantes do fenótipo MDR

4.9.1 Proteína de Fusão da bomba de efluxo AcrA:

O gene que codifica para a proteína AcrA mostrou um aumento frente à indução com imipenem quando comparado com a fase basal. Esse aumento é observado de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a partir da segunda passagem do antibiótico, o qual sugere um aumento na expressão e na atividade da bomba de efluxo AcrAB-TolC (Fig. 5)

FIGURA 5. Efeito do tratamento com imipenem na expressão do AcrA. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste *one way* ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena e calibrados com a média de expressão do grupo sem tratamento (basal). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Ao estudar os níveis de expressão gênica segundo a classificação do perfil de resistência, não foi observada nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão de dos grupos multi-sensível, ESBL e AmpC, também nenhum dos três grupos ao ser separados tiveram um aumento significativo durante o tratamento, diferente do encontrado na análise

geral das amostras, o que sugere que o comportamento geral não está influenciado por apenas um dos grupos estudados.

Quando comparados os níveis de expressão de *AcrA* obtidos no início e final do tratamento do grupo induzido com os valores de expressão do grupo com fenótipo MDR estabelecido, o grupo induzido teve uma tendência a valores maiores de expressão gênica, porém não houve diferença significativa (**Figura 6**).

FIGURA 6. Perfil de expressão do *AcrA* nos grupos resistente e sensível (induzidos) antes e após exposição ao imipenem. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste de t (resistente vs basal e resistente vs P4). A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta Ct}$). P4, quarta passagem.

4.9.2 Porinas de membrana externa (OMPs)

Omp35-like

O gene da Omp de 35KDa (*Omp35*) apresentou um nível de expressão gênica basal baixo, o qual se manteve durante os tratamentos com imipenem. A indução pelo imipenem não afetou a expressão do *Omp35* em enterobactérias não *Serratia* spp. (**Figura 7A**).

Apesar de que a variação da expressão em resposta ao tratamento com imipenem não mostrou diferenças estatisticamente significativas quando estudado o grupo total, alguns isolados tiveram um claro aumento na expressão de porina durante o tratamento. Por exemplo, E-12 foi o isolado com maior aumento de expressão, mostrando um aumento de mais de 7 vezes sua expressão comparado com a fase basal de tratamento.

A porina homóloga à Omp de 35KDa em *Serratia marcescens* é uma porina de 41 KDa denominada OmpF (Malouin *et al.*, 1990), a qual mostrou um perfil de expressão gênica diferente às porinas do tipo Omp35 de *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* e *E. coli*. A expressão de RNAm dessa porina teve uma leve tendência a diminuir durante a indução com imipenem, porém não foi estatisticamente significativa (**Figura 7C**). Outra característica encontrada nesta espécie foi a alta variabilidade na expressão da porina, o qual pode ter diminuído a força dos testes estatísticos para encontrar qualquer associação com sua regulação em resposta ao tratamento. Por outro lado, a análise fenotípica das cepas 686-1, A-38 e E-23 mostrou uma ausência da porina de maior tamanho, porém estes isolados apresentaram uma expressão de OmpF relativamente alta, já A-16 teve uma boa correlação do fenótipo com a expressão gênica.

FIGURA 7. Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de genes de porinas.(A) Efeito na expressão de *Omp35* em enterobactérias não *S. marcescens*,(B) Efeito na expressão de *Omp36* em enterobactérias não *S. marcescens*,(C) Efeito na expressão de *OmpF* em *S. marcescens*, (D) Efeito na expressão de *OmpC* em *S. marcescens*. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste *one way* ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena e calibrados com a média de expressão do grupo sem tratamento (basal). . (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Os níveis de expressão de *Omp35* nos grupos ESBL e AmpC mostraram diferença significativa, quando comparados com as cepas que não apresentaram estas enzimas ($p < 0,05$). O grupo com presença de ESBL teve uma expressão menor do gene ao longo do tratamento, comparado ao grupo que não carregava nenhuma destas enzimas (**Figura 8A**). Diferentemente, quando avaliada a expressão de *Omp35* de acordo com a presença de enzimas AmpC, o grupo que carrega este tipo de enzima apresenta uma maior expressão gênica (**Figura 8B**). Entretanto, quando avaliada a variação da expressão de *Omp35* em resposta ao imipenem a presença destas enzimas não modificou o perfil de expressão gênica após as diferentes etapas de indução pelo imipenem.

Figura 8. Efeito do tratamento com imipenem na expressão do *Omp35* de acordo com presença de enzimas β -lactamases. (A) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de ESBL (B) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de AmpC. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta Ct}$). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Os valores de expressão de *Omp35* do grupo resistente foram similares quando comparados com o grupo sensível na fase basal e, apesar de ter mostrado uma tendência a valores menores, também não houve diferenças quando comparado com o grupo induzido após tratamento com imipenem (**Figura 9A**). Outra característica observada no grupo resistente foi que os valores de *Omp35* foram mais homogêneos que os observado no grupo tratado.

Na **figura 9B** pode-se apreciar que a expressão de *OmpF* em *S. marcescens* parece ser maior que a expressão deste gene no grupo MDR, porém devido à alta variabilidade dos valores neste último grupo essa diferença não chegou a ser significativa. Também não foram encontradas diferenças quando comparado o grupo resistente e o grupo induzido após tratamento (**Figura 9B**).

Figura 9. Perfil de expressão de (A) *Omp35* e (B) *OmpF* nos grupos resistente e sensível (induzido) antes e após exposição ao imipenem. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil e comparados pelo teste de t (resistente vs basal e resistente vs P4). A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). P4, quarta passagem.

Omp36-like

A porina mais relacionada com resistência a carbapenêmicos é a porina de membrana externa de 36KDa. O anterior foi confirmado pelos nossos resultados após indução pelo imipenem, onde a porina teve uma diminuição significativa dos níveis de expressão gênica já na primeira passagem com o antibiótico (**Figura7B**), demonstrando que a presença do antibiótico no ambiente da bactéria leva a uma resposta imediata de defesa nesta, chegando a uma diminuição de quase 100% em alguns isolados. As amostras A-7, A-42 e E-7 tiveram amplificações não quantificáveis na reação de qPCR após exposição ao antibiótico, evidenciando a falta de expressão encontrada no perfil fenotípico. Diferente foi o acontecido com os isolados E-24 e A-4 os quais apresentaram expressão gênica da *Omp36-like*, porém na análise fenotípica foi observada apenas uma das porinas.

A porina homologa à Omp36-like em *S. marcescens* é uma porina de 40 KDa, denominada OmpC (Hutsul e Worobec, 1994). A expressão gênica de *OmpC* nesta espécie não foi afetada pelo tratamento com imipenem (**Figura 7D**), se bem tiveram algumas flutuações na expressão durante o tratamento, finalizaram com uma expressão similar à média de expressão basal.

Os níveis de expressão de *Omp36* foram diferentes segundo os grupos com diferente perfil de resistência. O grupo ESBL teve uma expressão menor de *Omp36* que aquelas cepas que não carregam este tipo de enzimas (**Figura 11A**). O grupo AmpC, pela sua vez, teve uma diferença na sua expressão a partir da passagem 2, isto devido ao comportamento das produtoras de AmpC que aumentam a expressão de *OmpC* frente à indução pelo imipenem (**Figura 10B**). Finalmente o grupo de cepas produtoras de BLA mostrou níveis de expressão aumentados frente às cepas livres de BLA (**Figura 10C**).

Figura 10. Efeito do tratamento com imipenem na expressão do *Omp36* de acordo com presença de enzimas β -lactamases. (A) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de ESBL, (B) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de AmpC, (C) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de BLA. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta Ct}$). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Os valores de *Omp36* foram semelhantes entre o grupo estudo e o grupo MDR na fase basal de tratamento (**Figura 11A**). Já no final do tratamento os níveis de *Omp36* diminuíram, chegando a ter uma diferença significativa de expressão com o grupo resistente (Figura 11A). Por outro lado, a expressão de *OmpC* em *S. marcescens* mostrou níveis similares entre os grupos, independentemente da exposição ao imipenem no grupo sensível (**Figura 11B**).

Figura 11. Perfil de expressão de (A) *Omp36* e (B) *OmpC* nos grupos resistente e sensível (induzido) antes e após exposição ao imipenem. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste de t (resistente vs basal e resistente vs P4). A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). P4, quarta passagem.

4.9.3 *AmpC* cromossômica

Foi estudada a expressão de *AmpC* em *S. marcescens* e *Enterobacter sp.*, frente à indução pelo imipenem, para observar a colaboração de esta enzima na resistência a este tipo de antibióticos. Inicialmente, foi observada uma variabilidade muito alta na expressão de *AmpC* de acordo com o gênero (dados não mostrados). O nível de expressão de *AmpC* em *Enterobacter sp.* foi muito alto comparado com *S. marcescens*, chegando a ser maior do que 100 vezes mais expresso. Durante a indução com imipenem, a expressão do *AmpC* em *Enterobacter sp.* não foi afetada pela presença do antibiótico (Figura 12A) e também foi

observada uma alta variabilidade dos dados, entretanto cabe destacar a baixo número de cepas incluídas nesta análise. Já a expressão de *AmpC* em *S. marcescens* mostrou um aumento significativo e gradual frente ao tratamento com imipenem nas diferentes passagens (**Figura 12B**).

Figura 12. Efeito do tratamento com imipenem na expressão do *AmpC*.(A) Expressão gênica em *Enterobacter sp.*, (B) Expressão gênica em *S. marcescens*. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste *one way* ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena e calibrados com a média de expressão do grupo sem tratamento (basal). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Quando analisada a expressão gênica nos grupos resistente e sensível, foi observado que a expressão de *AmpC* nas cepas produtoras de *AmpC* do grupo resistente foi significativamente maior que aquela observada nas cepas do grupo sensível na fase basal do tratamento, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa quando a expressão de *AmpC* das cepas resistentes foi comparada com o grupo sensível após exposição, devido ao aumento que *AmpC* experimentou após o tratamento com imipenem (**Figura 13**).

Figura 13. Perfil de expressão do *AmpC* nos grupos resistente e sensível antes e após exposição ao imipenem. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste de t (resistente vs basal e resistente vs P4). A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). P4, quarta passagem.

4.10 Efeito da indução do imipenem na expressão gênica dos reguladores de MDR .

4.10.1 Regulador global *MarA*

A expressão de RNAm do principal gene regulador do fenótipo MDR, *MarA*, foi induzido pela presença do imipenem (**Figura 14A**). A expressão gênica teve um aumento significativo a partir da segunda passagens com o antibiótico o que sugere a ativação de diversos mecanismos regulados pelo *MarA* que vão levar ao estabelecimento do fenótipo MDR.

O regulador *SdeR* tem uma similaridade de 40% com o gene *MarA*, e apenas é descrito em *S. marcescens* onde, pelo contrario, não tem sido descrito *MarA* (Maseda *et al.*, 2011) . O gene regulador *SdeR* teve um aumento gradual frente à indução pelo imipenem, porém foi encontrado estatisticamente significativo apenas a partir da terceira passagem, resultado que pode ter sido afetado pela alta variabilidade da expressão do gene na *S. marcescens*. (**Figura 14B**).

Figura 14. Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de genes reguladores do fenótipo MDR. (A) Efeito na expressão de *MarA*, (B) Efeito na expressão de *SdeR*. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste *one way* ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena e calibrados com a média de expressão do grupo sem tratamento (basal). . (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Quando avaliada a expressão de *MarA* de acordo com a caracterização de resistência, o grupo não-produtor de AmpC mostrou valores maiores de expressão do seu *MarA* Homólogo (**Figura 15A**) e, após exposição ao imipenem, esse grupo mostrou também uma maior indução de *MarA* em resposta ao tratamento (**Figura 15B**). Foi também observada diferença entre os grupos ao estudar os níveis de expressão do grupo sensível livre de BLA, o qual apresentou níveis maiores de expressão nas últimas passagens do tratamento comparado com portadores de BLA nessas etapas e também mostrou valores maiores de expressão de *MarA* comparado com a fase basal de tratamento (**Figura 15C e 15D**).

Figura 15. Efeito do tratamento com imipenem na expressão do *MarA* de acordo com presença de enzimas β -lactamases. (A,B) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de AmpC(C,D) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de BLA. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

A expressão de *MarA* no início do tratamento foi significativamente baixa, ao ser comparada com o grupo resistente, já no final do tratamento os valores de *MarA* tiveram a tendência a se igualar com os valores de expressão do grupo resistente (**Figura 16A**). O regulador *SdeR* de *S. marcescens* das cepas sensíveis foi menos expresso que *MarA* do grupo resistente, antes e depois do tratamento apesar dos valores de *SdeR* terem aumentado após exposição ao imipenem (**Figura 16B**).

Figura 16. Perfil de expressão de genes reguladores do fenótipo MDR nos grupos resistente e sensível antes e após exposição ao imipenem. (A) Expressão gênica de MarA, **(B)**, Expressão gênica de *SdeR*. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste de t (resistente vs basal e resistente vs P4). A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). P4, quarta passagem.

4.10.2 Repressão de porinas OMPR

O regulador específico de porinas OmpR teve um aumento gradual da sua expressão desde o início do tratamento, levando a um aumento final da expressão estatisticamente significativo ($p < 0,05$), demonstrando que este regulador é afetado pela presença do imipenem colaborando no estabelecimento da impermeabilidade (**Figura 17**). Entretanto, foi observado também que este aumento não é homogêneo no conjunto de cepas estudadas, como por exemplo, para as amostras A-4 e S-23 que tiveram uma pequena diminuição na expressão deste gene.

Figura 17. Efeito do tratamento com imipenem na expressão de RNAm de *OmpR*. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste *one way* ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena e calibrados com a média de expressão do grupo sem tratamento (basal). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

Os níveis de expressão de *OmpR* foi diferentemente expresso nos grupos de acordo com o perfil de resistência das cepas estudadas. O aumento da expressão de *OmpR* durante o tratamento nos produtores de ESBL foi muito maior que aquele observado nas cepas não portadoras deste gene nas diferentes passagens (**Figura 18A**) e, além disso foi observado que o aumento foi estatisticamente significativo na passagem 4 apenas do grupo produtor de ESBL (**Figura 18B**).

Quando analisada a expressão de *OmpR* de acordo com a presença de AmpC foi observado que cepas portadoras destas enzimas mostravam uma expressão gênica muito baixa deste regulador, o qual demonstra que a variabilidade no perfil de expressão gênica do *OmpR* e principalmente dado em cepas que não apresentam AmpC (**Figura 18C e 18D**). Desta forma, o comportamento observado no grupo de não produtores de AmpC pode ser devido à presença de enzimas ESBL. Um comportamento similar é observado no grupo multi-sensível, onde as cepas sensíveis mostram expressão reduzida e portadoras de BLA tem sua expressão aumentada em resposta ao imipenem (**Figura 18E e 18F**).

Figura 18. Efeito do tratamento com imipenem na expressão do *OmpR* de acordo com presença de enzimas β -lactamases. (A,B), Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de ESBL, (C,D) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de AmpC (E,F) Efeito na expressão gênica de acordo com a presença de BLA. Dados são apresentados como média e SEM e comparados pelo teste two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta Ct}$). (*), $p < 0,05$; P1, primeira passagem; P2, segunda passagem; P3, terceira passagem; P4, quarta passagem.

A expressão de *OmpR* teve valores similares entre o grupo resistente e os valores iniciais prévio ao tratamento, já ao comparar com o última passagem do grupo submetido ao tratamento com imipenem, foi observado uma maior expressão de *OmpR* no grupo sensível (Figura 19).

Figura 19. Perfil de expressão de *OmpR* nos grupos resistente e sensível antes e após exposição ao imipenem. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste de t (resistente vs basal e resistente vs P4). A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). P4, quarta passagem.

4.11 Contribuição dos determinantes de resistência no perfil de CIM aos carbapênemicos

Neste estudo foi também analisado como a variação da expressão de determinantes de resistência como porinas e enzimas do tipo AmpC cromossômica podem influenciar a variação da CIM em resposta ao tratamento com imipenem. Com essa finalidade, as variações da CIM dos carbapenêmicos foram classificadas de acordo com o nível de aumento na s diluições após exposição ao antibiótico para gerar duas variáveis: 1) a manutenção do valor da

CIM ou aumento de uma diluição após exposição até a quarta passagem; e 2) o aumento da CIM de 2, 3,4 ou mais diluições após exposição.

Omp35

A variação da expressão gênica de *Omp35* após exposição ao imipenem (percentagem de variação basal vs quarta passagem) não foi relacionado com a variação da CIM para IMP e MER, entretanto houve diferença significativa da variação de *Omp35* quando relacionada com a variação da CIM para ERT. Apesar de não mostrar diferenças significativas para os antibióticos IMP e MER as amostras que mantiveram o valor da CIM mostraram um aumento da expressão de *Omp35*, já as cepas com aumento da sua CIM diminuíram a expressão deste gene. Quando observamos o comportamento da CIM para ertapenem, a relação foi invertida e com uma diferença que foi significativa quando comparadas as cepas que mantiveram e aumentaram a CIM(**Figura 20A**). O comportamento observado sugere que a regulação da expressão da porina *Omp35* pelo imipenem pode ter participação no o estabelecimento de resistência apenas para ertapenem.

Devido a que a cepa E-12 apresentou um comportamento atípico com relação ao grupo de cepas analisadas com um aumento de expressão maior a 2000 vezes na expressão de *Omp35*, esta foi eliminado da análise para evitar uma falsa tendência no comportamento geral do gene no grupo estudado.

OmpF de *S. marcescens* teve um comportamento similar para todos os carbapenêmicos independente da variação da CIM (**Figura 20B**). Uma característica importante é que, diferentemente de seu homologo *Omp35*, *OmpF* mostrou uma redução da expressão gênica após exposição ao imipenem independentemente de manter ou aumentar os

valores da CIM. Por outro lado, a alta variabilidade na expressão gênica da porina entre as amostras estudadas dificulta observar significância entre as variáveis analisadas. Apesar de que os dados observados são sugestivos de que esta porina é afetada pela indução com imipenem, não foi possível identificar uma contribuição específica no estabelecimento de resistência para os carbapenêmicos.

Cabe destacar que, devido a que a cepa A-16 apresentou valores atípicos representados por um aumento de expressão observado maior a 10000 vezes, este isolado foi eliminado da análise para evitar uma falsa tendência no comportamento geral das *S. marcescens*.

Omp36

A expressão de *Omp36* foi diminuindo durante o tratamento e esta redução não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que mantém e os que aumentam os valores de CIM para os três antibióticos estudados. Apesar de não mostrar diferenças significativas, pode-se observar que as cepas que aumentaram a CIM para IMP e ERT tiveram uma redução mais acentuada da expressão de *Omp36*. Essa tendência não significativa poderia ser afetada pela alta variabilidade dos dados observados (**Figura 20C**). A expressão deste gene se vê afetada pela indução de imipenem, e os dados aqui apresentados sugerem uma contribuição específica no estabelecimento de resistência para os carbapenêmicos IMP e ERT.

A variação da expressão de *OmpC* em *S. marcescens* teve um comportamento diferente entre os carbapenêmicos estudados, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Enquanto os grupos que mantém e aumentam a CIM para IMP tiveram variação semelhante da expressão desta porina, esses mostraram um comportamento oposto para MER e com um marcado aumento da expressão no grupo que teve aumento da CIM para esses antibióticos.

Figura 20. Variação da expressão gênica de porinas de acordo com a variação da CIM de antibióticos carbapenêmicos. Dados são apresentados como média e SEM da variação de expressão de rRNA e os grupos que mantém e aumentam a CIM foram comparados pelo teste de *t* para cada antibiótico. (*), $p < 0,05$; IMP, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem.

4.11.3 AmpC

A variação da expressão de rRNA de *AmpC* foi muito alta durante o tratamento o que reduz a força dos testes estatísticos e dificulta observar variações significativas, porém foi possível observar um aumento da expressão durante o tratamento (**Figura 21**). Para o antibiótico IMP as amostras com aumento na CIM tiveram um maior aumento na expressão de *AmpC*, o que não foi observado com os outros dois antibióticos que mostraram maior aumento da expressão gênica no grupo que manteve a CIM. Este resultado sugere que a enzima AmpC cromossômica poderia estar contribuindo na resistência para imipenem de forma específica.

Figura 21. Variação da expressão de *AmpC* de acordo com a variação da CIM de antibióticos carbapenêmicos. Dados são apresentados como média e SEM da variação de expressão de RNAm e os grupos que mantem e aumentam a CIM foram comparados pelo teste de *t* para cada antibiótico. IMP, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem.

4.12 Correlação da expressão dos genes reguladores com os genes determinantes de resistência

Após análise do perfil de expressão gênica de genes associados ao fenótipo MDR em resposta ao tratamento com IMP, nós tivemos interesse em estudar se há participação de alguns dos genes reguladores estudados na modulação dos genes envolvidos no estabelecimento da multirresistência com este antibiotico como indutor. Com essa finalidade, a expressão de *MarA* foi classificada em três grupos de acordo com os terciles dos valores de expressão de RNAm: 1) nível baixo de expressão representado pelo primeiro tercil; 2) nível intermediário de expressão representado pelo segundo tercil e 3) nível alto de expressão representado pelo tercil contendo os valores mais elevados de expressão. Foi observado que valores aumentados de expressão gênica do regulador geral *MarA* estão associados a valores

altos de *AcrA* (**Figura 22A**), sugerindo então uma associação entre este gene regulador e o gene determinante de bomba de efluxo *AcrA*. Já com as porinas *Omp35* e *Omp36*, não foi observada uma correlação significativa, porém se observou uma tendência à diminuição na expressão das porinas quando os valores de *MarA* foram aumentados (**Figura 22B e 22C**).

Figura 22. Expressão gênica de (A) *AcrA*, (B) *Omp35* e (C) *Omp36* de acordo com o nível de expressão de *MarA*. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil e comparados pelo teste *one way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta C_t}$). A expressão de *MarA* foi dividida em três grupos de acordo com o tercil de expressão: Baixo, 0,000000629722 - 0,002547732 ; intermediário, 0,003434308 - 0,1847605; alto, 0,1849645 - 15,27575

O regulador específico de OMPs, *OmpR* teve uma forte indução com o antibiótico IMP. Com a finalidade de avaliar a influência da expressão de *OmpR* na expressão de porinas quando induzido por este antibiótico, os valores de RNAm de *OmpR* foram divididos de acordo com o tercil de expressão para serem agrupados nos níveis baixo, intermediário e alto, de forma semelhante à análise anterior. Ao correlacionar a expressão desse gene regulador com a expressão gênica da porina *Omp35* foi encontrada uma associação positiva para este gene, uma vez que os valores aumentados de *OmpR* foram associados a valores aumentados de *Omp35* (**Figura 23A**).

Quando estudado o gene de Omp36 não foi possível encontrar uma correlação significativa, porém se observou uma clara tendência à diminuição na expressão das porinas quando os valores de OmpR foram aumentados .

Figura 23. . Expressão gênica de (A) Omp35 e (B) Omp36 de acordo com o nível de expressão de OmpR. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste *one way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A expressão relativa de RNAm foi calculada pelo método do Ct comparativo usando-se *gapA* como gene de referência endógena sem uso de calibrador ($2^{-\Delta Ct}$). A expressão de *OmpR* foi dividida em três grupos de acordo com o tercil de expressão: Baixo, 9,5807E-06 - 0,606237; intermediário, 0,7260919 - 2,582966; alto, 2,716426 - 11,01085.

5. Discussão

No estudo fenotípico inicial das amostras estudadas, foram detalhadas as características que definiram cada grupo estudo. Como esperado, o fenótipo multi-sensível teve baixa resistência à maioria dos antibióticos estudados, com exceção dos aminoglicosídeos e tetraciclina. A taxa de resistência a estes antibióticos encontrada neste grupo foi muito similar à observada nos demais grupos estudados (25%-33,3%). Esta similaridade observada no perfil de resistência pode estar associada ao menor uso do antibiótico nestes isolados, independentes das características do grupo. Bornet e colaboradores, em um estudo realizado no ano 2003, observaram que isolados que expressam o fenótipo MDR, associado a mecanismos gerais de adaptação da bactéria, não apresenta mudanças na resistência aos aminoglicosídeos ao não observar modificações no perfil para este antibiótico (Bornet *et al.*, 2003). Por outro lado Rhomberg, em um estudo epidemiológico do MYSTIC realizado nos Estados Unidos, observou que a resistência a aminoglicosídeos durante 10 anos teve um aumento leve e constante, o que difere de outros antibióticos mais utilizados na prática médica que aumentaram sua resistência de 5 a 8 vezes no mesmo período (Rhomberg e Jones, 2009).

Os fenótipos ESBL e AmpC apresentaram o perfil característico de cepas produtoras de β -lactamases, com diferenças apenas nos substratos de cada enzima, como cefalosporinas e cefamicinas. Já no perfil de antibióticos não β -lactâmicos observamos diferenças significativas, o grupo ESBL teve taxas de resistência maiores para todos os antibióticos não β -lactâmicos, assemelhando-se mais ao grupo com perfil MDR. Os isolados produtores de ESBL têm uma aquisição externa de resistência muito maior que nosso grupo com perfil de AmpC, uma vez que a presença de ESBL está relacionada principalmente à disseminação plasmidial a qual, por sua vez, carrega diversos determinantes de múltipla resistência o que

permite uma maior taxa de multi droga resistência e uma maior disseminação (Cruz *et al.*, 2013).

Esta capacidade plasmidial é observada na prevalência de ESBL em nossos grupos. CTX- 2, como descrito anteriormente, é uma das ESBL mais disseminadas na America do Sul, com uma prevalência de quase 50% em nosso grupo total estudado. Esta alta prevalência tem se relacionado ao fato desta enzima ser transportada em diversos elementos móveis como plasmídeos conjugativos, elementos de inserção e integrons (Sennati *et al.*, 2012). É interessante notar, além da disseminação, uma característica importante desta ESBL, o alto grau de variabilidade, observado até agora, na sequência gênica do seu DNA. O grupo CTX- 2 têm alta taxa de mutação tendo uma grande quantidade de variantes que mudam a conformação dos aminoácidos e consequentemente o perfil bioquímico e atividade da enzima. Assim, no grupo ESBL foi encontrado uma nova variante de CTX-M-2 denominada CTX-M-141 (GenBank : KC964871), número designado pela instituição Lahey que regula a organização das enzima β -lactamases (<http://www.lahey.org/Studies/>). Esta nova enzima foi encontrada dentro dum integron de classe 1 complexo, associada a genes de resistência a aminoglicosídeos e sulfonamidas, além de outra ESBL Klua-1, considerada a β -lactamase de origem do grupo CTX-M.

A localização das β -lactamases no grupo produtor de AmpC é, na maioria, cromossômico uma vez que os isolados que apresentaram o perfil de AmpC foram enterobactérias do grupo CESP (*Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp* e *Providencia sp*) com exceção da *E. coli* A-42 que teve uma amplificação positiva da PCR para MIR/ACT. Esta característica explica a baixa taxa de resistência para outros antibióticos, já que o principal determinante de resistência não é carregado em elementos moveis que por sua vez carregariam diversos determinantes de resistência. No grupo MDR, também, curiosamente a

presença de AmpC é majoritariamente cromossômica, porém o perfil MDR neste grupo pode estar associado à presença de ESBL e provavelmente a alterações de permeabilidade, uma vez que 15 dos 24 isolado tiveram perda de uma das principais porinas que permitem a entrada de antibióticos.

O grupo MDR teve altas taxas de resistência aos carbapenêmicos. Com a finalidade de pesquisar a contribuição de β -lactamases foi realizado a CIM com inibidores de β -lactamases. A presença de CIM diminuída frente aos inibidores, pode sugerir que as β -lactamases têm uma contribuição na CIM elevada para estes antibióticos. Jacoby e colaboradores, no ano de 2004, conseguiram associar a presença de ESBL não CTX-M com a resistência ao ertapenem, (Jacoby, Mills e Chow, 2004). Estudos posteriores utilizando isolados produtores de ESBL CTX-M sugerem a hidrólise a níveis baixos do antibiótico ertapenem por esta enzima, nos quais a alteração da porina proporcionou uma concentração menor do antibiótico na célula (Girlich, Poirel e Nordmann, 2008; 2009). Pela triagem de β -lactamases não foi possível estabelecer uma boa correlação de AmpC com o PCR. O método descrito por Coudron tem diversas limitações, sendo, o primeiro, que o ácido Borónico não é inibidor específico de AmpC e se em enzimas do tipo serina, o que é a grande maioria das β -lactamases. Finalmente foi observado que apenas 66,7 % dos isolados deste grupo tiveram perda de porina antes do início do tratamento. A presença de porina em 32,3% do grupo restante mostra que a resistência não foi diretamente afetada pela perda da porina, sendo provável que esta ausência de porina não seja o único fator determinante de resistência aos carbapenêmicos e, ainda, que a expressão de algumas enzimas pode contribuir para o perfil de resistência. Agora a funcionalidade da porina pudesse estar diminuída por mutação já seja deleção ou inserção, que levam a uma diminuição na atividade da porina (Doumith *et al.*, 2009).

Ao analisar a prevalência de BLA e de resistência nos isolados que tiveram ausência de porina, observamos que um terço dos isolados com ausência de porina foi sensível ao imipenem o que sugere que a perda de porina não é característico da resistência aos carbapenêmicos. No entanto, os isolados com perfil de resistência ao carbapenêmico sem carbapenemases têm alta prevalência de perda de porina, como previamente descrito. Ao comparar com BLA, as cepas produtoras de AmpC tiveram uma alta porcentagem de ausência de porina em relação as cepas negativas de AmpC, pelo que foi encontrado que AmpC teve uma probabilidade 7 vezes maior de ter perda de porinas, o que se pode observar nos múltiplos casos reportados de impermeabilidade de membrana relacionada à AmpC na resistência ao imipenem (Oteo *et al.*, 2008; Pavez *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2010). Também pudemos observar que a presença conjunta de enzima AmpC e ESBL aumenta ainda mais a probabilidade de ter uma perda de porina, aumentando assim o perfil MDR da cepa.

Após indução com o antibiótico imipenem foi realizado uma análise fenotípica dos isolados para observar as diferenças estabelecidas com a indução. Interessantemente, o perfil fenotípico para carbapenêmicos mudou em uma alta porcentagem dos isolados, principalmente para os grupos produtores de alguma β -lactamase. O grupo multi-sensível teve um aumento significativo da CIM₉₀ de imipenem. Isto foi observado apenas para este carbapenêmico, o que nos sugere que neste tipo de isolados a adaptação ao ambiente hostil é menor e mais específica ao antibiótico utilizado, isto pode ser possível pela menor presença de determinantes de resistência que contribuiriam para um perfil maior de resistência, se comportando por sua vez de maneira muito mais homogênea. Porém, neste grupo, a tendência de MDR foi muito mais presente do que em outros grupos, houve aumento da CIM de cloranfenicol e da tigeciclina em alguns isolados. A bomba AcrAB-TolC, é até agora a principal bomba relacionada à resistência. Ruzin e colaboradores reportaram uma diminuição

na susceptibilidade de tigeciclina numa cepa de *Morganella morganii*, mediada pela atividade de AcrA (Ruzin, Keeney e Bradford, 2005), confirmando então que a indução de imipenem poderia afetar a resistência não apenas de carbapenêmicos mas também de antibióticos de última escolha no tratamento.

Já os grupos ESBL e AmpC tiveram mudanças significativas nos três carbapenêmicos, chegando a valores da CIM considerados resistentes, esta mudança foi a maior diferença com o grupo multi-sensível. Os valores iniciais de resistência para cada carbapenêmico foi gradualmente maior entre multi-sensível > ESBL > AmpC o que claramente influenciou nos valores finais. Curiosamente, o grupo ESBL teve aumento de 4 diluições em vários dos seus isolados principalmente em ertapenem. O estabelecimento de altos níveis de resistência pode estar relacionado à presença de CTX-M, uma vez que Girlich e colaboradores observaram que CTX-M teve contribuição nesse estudo na diminuição da sensibilidade para ertapenem (Girlich, Poirel e Nordmann, 2009). No entanto, as taxas encontradas nessa pesquisa não foram altas como as em nosso estudo. Tsai e colaboradores também encontraram uma relação de ESBL com perda de porina, mas este foi apenas para ertapenem, recomendando assim o uso de outros carbapenêmicos não ertapenem. Nesse estudo se testou apenas a resistência no ponto em que a porina foi perdida, o que difere de nosso estudo que utilizou também meropenem e imipenem onde este antibiótico teve um aumento da CIM quando induzidos com imipenem (Tsai *et al.*, 2013).

Na análise fenotípica de porinas, curiosamente, a perda de porinas foi observada apenas em dois isolados. E-1 perdeu a porina na terceira passagem e foi o que apresentou maior aumento na CIM para ertapenem. Nos observamos, frente a esta baixa taxa de perda de porina, que esta resposta adaptativa, não é produzida como uma resposta imediata de defesa,

sugerindo que a perda da porina é um dos últimos estágios de adaptação da bactéria frente ao ambiente hostil.

No teste de triagem THM não foi observada nenhum tipo de hidrólise, porém quando realizada a cinética do extrato protéico todos os isolados apresentaram níveis baixos de hidrólise para o antibiótico (< 7 umoles de imipenem por hora). Girlich e colaboradores mediram a hidrólise em um extrato protéico observando também pequenas hidrólises não significativas (Girlich, Poirel e Nordmann, 2008). A maioria dos isolados após o tratamento teve uma diminuição na hidrólise do antibiótico. Esta diminuição pode estar relacionada a uma impermeabilidade da membrana uma vez que o aumento dessa impermeabilidade diminui a concentração interna do antibiótico sem aumento na atividade da enzima para este antibiotico.

Os determinantes freqüentemente relacionados à impermeabilidade de membrana na família das enterobactérias são a expressão aumentada de bombas de efluxo como AcrAB TolC e a alteração nas porinas de membrana externa do tipo Omp35 e do tipo Omp36. Ao analisar o comportamento da bomba de efluxo frente à indução com imipenem, observou-se um aumento significativo na expressão da proteína de fusão da bomba AcrA. Esta proteína tem função importante na bomba, além de ser a conexão entre a membrana plasmática e a membrana externa para formar o canal de efluxo, estudos consideram a proteína AcrA na estabilização do complexo AcrAB TolC e também na regulação das mudanças da proteína AcrB a qual regula os canais de abertura e a energia de transdução (Touzé *et al.*, 2004; Mikolosko *et al.*, 2006) Há poucos estudo da indução da bomba pelo antibiótico imipenem, Bornet, no ano 2003, estudou a atividade da bomba de efluxo por meio da expressão da proteína AcrA em *Enterobacter aerogenes*, quando exposto a imipenem (Bornet *et al.*, 2003) . Conseguimos-nos observar comportamento similar na expressão de AcrA para as outra

espécies estudadas, demonstrando que este determinante tem alta probabilidade de sobre expressar-se na indução com antibiótico e criar uma das primeiras alterações na membrana externa. A expressão de bombas de efluxo afetam a susceptibilidade de múltiplos antibióticos, como cloranfenicol, tetraciclina e quinolonas (Nikaido e Pages, 2011). Embora a bomba AcrA até o momento não tenha sido relacionada diretamente a imipenem, observamos alguns indícios do aumento da atividade de bombas de efluxo frente ao indutor imipenem. A presença de inibidor mostrou que existe alguma contribuição de bombas de efluxo para carbapenêmicos, onde algumas amostras conseguiram diminuir a CIM frente ao inibidor. No entanto, isto não foi característico do grupo, apenas 5 isolados diminuíram a CIM frente ao inibidor.

O comportamento de AcrA na indução com imipenem não foi influenciado pelas características próprias de cada grupo estudado. Os níveis de expressão tiveram uma alta variabilidade independente do grupo e esse aumento significativo não foi encontrado entre os grupos. Esta variabilidade de expressão se deve tanto a diversidade de espécies estudadas como também a origem clínica das cepas, já que dependendo do ambientes prévios ao qual foram submetido os isolados, a bactéria se adaptou de formas diversas com expressões diferentes.

Quando comparado os níveis de expressão de isolados induzidos recentemente com isolados com resistência a imipenem estabelecida, encontramos uma expressão maior no grupo induzido, muito provavelmente por um maior fitness ante a pressão seletiva submetida (indução de imipenem). Uma vez que a indução leva a um estabelecimento da resistência, e o grupo resistente deve apenas manter um nível de expressão que simplesmente permita manter o perfil de resistência, isto se deve a capacidade adaptativa da bactéria (Deris *et al.*, 2013).

Ao estudar a expressão de Omp35, observou-se níveis de expressão baixos. Independente da indução com o antibiótico esta porina não teve aumento na sua expressão gênica, mostrando a pouca contribuição que tem na indução de um perfil de resistência a carbapenêmicos. Na literatura, Omp35 não tem sido fortemente relacionada à resistência carbapenêmicos. Bornet em 2004 relacionou a alteração desta porina com a resistência específica a cefalosporinas, mas não para carbapenêmicos. Embora o mesmo grupo em um estudo mais detalhado publicado em 2013, tenha observado que na resposta adaptativa ao imipenem de *Enterobacter aerogenes* ocorre uma regulação no balance de porinas, (Bornet *et al.*, 2004; Lavigne *et al.*, 2013). Em outro estudo realizado por Tran com *Providencia stuartii* foi observado também que a OmpPst1, com maior homologia a OmpF de *E. coli*, tem maior afinidade para ertapenem (Tran *et al.*, 2010).

Porém quando estudamos a relação da expressão das porinas com a variação da CIM dos carbapenêmicos observamos uma tendência da expressão da porina frente ao estabelecimento de resistência aos carbapenêmicos, onde os que tiveram aumento da sua CIM tiveram diminuição na expressão, mas em ertapenem de nossos isolados, foi encontrado o fenômeno inverso com aumento na expressão de os que aumentaram sua CIM. James e colaboradores demonstraram que a via utilizada do ertapenem para o seu ingresso na bactéria foi a porina Omp36 e não a Omp35, o que estaria de acordo com nossos resultados, uma vez que durante o estabelecimento da resistência a bactéria realiza uma regulação do balance de suas porinas relacionado tanto a presença do antibiótico como a diversos fatores, para finalmente chegar a um estabelecimento final observado principalmente em tratamentos longos, que é uma impermeabilidade total com perda das duas porinas (Pagès, James e Winterhalter, 2008).

A *S. marcescens* foi analisada separadamente das Omp35 por ter porinas de maior tamanho consideradas homologas embora não iguais. A porina homóloga de *S. marcescens* é uma porina de 41KDa denominada OmpF. O comportamento desta porina foi um pouco diferente da sua homóloga, com leve tendência a diminuir a expressão durante o tratamento. Begic e Worobec, em 2006, demonstraram que existem diferenças nos motivos da proteína que claramente levariam a diferenças nas características da porina, incluindo o comportamento frente aos antibióticos (Begic e Worobec, 2006). Assim, diferente da sua porina homóloga, a perda de OmpF de *S. marcescens* tem sido relacionada com resistência a carbapenêmicos, tendo assim uma característica similar a Omp36 das enterobactérias (Suh *et al.*, 2010). Outra característica observada nesta espécie foi a variabilidade de expressão tanto na mesma espécie como com o resto da família *Enterobacteriaceae*. Esta diferença de expressão se tornou significativa ao separar por grupo de perfil de resistência. O grupo AmpC (composto principalmente por *S. marcescens*) teve maior expressão de OmpF do que o seu homólogo em outras espécies.

A *S. marcescens* foi analisada separadamente das Omps devido a ter porinas de maior tamanho que são consideradas homologas porém não são iguais. A porina homóloga de *S. marcescens* é uma porina de 41KDa denominada OmpF, o comportamento de esta porina foi um pouco diferente a sua homóloga, com uma leve tendência a diminuir a expressão durante o tratamento, Begic e Worobec no ano 2006, demonstraram que existem diferenças nos motivos da proteína que claramente levariam a diferenças nas características da porina, incluindo o comportamento frente aos antibióticos (Begic e Worobec, 2006). Assim diferente a sua porina homóloga, a perda de OmpF de *S. marcescens* tem sido relacionada com resistência a carbapenêmicos, tendo assim uma característica similar a Omp36 das enterobactérias (Suh *et al.*, 2010). Outra característica observada nesta espécie foi a variabilidade de expressão tanto na mesma espécie com o resto da família *Enterobacteriaceae*, esta diferença de expressão se

tornou significativa quando separado por grupo AmpC (composto principalmente por *S. marcescens*) onde as *S. marcescens* tem uma maior expressão de OmpF que para as outras espécies.

A porina do tipo Omp36 é a principal porina relacionada com impermeabilidade de membrana e carbapenêmicos, sendo extensamente relatada a perda desta porina para isolados resistentes a estes antibióticos. Na análise de expressão gênica durante o tratamento com imipenem, confirmamos o papel do imipenem na expressão deste gene, já que a diminuição da expressão foi significativa desde a primeira passagem com o antibiótico imipenem. Existem poucos estudos sobre a resposta adaptativa das bactérias frente ao tratamento com imipenem, sendo a maioria estudos *in vivo* de pacientes tratados com imipenem, muita vezes em terapias longas. No entanto, estes estudos analisam o isolado sensível e o isolado que se tornou resistente, sem estudar os estágios durante o desenvolvimento da resistência, onde finalmente relacionam alguma alteração da porina Omp36, já seja mutação o perda, com diminuição da susceptibilidade para este antibiótico (Chia *et al.*, 2010). Ao estudar o estágio inicial do desenvolvimento, podemos sugerir que já a partir da primeira dose de tratamento a bactéria começa a regular genes para adaptar-se ao novo ambiente hostil.

Quatro isolados mostraram ausência da porina maior já no período basal sem ser resistentes aos carbapenêmicos, o que sugere que a ausência da porina não é o fator predominante na resistência a carbapenêmicos. Embora dificulte a entrada do antibiótico, ele não elimina a presença do antibiótico na célula, sugerindo outras vias de ingresso ou quantidades de expressão mínimas que são imperceptíveis no perfil fenotípico. As amostras A-4 e E-24 tiveram expressão de porina Omp36 porém não se observou no análise de porinas, essa ausência de porina no fenotípico com expressão gênica pode estar relacionada a reguladores de RNA pequenos. MicC tem a capacidade de impedir a tradução do RNAm, ao

bloquear o sítio de ligação do ribossomo (RBS) localizado no início do RNAm, diminuindo assim a expressão protéica (Vogel e Papenfort, 2006). Estes mecanismos regulatórios precisam de maiores estudos para se compreender detalhadamente o processo total de regulação de Omps.

A expressão gênica de Omp36 teve alta variabilidade entre os grupos induzidos. O grupo produtor de AmpC teve valores de expressão altos em comparação aos outros grupos estudados. A diferença foi significativa a partir da segunda passagem, isto devido principalmente ao comportamento diferente da porina homóloga de 40KDa da bactéria *S. marcescens*, a qual, a diferença das outras espécies, não foi induzida por imipenem.

Curiosamente, quando comparado o grupo induzido com resistente, os níveis de expressão de Omp36 foram menores no grupo induzido que os encontrados no grupo resistente. Esta diferença foi ainda mais significativa após o tratamento. Este comportamento pode estar relacionado aos diferentes estágios da bactéria. As passagens mostraram um estágio inicial do tratamento com o antibiótico, no qual a defesa imediata da bactéria foi uma diminuição significativa da expressão do canal de ingresso do antibiótico regulada pelo mecanismo imediato específico OmpR. Já em um estágio no qual a bactéria tem desenvolvido e estabelecido a resistência tem alcançado um balance das porinas necessário para manter a viabilidade num ambiente hostil (Lavigne *et al.*, 2013).

A relação da expressão da porina Omp36 com a resistência a carbapenêmicos não foi tão significativa, porém observamos menor expressão de porina nos isolados com CIM aumentada para ertapenem e imipenem, o que sugere uma contribuição específica para a resistência a estes antibióticos. No entanto, não pode ser considerado o principal mecanismo, uma vez que a perda de porina foi encontrada em isolados sensíveis. Também é necessário ressaltar que o comportamento de OmpC *in vivo* é diferente do encontrado *in vitro*, pois a

expressão de OmpC é favorecida *in vivo*, já que tamanho menor do seu canal restringe o ingresso de grandes moléculas carregadas encontradas neste ambiente (bile, antibióticos), já *in vitro* a menor quantidade de nutrientes leva a um aumento de expressão do canal maior OmpF (Masi e Pagès, 2013).

O perfil fenotípico de porinas não teve uma grande correlação com o encontrado na expressão gênica de porinas. Esta característica pode ter sido influenciada por diversos fatores, dependendo das características da cepa e é muito provável que a regulação pós-transcricional tenha um papel importante no estabelecimento da permeabilidade, assim também como a presença de outros fatores que afetam a funcionalidade das porinas e não a expressão, podendo explicar a relação pouco significativa encontrada entre o comportamento da expressão gênica e a variação da CIM. É necessário, no entanto, realizar outros estudos para compreender estes mecanismos na sua totalidade.

A expressão do determinante de MDR nas enterobactérias se encontra regulada por diversos mecanismos, alguns extensamente detalhados e outro ainda sendo pesquisado, o que torna difícil a identificação e a caracterização das vias usadas. Ao estudar o regulador global de enterobactérias MarA observamos como o gene foi induzido pela presença do antibiótico imipenem, tendo um aumento significativo da expressão gênica já a partir da segunda passagem. Este aumento de expressão permite demonstrar a indução do fenótipo MDR nestes isolados, uma vez que o aumento de expressão de MarA sugere a ativação de diversos mecanismos relacionados ao fenótipo MDR, como bombas de efluxo, porinas de membrana externa e outros fatores menores (Piddock, 2006a). Não foi possível encontrar o gene *marA* no grupo de *S. marcescens*, pelo que observamos a expressão do gene regulador denominado SdeR. Este gene, ainda não muito bem caracterizado, é considerado regulador da bomba de efluxo SdeAB, porém, apesar de relatos do aumento de expressão frente a mudança na

resistência a múltiplos antibióticos, ainda não foi estabelecida uma relação direta com a bomba de efluxo, sendo então caracterizado como homólogo de MarA (Begic e Worobec, 2008). O gene regulador SdeR teve um comportamento similar ao de MarA.

Quanto aos níveis de expressão de SdeR, podemos observar que o grupo sensível teve maior resposta à indução, sendo significativamente maior a partir da terceira passagem. Esta resposta exacerbada pode estar relacionada à ausência de determinantes de resistência relacionados. Ao analisar o comportamento deste regulador na fase basal, na passagem 4 do tratamento e em isolados com perfil MDR estabelecido, foi possível observar claramente a indução produzida pelo antibiótico, onde o basal teve uma expressão menor de MarA e ao final do tratamento a expressão tendeu-se a igualar com o encontrado nos isolados resistentes. Os valores similares de *marA* no final do tratamento e dos isolados resistentes, permitem supor uma atividade similar do regulador para o estabelecimento do fenótipo MDR. Os valores de expressão de SdeR foram menores que os obtidos para MarA, já seja ao comparar com os isolados tratados ou com os resistentes.

Ao correlacionar a expressão dos genes determinantes com o regulador MarA, observamos uma associação entre valores altos de AcrA com valores altos de MarA. Tem sido extensamente estudada a regulação de MarA para bombas de fluxo como a AcrA, porém existem diversos reguladores de AcrA que são independentes de MarA (Rosenblum *et al.*, 2011), o que poderia também estar influenciando a expressão de MarA. Mas pela alta correlação encontrada, podemos sugerir que em um estágio inicial no desenvolvimento do perfil MDR, MarA é o responsável imediato pela bomba de efluxo AcrA. Já a correlação com os genes de porina, observou-se uma tendência a diminuir a expressão dos genes de Omps frente aos valores aumentados de MarA, porém não foi significativa, o que demonstra uma contribuição menor de regulação para estes determinantes.

Devido à importância para o *fitness* bacteriano, as porinas tem um sistema de regulação complexo devido ao número de genes envolvidos, conformado por repressores específicos como OmpR e CpxAR, micro RNAs e outros fatores externos que influenciam na expressão (Masi e Pagès, 2013).

OmpR é o principal repressor de porinas de membrana externa por meio do mecanismo de dois componentes OmpR/EnvZ, no qual EnvZ é o sensor quinase localizada na membrana. Porém ainda não é conhecido o sistema de sinalização externa que ativa este mecanismo. Diversos fatores ativariam este mecanismo assim como outros que contribuem com OmpR na diminuição da expressão das porinas. Com nosso estudo podemos observar que ao submeter a bactéria sob tratamento com o antibiótico imipenem, o repressor OmpR teve um aumento da sua expressão desde o início do tratamento, evidenciando o efeito de indução do imipenem na impermeabilidade da membrana.

Os diferentes grupos estudados mostraram uma expressão de OmpR diferenciada. Os isolados produtores de ESBL tiveram expressões muito maiores durante o tratamento em comparação aos isolados não ESBL. Esta diferença é influenciada pelo isolado E-1 que foi um dos isolados que tiveram a perda de porina durante o tratamento.

Ao comparar expressão gênica no grupo induzido com o resistente, foi observado que a expressão de OmpR no final do tratamento foi maior do que no grupo resistente. O estágio inicial de tratamento realizado *in vitro* permitiu observar o comportamento inicial do desenvolvimento de impermeabilidade de membrana, no qual os reguladores imediatos como OmpR tem uma resposta rápida e agressiva frente ao ambiente hostil produzido pela presença do antibiótico. Existem poucos detalhes do sistema de regulação de porinas, porém, nos podemos sugerir que este repressor é uma resposta imediata.

A regulação de porina pelo OmpR é complexa devido a que trabalha num sistema de balance com as duas porinas maiores, onde o nível de expressão de OmpR e, a sua vez, a quantidade de OmpR fosforilada, favorece a expressão o a diminuição de uma u outra porina. A correlação do repressor OmpR com a expressão de porinas mostrou resultados inesperados, onde observamos que valores aumentados de Omp35 foram relacionados a valores aumentados de OmpR. Quando analisamos os valores de Omp36, encontramos uma tendência a valores diminuídos da porina frente a valores maiores de OmpR, embora não significativos.

A regulação descrita por OmpR para porinas, até agora, tem sido associada a níveis de osmolaridade, porém o comportamento deste sistema regulatório não tem sido muito estudado (Masi e Pagès, 2013). Observamos um comportamento diferente ao, até agora, relatado pelo Yoshida e colaboradores frente à regulação de osmolaridade. Yoshida observou a um aumento de Omp36 e repressão de Omp35 frente a expressões altas de OmpR (Yoshida *et al.*, 2006), porém, em nosso estudo, é necessário medir a taxa de fosforilação de OmpR para obter a quantidade de OmpR ativa na bactéria o que poderia explicar o observado em nossos isolados.

A presença de BLA (β -lactamases) nos isolados estudados apresentou características significativas frente ao desenvolvimento de resistência a carbapenêmicos, principalmente no perfil fenotípico previamente discutidos. Devido à alta variabilidade de BLA observada nas amostras clínicas, foi considerado apenas os isolados com AmpC cromossômico para estudar a influencia do tratamento do imipenem sobre este tipo de enzima e sua relação com a resistência a carbapenêmicos. A diferença na expressão de AmpC na espécie de *Enterobacter sp.* não foi significativa frente ao tratamento de imipenem. Nas cepas de *S. marcescens* foi observado um comportamento diferente mostrando uma forte indução da enzima pelo tratamento com imipenem, chegando a níveis altos de expressão. Este nível alto de expressão

também foi encontrado no grupo resistente, o que sugere fortemente uma indução de AmpC frente ao imipenem.

Diversos estudos relatam a associação de perda de porina com AmpC para a resistência a carbapenêmicos (Oteo *et al.*, 2008; Pavez *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2010), porém existem poucos estudos explicando esta associação. Nossos resultados mostraram uma prevalência maior de perda de porinas em isolados carregando AmpC e também demonstraram o efeito provocado pelo imipenem sobre AmpC, porém não observamos um aumento na hidrólise do antibiótico imipenem, quando se observa a influência de AmpC sobre a resistência ao antibiótico. Observamos-nos que valores aumentados de AmpC foram encontrados apenas nos isolados com aumento da CIM de imipenem, mas não para os outros antibióticos, o que sugere então apenas uma indução pelo antibiótico, porém não afeta significativamente o perfil de resistência para os carbapenêmicos.

Finalmente, nossos resultados mostraram uma alta variabilidade na expressão dos diversos genes estudados, o que influenciou também no comportamento observado de uma forma global. Os primeiros estudos relatados sobre regulação e estabelecimento de MDR no nível molecular foram realizados em bactérias controle ATCC (Bornet *et al.*, 2003), o que se bem permite um estudo mais homogêneo entregando um comportamento fisiológico *in vitro* mais exato, estes estudos excluem a diversidade encontrada em um ambiente hospitalar. Nosso estudo foi focado segundo características encontradas em isolados clínicos de nosso país, onde existe a presença de diversos fatores, sejam genéticos ou fenotípicos, que podem caracterizar um comportamento diverso frente a um mesmo tratamento.

O estudo da resposta destes genes reguladores e determinantes de resistência, frente ao estímulo com o imipenem, permitiu reportar o comportamento molecular da bactéria numa resposta adaptativa no estagio inicial do estabelecimento de um fenótipo MDR o que é

fundamental para a compreensão dos mecanismos de adaptação da bactéria e sua contribuição na falha terapêutica.

6. Conclusões

- A percentagem de resistência aos aminoglicosídeos e tetraciclinas foi similar para todos os grupos estudados, sugerindo uma disseminação limitada e constante a esses antibióticos no ambiente hospitalar .
- As enzimas β -lactamases do tipo ESBL são prevalentes nos isolados clínicos de nosso país. O grupo CTX-M-2 com alta prevalência na América Latina foi a principal CTX-M encontrada em nosso estudo. Esta prevalência e consequente disseminação entre os isolados clínicos levaram a novas variantes desta enzima como a relatada aqui (CTX-M-141).
- A indução com imipenem levou a um aumento da CIM para os carbapenêmicos em 77% dos isolados, mostrando-se um fator externo importante no desenvolvimento da resistência a estes antibióticos. As variações observadas na CIM de outros antibióticos não relacionados sugerem que a presença de imipenem afeta o perfil MDR.
- A exposição ao imipenem em um estágio inicial de tratamento já afeta de maneira significativa a expressão gênica da maioria dos determinantes de resistência relacionados à impermeabilidade, principalmente o canal de ingresso na bactéria, Omp36, como uma medida imediata de defesa. No entanto a perda da porina não é uma resposta adaptativa frequente no começo do estabelecimento de MDR, muito provável pelo custo no *fitness* bacteriano que isto pode ter.
- Os mecanismos reguladores, tanto o global MarA como o repressor específico OmpR, são rapidamente ativados em uma fase inicial de exposição ao imipenem, sugerindo assim a ativação de diversos genes que contribuem para a alteração da permeabilidade da bactéria, estabelecendo o fenótipo MDR.
- Os mecanismos reguladores estudados contribuem em uma etapa inicial da regulação gênica dos determinantes estudados, principalmente para a bomba AcrA. Já para as

OMPs a regulação gênica é mais complexa, com uma forte contribuição do repressor OmpR, embora essa não seja exclusiva de acordo com o observado neste estudo.

- A expressão dos determinantes de impermeabilidade contribui com o perfil de resistência aos carbapênemicos, levando a um aumento da resistência. No entanto, a relação observada neste estudo sugere que esses determinantes não sejam o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos.
- A diversidade genética encontrada em isolados clínicos leva a uma alta variabilidade no comportamento bacteriano frente à exposição ao imipenem. A presença de determinantes enzimáticos na resistência aos β -lactâmicos afeta o comportamento do perfil de resistência aos carbapenêmicos, sendo AmpC a enzima com maior prevalência e participação quando estabelecido esse perfil de resistência, o que sugere fortemente que a presença dessa enzima seja um fator de risco para o desenvolvimento da resistência a estes antibióticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AATHITHAN, S.; FRENCH, G. L. Prevalence and role of efflux pump activity in ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 6, p. 745-52, Jun 2011. ISSN 1435-4373 (Electronic)0934-9723 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21286930 >.

ABOUZEED, Y. M.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. ramR mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2428-34, Jul 2008. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18443112 >.

ACHTMAN, M. et al. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. **Infect Immun**, v. 39, n. 1, p. 315-35, Jan 1983. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6218094 >.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 10, p. 2067-75, Oct 1997. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9333027 >.

ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 40-3, Jan 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618060> >.

BALSALOBRE, L. C. et al. Detection of metallo-beta-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. **Lett Appl Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 142-5, Jul 2009. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413767> >.

BASLE, A. et al. Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. **J Mol Biol**, v. 362, n. 5, p. 933-42, Oct 6 2006. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16949612>.

BEGIC, S.; WOROBEK, E. A. Regulation of *Serratia marcescens* ompF and ompC porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 2, p. 485-91, Feb 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436436>>.

_____. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 2, p. 454-61, Feb 2008. ISSN 1350-0872. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227249>>.

BIALEK-DAVENET, S. et al. In vitro selection of ramR and soxR mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 2795-802, Jun 2011. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21464248>.

BORNET, C. et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 301, n. 4, p. 985-90, Feb 21 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12589810>.

_____. Omp35, a new *Enterobacter aerogenes* porin involved in selective susceptibility to cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2153-8, Jun 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155215>>.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933-51, table of contents, Oct 2001. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11585791>.

BRATU, S. et al. Correlation of the expression of acrB and the regulatory genes marA, soxS and ramA with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic

to New York City. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 2, p. 278-83, Aug 2009. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19457933>.

CARVALHO, K. R. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 1, p. 25-8, Jul 2009. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19216059>.

CHEN, S. et al. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 186, n. 20, p. 6689-97, Oct 2004. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15466019>.

CHIA, J. H. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. **J Chemother**, v. 21, n. 6, p. 621-6, Dec 2009. ISSN 1973-9478 (Electronic)

1120-009X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20071284>.

_____. Development of high-level carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* among patients with prolonged hospitalization and carbapenem exposure. **Microb Drug Resist**, v. 16, n. 4, p. 317-25, Dec 2010. ISSN 1931-8448 (Electronic)

1076-6294 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20524901>.

CHOLLET, R. et al. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 7, p. 2518-23, Jul 2004. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15215103>.

CHUBIZ, L. M.; RAO, C. V. Role of the mar-sox-rob regulon in regulating outer membrane porin expression. **J Bacteriol**, v. 193, n. 9, p. 2252-60, May 2011. ISSN 1098-5530 (Electronic)

0021-9193 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21398557>.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. CLSI document M07-A. Wayne, PA, USA 2012a.

_____. **Performance standards for antimicrobial Disk susceptibility test, Approved Standard. M2-A09**. 940 West Valley , Road Suite 1400, Wayne Pennsylvania, USA: CLSI 2012b.

_____. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing: Twenty Third Informational**. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute 2013.

CORNAGLIA, G. et al. Relative importances of outer membrane permeability and group 1 beta-lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 2, p. 350-5, Feb 1995. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7726496>.

COUDRON, P. E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 4163-7, Aug 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081966>>.

COWAN, S. W. et al. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 727-33, Aug 27 1992. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1380671>.

CRUZ, G. R. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 0, p. 0, Sep 2013. ISSN 1678-8060. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037111>>.

DAVIES, T. A. et al. Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007-09. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 10, p. 2298-307, Oct 2011. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21775338> >.

DAVIN-REGLI, A. et al. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. **Curr Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 750-9, Sep 2008. ISSN 1873-5592 (Electronic)

1389-4501 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18781921 >.

_____. Enterobacter gergoviae and the prevalence of efflux in parabens resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 4, p. 757-60, Apr 2006. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16473920 >.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808-16, May 2009. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19100346 >.

DERIS, J. B. et al. The innate growth bistability and fitness landscapes of antibiotic-resistant bacteria. **Science**, v. 342, n. 6162, p. 1237435, Nov 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288338> >.

DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant Klebsiella and Enterobacter spp. clinical isolates from the UK. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 4, p. 659-67, Apr 2009. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19233898 >.

ELLIOTT, E. et al. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by Klebsiella pneumoniae with an extended-spectrum beta-lactamase. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 11, p. e95-8, Jun 1 2006. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16652304 >.

EUCAST. Brealpoints Tables, for interpretation of MICs and zone diameters. 2013.

FALAGAS, M. E.; KARAGEORGOPOULOS, D. E.; NORDMANN, P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. **Future Microbiol**, v. 6, p. 653-66, Jun 2011. ISSN 1746-0921 (Electronic)

1746-0913 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21707312>.

FARRELL, D. J. et al. The in vitro evaluation of tigecycline tested against pathogens isolated in eight countries in the Asia-Western Pacific region (2008). **J Infect**, v. 60, n. 6, p. 440-51, Jun 2010. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20361999>.

FIGUEIREDO, D. Q. et al. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 368-70, May 2011. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21655828>.

FINDLAY, J. et al. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of Klebsiella pneumoniae arising during meropenem therapy. **Clin Microbiol Infect**, Mar 23 2011. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21745255>.

FUNG-TOMC, J. C. et al. Activity of carbapenem BMS-181139 against Pseudomonas aeruginosa is not dependent on porin protein D2. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 2, p. 386-93, Feb 1995. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7726503>.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 354-60, Aug 2012. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22656912> >.

_____. 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. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12951331>.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. et al. An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4178-84, Oct 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660683>>.

GEORGE, A. M.; HALL, R. M.; STOKES, H. W. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 141 (Pt 8), p. 1909-20, Aug 1995. ISSN 1350-0872 (Print)

1350-0872 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7551053>.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Do CTX-M beta-lactamases hydrolyse ertapenem? **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 5, p. 1155-6, Nov 2008. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18662942>.

_____. CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p. 832-4, Feb 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19029330>.

GOTTESMAN, S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. **Trends Genet**, v. 21, n. 7, p. 399-404, Jul 2005. ISSN 0168-9525 (Print)

0168-9525 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15913835>.

GU, R. et al. Conformational change of the AcrR regulator reveals a possible mechanism of induction. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 64, n. Pt 7, p. 584-8, Jul 1 2008. ISSN 1744-3091 (Electronic)

1744-3091 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18607081>.

GUILLIER, M.; GOTTESMAN, S. The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 21, p. 6781-94, Dec 2008. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18953042>.

HASDEMIR, U. O. et al. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2701-6, Jun 2004. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15184455>.

HERNANDEZ-ALLES, S. et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology**, v. 145 (Pt 3), p. 673-9, Mar 1999. ISSN 1350-0872 (Print)

1350-0872 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10217501>.

HUTSUL, J. A.; WOROBEK, E. Molecular characterization of a 40 kDa OmpC-like porin from *Serratia marcescens*. **Microbiology**, v. 140 (Pt 2), p. 379-87, Feb 1994. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180703> >.

HYLE, E. P. et al. Ertapenem-resistant Enterobacteriaceae: risk factors for acquisition and outcomes. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 31, n. 12, p. 1242-9, Dec 2010. ISSN 1559-6834 (Electronic)

0899-823X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21029005>.

JACOBY, G. A.; MILLS, D. M.; CHOW, N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3203-6, Aug 2004. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15273152>.

KACZMAREK, F. M. et al. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 10, p. 3396-406, Oct 2006. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17005822>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063>.

LAVIGNE, J. P. et al. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 2, p. 130-6, Feb 2013. ISSN 1872-7913. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280442>>.

LINCOPAN, N. et al. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 516-9, Jan 2005. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15635033>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

1046-2023 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11846609>.

MA, D. et al. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. **Mol Microbiol**, v. 19, n. 1, p. 101-12, Jan 1996. ISSN 0950-382X (Print)

0950-382X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8821940>.

MALLEA, M. et al. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. **Microbiology**, v. 144 (Pt 11), p. 3003-9, Nov 1998. ISSN 1350-0872 (Print)

1350-0872 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9846735>.

MALOUIN, F. et al. Outer membrane and porin characteristics of *Serratia marcescens* grown in vitro and in rat intraperitoneal diffusion chambers. **Infect Immun**, v. 58, n. 5, p. 1247-53, May 1990. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157667>>.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, p. 82-9, Jan 2008. ISSN 1198-743X (Print)

1198-743X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18154531>.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. et al. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 2, p. 342-8, Feb 1996. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8834877>.

_____. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 7, p. 1669-73, Jul 1999. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10390220>.

MASEDA, H. et al. Mutation in the *sdeS* gene promotes expression of the *sdeAB* efflux pump genes and multidrug resistance in *Serratia marcescens*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 2922-6, Jun 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422216>>.

MASI, M.; PAGÈS, J. M. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in Enterobacteriaceae: the OmpF/C - TolC Case. **Open Microbiol J**, v. 7, p. 22-33, 2013. ISSN 1874-2858. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569467>>.

MENA, A. et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2831-7, Aug 2006. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16891499>.

MIKOLOSKO, J. et al. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. **Structure**, v. 14, n. 3, p. 577-87, Mar 2006. ISSN 0969-2126. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531241>>.

MOHR, J. F., 3RD. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. **Clin Infect Dis**, v. 47 Suppl 1, p. S41-51, Sep 15 2008. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18713049>.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, Jan 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19015350>.

NIKAIDO, H.; PAGES, J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, Jun 27 2011. ISSN 1574-6976 (Electronic)

0168-6445 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21707670>.

NOTO, M. J.; FOX, P. M.; ARCHER, G. L. Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, *mecA*, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1221-9, Apr 2008. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18212094>.

ORSI, G. B. et al. Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. **J Hosp Infect**, v. 78, n. 1, p. 54-8, May 2011. ISSN 1532-2939 (Electronic)

0195-6701 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21450365>.

OTEO, J. et al. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 6, p. 534-7, Dec 2008. ISSN 0924-8579 (Print)

0924-8579 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18775649>.

PAGES, J. M. et al. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4817, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19279676>.

PAGÈS, J. M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 12, p. 893-903, Dec 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997824>>.

PATEL, N. et al. Clinical epidemiology of carbapenem-intermediate or -resistant *Enterobacteriaceae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 7, p. 1600-8, Jul 2011. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21508008>.

PAVEZ, M. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros**. 2009. 133 (Mestrado). Departamento de análises clínicas e toxicológicas- FCF, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2702, Jun 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19332672>.

PAVEZ, M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1590-2, Dec 2008. ISSN 0022-2615 (Print)

0022-2615 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19018036>.

PELLEGRINO, F. L. et al. BlaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 251-3, Aug 2006. ISSN 1413-8670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293906> >.

PEREIRA, G. H. et al. Spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Sao Paulo, Brazil. **J Hosp Infect**, Jul 26 2011. ISSN 1532-2939 (Electronic)

0195-6701 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21798628>.

PICAO, R. C. et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 6, p. 2028-37, Jun 2008. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18322055>.

_____. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 4, p. 796-7, Apr 2010. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20139141>.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 382-402, Apr 2006a. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16614254>.

_____. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 8, p. 629-36, Aug 2006b. ISSN 1740-1526 (Print)

1740-1526 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16845433>.

POIREL, L. et al. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 8, p. 3831-3, Aug 2004. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15297541>.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 1, p. 20-51, Jul 2005. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15914491>.

PRINS, J. M. et al. Antibiotic-induced endotoxin release in patients with gram-negative urosepsis: a double-blind study comparing imipenem and ceftazidime. **J Infect Dis**, v. 172, n. 3, p. 886-91, Sep 1995. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7658090>.

QUEENAN, A. M. et al. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 1, p. 565-9, Jan 2010. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19884379>.

RANDALL, L. P.; WOODWARD, M. J. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. **Res Vet Sci**, v. 72, n. 2, p. 87-93, Apr 2002. ISSN 0034-5288 (Print)

0034-5288 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12027588>.

RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 4, p. 414-26, Dec 2009. ISSN 1879-0070 (Electronic)

0732-8893 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19833471>.

RIBEIRO, V. B. et al. Detection of blaKPC-2 in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2776-7, Nov 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850690>>.

RODLOFF, A. C.; GOLDSTEIN, E. J.; TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 5, p. 916-29, Nov 2006. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16997845>.

RODRIGUES, A. C. et al. Metallo-beta-lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 3, p. 195-9, Jun 2011. ISSN 1678-4391 (Electronic)

1413-8670 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21670916>.

ROSENBLUM, R. et al. Genetic regulation of the ramA locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 1, p. 39-45, Jul 2011. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21514798>.

ROSNER, J. L.; MARTIN, R. G. An excretory function for the *Escherichia coli* outer membrane pore TolC: upregulation of marA and soxS transcription and Rob activity due to metabolites accumulated in tolC mutants. **J Bacteriol**, v. 191, n. 16, p. 5283-92, Aug 2009. ISSN 1098-5530 (Electronic)

0021-9193 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19502391>.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 9, p. 1138-43, May 2011. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21467020>.

RUZIN, A.; KEENEY, D.; BRADFORD, P. A. AcrAB efflux pump plays a role in decreased susceptibility to tigecycline in *Morganella morganii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 791-3, Feb 2005. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15673770>.

SADER, H. S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 1, p. 25-79, Feb 2004. ISSN 1413-8670 (Print)

1413-8670 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286878>.

SAMBROOK, J. R., DW. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.

SAMPAIO; MELLO, J. L. Mecanismos de Ação dos Antibióticos. In: (Ed.). **Antibióticos na Prática Médica**. São Paulo, v.1, 2007. p.17-25.

SENNATI, S. et al. Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 6003-5, Nov 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22908156>>.

SONG, W. et al. In vivo selection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by OmpK36 loss during meropenem treatment. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 4, p. 447-9, Dec 2009. ISSN 1879-0070 (Electronic)

0732-8893 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19766430>.

SUH, B. et al. Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* mediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5057-61, Dec 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876374> >.

SWICK, M. C. et al. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 2, p. 921-4, Feb 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098250> >.

THOMSON, J. M.; BONOMO, R. A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! **Curr Opin Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 518-24, Oct 2005. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16126451> >.

TOUZÉ, T. et al. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 697-706, Jul 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228545> >.

TRAN, Q. T. et al. Implication of porins in beta-lactam resistance of *Providencia stuartii*. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 32273-81, Oct 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667831> >.

TSAI, Y. K. et al. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79640, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24265784> >.

TURNER, P. J. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 63, n. 2, p. 217-22, Feb 2009. ISSN 1879-0070 (Electronic)

0732-8893 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19070453 >.

VOGEL, J. et al. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 22, p. 6435-43, Nov 15 2003. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14602901 >.

VOGEL, J.; PAPENFORT, K. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 605-11, Dec 2006. ISSN 1369-5274 (Print)

1369-5274 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17055775 >.

WARNER, D. M.; LEVY, S. B. Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of Escherichia coli to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the marRAB operon. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 2, p. 570-8, Feb 2010. ISSN 1465-2080 (Electronic)

1350-0872 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19926649>.

WU, J.; WEISS, B. Two-stage induction of the soxRS (superoxide response) regulon of Escherichia coli. **J Bacteriol**, v. 174, n. 12, p. 3915-20, Jun 1992. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1317841>.

YOSHIDA, T. et al. Transcription regulation of ompF and ompC by a single transcription factor, OmpR. **J Biol Chem**, v. 281, n. 25, p. 17114-23, Jun 23 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16618701>.

YOSHIMURA, F.; NIKAIDO, H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of Escherichia coli K-12. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 27, n. 1, p. 84-92, Jan 1985. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2580479>.

ZHANEL, G. G. et al. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027-52, 2007. ISSN 0012-6667 (Print)

0012-6667 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17488146>.

ANEXOS

Anexo.1 Tablea de informação dos 125 isolados

ID	Instituição	Bactéria	data isolamento	material clinico
Sensível				
S-1	HBP	<i>P. stuartii</i>	oct/2009	urina
S-2	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S3-1	HBP	<i>P. mirabilis</i>	oct/2009	Lav. Broncoalveolar
S3-2	HBP	<i>P. mirabilis</i>	oct/2009	Lav. Broncoalveolar
S-4	HBP	<i>P. mirabilis</i>	oct/2009	pele
S-5	HBP	<i>P. mirabilis</i>	oct/2009	urina
S-6	HBP	<i>E. aerogenes</i>	oct/2009	sec. Esternon
S-7	HBP	<i>E. cloacae</i>	oct/2009	sec. Traqueal
S-8	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S-9	HBP	<i>E. aerogenes</i>	oct/2009	sec. Traqueal
S-10	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S-11	HBP	<i>S. marcescens</i>	oct/2009	urina
S-12	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S-13	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	oct/2009	urina
S-14	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S-15	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S16-1	HBP	<i>E.coli</i>	oct/2009	urina
S16-2	HBP	<i>E.coli</i>	oct/2009	urina
S-17	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S-18	HBP	<i>E. coli</i>	oct/2009	urina
S-19	COB	<i>K. pneumoniae</i>	mar/2007	sangue
S20-1	COB	<i>K. pneumoniae</i>	mar/2007	sangue
S-21	HBP	<i>E. cloacae</i>	abril/2008	Pta. Cateter
S-22	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	set/2009	Pta. Cateter
S-23	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2009	sec. Traqueal
S-24	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2009	urina
S-25	HBP	<i>S. marcescens</i>	maio/2008	sangue

ID: identificação, HBP: Hospital da Beneficência Portuguesa, COB: centro oncológico Boldrini

ID	Instituição	Bacteria	data isolamento	material clínico
ESBL				
E-1	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E-2	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E-3	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E-4	LABMC	<i>E. coli</i>	ND	ND
E-5	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E-6	LABMC	<i>E. coli</i>	ND	ND
E-7	LABMC	<i>E. coli</i>	ND	ND
E10-2	LABMC	<i>E.coli</i>	ND	ND
E-12	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E13-2	LABMC	<i>E.coli</i>	ND	ND
E13-3	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E14-1	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E14-2	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E17-1	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E17-2	LABMC	<i>E. coli</i>	ND	ND
E-21	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
E-22	HSPE	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2005	sangue
E-23	HBP	<i>S. marcescens</i>	ago/2008	Pta. Cateter
E-24	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2009	Pta. Cateter
E-25	HBP	<i>S. marcescens</i>	set/2007	Sec. Sacral
E-26	HBP	<i>E. aerogenes</i>	out/2007	Pta. Cateter
E-27	HBP	<i>E. aerogenes</i>	nov/2007	urina
E-28	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2008	Lav. Broncoalveolar
E-29	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jul/2008	sangue
Sugestivo AmpC				
A-4	HBP	<i>E. aerogenes</i>	out/2007	Pta. Cateter
A-5	HBP	<i>S. marcescens</i>	out/2007	urina
A-6	HBP	<i>C. freundii</i>	out/2007	urina
A-7	HBP	<i>E. cloacae</i>	out/2007	Pta. Cateter
A-8	HBP	<i>E. aerogenes</i>	out/2007	urina
A-10	HBP	<i>E. cloacae</i>	nov/2007	Hemocultura
A-14	HBP	<i>E. cloacae</i>	dez/2007	sangue
A-15	HBP	<i>E. cloacae</i>	dez/2007	Pta. Cateter
A-16	HBP	<i>S. marcescens</i>	dez/2007	urina
A-17	HBP	<i>S. marcescens</i>	dez/2007	Pta. Cateter
A-18	HBP	<i>S. marcescens</i>	dez/2007	urina
A-24	HBP	<i>E. aerogenes</i>	fev/2008	Pta. Cateter
A-25	HBP	<i>S. marcescens</i>	fev/2008	Sec. Fistula
A-26	HBP	<i>S. marcescens</i>	mar/2008	Lav. Broncoalveolar
A-33	HBP	<i>E. cloacae</i>	set/2008	sangue
A-34	HBP	<i>C. freundii</i>	set/2008	urina
A-38	HBP	<i>S. marcescens</i>	abril/2008	Sec. Pleurostomia
686-1	HBP	<i>S. marcescens</i>	maio/2008	sangue
943/65	LABMC	NI	ND	ND
A-42	LABMC	<i>E. coli</i>	ND	ND

ID: identificação, LABMC: Lab. de Microbiologia Clínica FCF-USP, HSPE: Hospital Servidor Publico Estadual, HBP: Hospital da Beneficiência Portuguesa.

ID	Instituição	Bacteria	data isolamento	material clinico
Carbapenem resistentes				
C-1	HBP	<i>E. coli</i>	jul/2007	sangue
C-2	HBP	<i>E. coli</i>	jul/2007	sangue
C-3	HBP	<i>E. coli</i>	ago/2007	sangue
C-4	HBP	<i>E. coli</i>	ago/2007	Pta. Cateter
C-5	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jan/2008	Liq. Ascitico
C-6	HBP	<i>E. aerogenes</i>	jan/2007	urina
C7-1	HBP	<i>E. aerogenes</i>	jul/2008	sangue
C8-1	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	ago/2008	Sec. Drenoesplenica
C8-2	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	ago/2008	Sec. Drenoesplenica
C-9	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jul/2008	Pta. Cateter
C10-2	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	ago/2008	Pta. Cateter
C11-1	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	set/2008	urina
C-12	HBP	<i>E. aerogenes</i>	set/2008	sec. Traqueal
C15-1	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2008	urina
C15-2	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2008	urina
C-16	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2008	urina
C17-2	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2008	urina
C18-1	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2008	sangue
C-19	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2008	sec. Traqueal
C-20	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2008	Sec. Ferida MID
C-21	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jul/2008	Sincisão abdominal
C-22	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2008	urina
C-24	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	dez/2008	Pta. Cateter
C-25	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jan/2009	Sec. Ferida perna
C-27	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	jun/2007	sangue
C-28	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	mar/2007	urina
C-29	LABMC	<i>K. pneumoniae</i>	jun/2005	sangue
C-30	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	jul/2007	urina
C-31	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	maio/2007	urina
C-32	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	abril/2007	urina
C-33	COB	<i>K. pneumoniae</i>	mar/2007	sangue
C-34	HSPE	<i>E. aerogenes</i>	maio/2007	urina
C-35	HSPE	<i>E. aerogenes</i>	maio/2007	urina
C-36	HSPE	<i>E. aerogenes</i>	out/2005	sangue
C-37	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	nov/2007	sangue
C-38	LAMAC	<i>E. aerogenes</i>	nov/2007	sangue
C-40	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	maio/2009	urina
C-41	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jun/2009	Sec. Ferida MID
C-42	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jun/2009	Peripancreas
C-43	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jun/2009	sec. Traqueal
C-45	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jul/2009	urina
C-46	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	set/2009	scara
C-47	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	set/2009	Sec. Ferida
C50-2	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2009	sec. Traqueal
C-51	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND
C-52	HBP	<i>E. aerogenes</i>	jan/2008	urina
C-53	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jan/2008	urina
C-54	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2007	urina
C-55	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jan/2008	Liq. Ascitico
C-56	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2008	urina
C-57	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	nov/2008	urina
C-58	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	out/2008	urina
C-59	HBP	<i>K. pneumoniae</i>	jun/2009	urina

ID:identificação, HBP: Hospital da Beneficiencia Portuguesa, LAMAC: Lab. Médico Análises Clínicas, LABMC: Lab. de Microbiologia Clínica, COB: Centro Oncológico Boldirni, HSPE: Hospital servidor Publico Estadual.

Anexo 2 . Dendrograma por especie

Dendrograma espécie *Enterobacter cloacae*

Dendrograma espécie *Escherichia coli*

Dise (Opt:1.00%) (Tot:2.0%2.0%) (P:0.0% S:0.0%) [0.0%-100.0%]
ERIC-PCR

Dendrograma especie *Enterobacter aerogenes*

Dise (Opt:1.00%) (Tot:1.0%-1.0%) (P:0.0% S:0.0%) [0.0%-100.0%]
pfge

Dendrograma da espécie *Serratia marcescens*

Dendrograma espécie *Klebsiella pneumoniae*

Anexo 3. Nova enzima CTX-M-141

OCUS KC964871 884 bp DNA linear BCT 05-JUN-2013

DEFINITION *Klebsiella pneumoniae* strain 360356 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-141 gene, complete cds.

ACCESSION KC964871

VERSION KC964871.1 GI:508128869

KEYWORDS .

SOURCE *Klebsiella pneumoniae*

ORGANISM [Klebsiella pneumoniae](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Klebsiella*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 884)

AUTHORS Pavez,M., Martins,C.V., Dropa,M., Matte,M.H., Lincopan,N. and Mamizuka,E.M.

TITLE Emergence of the novel CTX-M-141 in *K. pneumoniae* strains causing a nosocomial outbreak of infection in Brazil

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 884)

AUTHORS Pavez,M., Martins,C.V., Dropa,M., Matte,M.H., Lincopan,N. and Mamizuka,E.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-APR-2013) School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 17, Sao Paulo, SP 05508-000, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..884
/organism="Klebsiella pneumoniae"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="360356"
/isolation_source="nosocomial"
/db_xref="taxon:[573](#)"
/country="Brazil"

[CDS](#) 1..876
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="extended spectrum beta-lactamase CTX-M-141"
/protein_id="[AGN11769.1](#)"
/db_xref="GI:508128870"

/translation="MMTQSIIRSM LTVMATLPLLFSSATLHAQANSVQQQLEALEKSS
GGRLGVALINTADNSQILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLKQSESDKHLNQRVEIKK
SDLVNYPNPIAEKHVNGTMTLAE LGAAALQYSDNTAMNKLI AHLGGPDKVTAFARSLGD
ETFR LDRTEPTLNTAIPGDPRDTTTP LAMAQTLK NLT LGKALAE TQREQLVTWLKGNT
TGSASIRAGLPKSWVVGDKTGS GDYGT TNDIAVIWPENHAPLVLVTYFTQPEQKAESR

RDILAAAAKIVTHGF "

ORIGIN

```

1 atgatgactc agagcattcg ccgctcaatg ttaacgggtga tggcgacgct acccctgcta
61 tttagcagcg caacgctgca tgcgcaggcg aacagcgtgc aacagcagct ggaagccctg
121 gagaaaagtt cgggaggtcg gcttggcggt gcgctgatta acaccgccga taattcgcag
181 attctctacc gtgccgatga acgttttgcg atgtgcagta ccagtaaggt gatggcggcc
241 gcggcgggtgc ttaaacagag cgagagcgat aagcacctgc taaatcagcg cgttgaaatc
301 aagaagagcg acctgggttaa ctacaatccc attgcggaga aacacgttaa cggcacgatg
361 acgctggctg agcttggcgc agcggcgctg cagtatagcg acaatactgc catgaataag
421 ctgattgccc atctgggtgg tcccgataaa gtgacggcgt ttgctcgctc gttgggtgat
481 gagaccttcc gtctggacag aaccgagccc acgctcaata ccgccattcc aggcgacccg
541 cgtgatacca ccacgccgct cgcgatggcg cagaccctga aaaatctgac gctgggtaaa
601 gcgctggcgg aaactcagcg ggaacagttg gtgacgtggc ttaagggcaa tactaccggt
661 agcgcgagca ttcgggcggg tctgccgaaa tcatgggtag tgggcgataa aaccggcagc
721 ggagattatg gcaccaccaa cgatatcgcg gttatctggc cggaaaacca cgcaccgctg
781 gttctggtga cctactttac ccaaccggag cagaaggcgg aaagccgctc ggatattctg
841 gctgcggcgg cgaaaatcgt aaccacgggt ttctgatgca ataa

```

Entorno genético da enzima CTX-M-141