



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

SÉRGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR

**DETECÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
Pseudomonas aeruginosa DE UM HOSPITAL DE RECIFE-PE**

**Recife
2020**

SÉRGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR

**DETECÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
Pseudomonas aeruginosa DE UM HOSPITAL DE RECIFE-PE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Medicina Tropical.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

COORIENTADORA: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

**Recife
2020**

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

C837d Costa Júnior, Sérgio Dias da
Detecção fenotípica e molecular da resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de um hospital de Recife-PE/ Sérgio Dias da Costa Júnior. – 2020.
79 f.; il.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Carbapenêmicos. 3. Aminoglicosídeos. 4. Disseminação clonal. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (orientadora). II. Título.

616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2020 - 034)

SÉRGIO DIAS DA COSTA JÚNIOR

**DETECÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
Pseudomonas aeruginosa DE UM HOSPITAL DE RECIFE-PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 18/02/2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessôa de Azevedo Ximenes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedicado aos meus avós, meus professores da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou durante todo meu caminho, pois sem ele nada do que sou e conquistei até hoje seria possível. Aos meus pais e avós pela educação que me ofereceram, por sempre terem confiado em mim e me apoiado em todas as decisões tomadas. Cada conquista minha sempre dedicarei a vocês.

À minha orientadora Profa. Maria Amélia, um ser humano magnífico, com um coração enorme, que sempre me ofereceu ótimos conselhos e ensinamentos. À minha coorientadora Profa. Isabella Macário que acompanha minha trajetória acadêmica desde a graduação. Agradeço imensamente por fazer parte de seus laboratórios, por seus incentivos e por cada conhecimento dividido, pela nossa amizade e por todos os conselhos dados.

A todos que fazem parte do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da UFPE, em especial a Luís André e João Victor. A todos os que fazem parte do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, em especial Jailton Lobo e Adriana Costa.

Aos meus amigos que me ajudaram com os estudos e na solução dos piores problemas durante o mestrado.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, agradeço a cada um que, mesmo não sendo aqui listado, teve alguma participação nessa conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, a presença de genes de resistência aos antimicrobianos, como carbapenêmicos e aminoglicosídeos, está associada ao prolongamento do tempo de tratamento e altas taxas de morbimortalidade. Estudos descrevem diferentes taxas de incidências de cepas de *P. aeruginosa* capazes de produzir ou coproduzir enzimas carbapenemases e/ou metilases RNAr 16S. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital de Recife-PE, obtidos nos anos de 2018 e 2019, descrever o perfil clonal e os perfis fenotípico e genético de resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos desses isolados. Foram obtidos 64 isolados de *P. aeruginosa* de um hospital de Recife-PE, nos quais as cepas foram identificadas quanto a espécie e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos através do sistema automatizado BD Phoenix™. Além disso, foi realizada microdiluição em caldo para determinar as CIMs dos antimicrobianos tobramicina e polimixina B. Posteriormente, os isolados foram submetidos à Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) e sequenciamento para detecção dos genes de enzimas carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, e *bla*_{IMP}) e metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*), e *Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano* (ERIC-PCR) para determinação do perfil clonal. Dos 64 isolados estudados no presente estudo, 34 foram selecionados para a realização dos testes fenotípicos complementares e moleculares, seguindo critérios de inclusão amostral. Os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{VIM-2} foram identificados em 32,4% (11/34) e 38,2% (13/34) dos isolados testados, respectivamente. O gene *rmtD1* foi detectado em 32,4% (11/34) dos isolados analisados. Oito isolados carregavam ambos os genes *bla*_{KPC} e *rmtD1*, enquanto a coocorrência dos genes *bla*_{VIM-2} e *rmtD1* foi detectada em três cepas e um isolado apresentou os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM-2} e *rmtD1*. A tipagem molecular por ERIC-PCR demonstrou a disseminação de três clones patogênicos no hospital. Diante disso, os achados do presente estudo são de grande importância, visto que trata-se do primeiro relato da coocorrência dos genes *bla*_{VIM-2} e *rmtD1* em microrganismos. Além disso, enfatiza-se a necessidade do cumprimento das medidas de controle de disseminação de bactérias no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Carbapenêmicos. Aminoglicosídeos. Disseminação clonal.

ABSTRACT

Among the *Pseudomonas aeruginosa* strains, the presence of antimicrobial resistance genes, such as carbapenems and aminoglycosides, is associated with prolonged treatment time and high morbidity and mortality rates. Studies describe different incidence rates of *P. aeruginosa* strains capable of producing or co-producing carbapenemase enzymes and/or 16S rRNA methylases. Thus, the present study aimed to characterize the susceptibility profile of *P. aeruginosa* clinical isolates from a Recife-PE hospital, obtained between 2018-2019, to describe the phenotypic, genetic and clonal profiles of carbapenemic and aminoglycosides resistance of these isolates. 64 *P. aeruginosa* isolates were collected from hospital in Recife-PE, where the strains were identified for species and antimicrobial susceptibility profile using the automated BD Phoenix TM system. In addition, broth microdilution was performed to determine the MICs of the tobramycin and polymyxin B antimicrobials. Subsequently, the isolates were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing to detect the carbapenemase enzyme genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, and *bla*_{IMP}) and 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*), and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) for clonal profile determination. Of the 64 isolates studied in the present study, 34 were selected for complementary and molecular phenotypic tests, following sample inclusion criteria. The *bla*_{KPC} and *bla*_{VIM-2} genes were identified in 32,4% (11/34) and 38.2% (13/34) of the isolates tested, respectively. The *rmtD1* gene was detected in 32.4% (11/34) of the isolates analyzed. Eight isolates carried both the *bla*_{KPC} and *rmtD1* genes, while co-occurrence of the *bla*_{VIM-2} and *rmtD1* genes was detected in three strains and one isolate had the *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM-2} and *rmtD1* genes. ERIC-PCR molecular typing demonstrated the spread of three pathogenic clones in the hospital. Therefore, the findings of the present study are of great importance, since it is the first report of the co-occurrence of the *bla*_{VIM-2} and *rmtD1* genes in microorganisms. In addition, it is important emphasize the need to comply with bacterial spread control measures in the hospital environment.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Carbapenems. Aminoglycosides. Clonal dissemination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de <i>P. aeruginosa</i>	16
Figura 2 -	Estrutura química de um carbapenêmico (imipenem).....	21
Figura 3 -	Estrutura química de aminoglicosídeos.....	25
Figura 4 -	Estrutura tridimensional do Sítio A do RNAr 16S ligado à gentamicina.....	26
Figura 5 -	Estruturas cristalinas das RMTases ArmA, RmtB e NpmA ligadas ao co-substrato S-adenil-L-metionina (SAM).....	28
Figura 6 -	Representação esquemática da extração do DNA total, por meio do Kit Brazol.....	37
Figura 7 -	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de um hospital em Recife-PE, durante o período 2018 a 2019.....	46
Figura 8 -	Padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de um hospital terciário de Recife-PE, Brasil. Na coluna da esquerda: o coeficiente de similaridade das amostras. No meio, a identificação dos isolados. Na coluna da direita: o padrão das bandas da ERIC-PCR.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das enzimas carbapenemases.....	23
Tabela 2 -	Enzimas metilases RNAr 16S envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos, ano, local e espécie do primeiro relato em humanos.....	29
Tabela 3 -	Enzimas metilases RNAr 16S e coocorrência com enzimas beta-lactamases.....	31
Tabela 4 -	Variáveis relacionadas à caracterização genética da resistência aos carbapenêmicos.....	34
Tabela 5 -	Variáveis relacionadas à caracterização genética da resistência ao aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S.....	35
Tabela 6 -	<i>Primers</i> utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de enzimas carbapenemases.....	39
Tabela 7 -	<i>Primers</i> utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.....	39
Tabela 8 -	Frequência de cepas multidroga-resistentes de <i>P. aeruginosa</i> nos locais de coleta do isolados.....	45
Tabela 9 -	Tipo de amostra, perfil de susceptibilidade, genes de resistência e perfil da ERIC-PCR de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de um hospital público de Recife-PE, Brasil, coletados durante o período 2018 a 2019.....	47
Tabela 10 -	Identificação do isolado, ERIC-PCR, região de coleta e perfil de resistência de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de um hospital público de Recife-PE, Brasil, coletados durante o período 2018 a 2019.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AN	Ágar nutriente
ANBIO	Associação Nacional de Biossegurança
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ArmA	Aminoglicosídeo Resistência Metiltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração
bp	Pares de Bases
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Müeller Hinton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERIC-PCR	<i>Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano – Reação em cadeia da Polimerase</i>
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
IH	Infecção Hospitalar
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Luria Bertani
MDR	Multidroga-resistentes
MDS	Multidroga sensível
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MLB	Metalo-beta-lactamases

NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PCIH	Programa de Controle de Infecção Hospitalar
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
pH	Pontencial Hidrogeniônico
RmtA	Ribossomal Metiltransferase A
RmtB	Ribossomal Metiltransferase B
RmtC	Ribossomal Metiltransferase C
RmtD	Ribossomal Metiltransferase D
RmtE	Ribossomal Metiltransferase E
RmtF	Ribossomal Metiltransferase F
RmtG	Ribossomal Metiltransferase G
RmtH	Ribossomal Metiltransferase H
SPM	São Paulo Metallo-beta-lactamase
spp.	Espécies
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV-B	Ultravioleta B
VIM	Verona Imipenemase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.2	INFECÇÕES HOSPITALARES.....	18
2.3	CARBAPENÊMICOS.....	21
2.4	CARBAPENEMASES.....	22
2.5	AMINOGLICOSÍDEOS.....	25
2.6	RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS MEDIADA POR METILASES RNAr 16S.....	28
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	34
4.2	LOCAL DO ESTUDO.....	34
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	34
4.4	DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	34
4.5	TÉCNICAS LABORATORIAIS EMPREGADAS.....	36
4.5.1	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	36
4.5.2	Extração do DNA total.....	37
4.5.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	38
4.5.4	Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR).....	40
4.5.5	Sequenciamento.....	41
4.5.6	Análises estatísticas.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	EMERGÊNCIA DO GENE <i>rmtD1</i> EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PORTADORES DOS GENES <i>bla</i> _{KPC} E/OU <i>bla</i> _{VIM-2} NO BRASIL.....	42
6	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO.....	64

1 INTRODUÇÃO

Infecções relacionadas à assistência saúde (IRAS) causadas por bactérias gram-negativas são consideradas particularmente preocupantes, devido à alta eficiência desses microrganismos na regulação e/ou aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, especialmente na presença de pressão seletiva exercida pelo uso desses fármacos. *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo não fermentador de grande importância clínica devido à sua distribuição global, alta prevalência em países em desenvolvimento, diversidade de fatores de virulência e ao amplo espectro de resistência. As características genéticas desse microrganismo incentivam as pesquisas de genes de resistência bacteriana e relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de pacientes hospitalizados (Silva-Júnior et al., 2017; Siqueira et al., 2018; Vaez et al., 2018).

Os carbapênemicos, aminoglicosídeos e polimixinas estão entre as principais classes de fármacos utilizadas no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, em muitos casos esses antimicrobianos são utilizados em associação para alcançar um esquema terapêutico eficaz. Porém, cepas de *P. aeruginosa* que carregam genes que codificam enzimas de resistência a ambos os fármacos estão cada vez mais emergentes (Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Urbanowicz et al., 2019).

Estudos realizados no Brasil, que avaliaram a presença dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtG* e *rmtD*, por Doi et al. (2007), Fristsche et al. (2008), Bueno et al., (2013) e Quiles et al. (2015) relataram a primeira ocorrência dos genes *rmtD*, *rmtB*, *rmtG* e *armA*, respectivamente, em isolados clínicos de enterobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores. A primeira identificação do gene *rmtD* ocorreu em um isolado clínico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 (Doi et al. (2007). Similarmente, Cavalcanti et al. (2015) em um trabalho realizado com nove isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e produtores de enzimas β -lactamases, provenientes de três hospitais públicos de Recife, avaliaram a presença dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC*, e *rmtD* e detectaram apenas o gene *rmtD* em um isolado portador de SPM-1, que apresentou elevada Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina).

Estudos epidemiológicos moleculares são essenciais para a detecção da origem e da disseminação de microrganismos, com a finalidade de desenvolver estratégias preventivas para controlar a transmissão de bactérias entre os pacientes. Os métodos de genotipagem bacteriana,

como a *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*-PCR (ERIC-PCR), são utilizados como uma ferramenta para a diferenciação de um grupo bacteriano fenotipicamente idêntico, tendo impacto direto na intervenção terapêutica por serem essenciais na identificação de cadeias de transmissão em surtos hospitalares. Além disso, a partir das ferramentas de genotipagem bacteriana é possível evidenciar as relações entre microrganismos de mesma espécie em determinada área geográfica durante um período de tempo determinado (Jacomé et al., 2016; Tabak et al., 2019)

Lincopan et al. (2010) relataram dois casos de balanopostite em um hospital de São Paulo, Brasil, causada por isolados de *P. aeruginosa* que apresentavam o gene *rmtD* e os resultados da ERIC-PCR, revelaram que os isolados apresentavam relação clonal. Em contrapartida, Tada et al. (2013), em um estudo realizado em um hospital do Vietnam, avaliaram a relação clonal de 2 isolados clínicos de *P. aeruginosa* que apresentavam o gene *rmtB*, através do método de Eletroforese de Campo Pulsante (PFGE), e obtiveram diferentes padrões de PGFE.

Dessa forma, o presente estudo pretende caracterizar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital de Recife-PE. Além disso, detectar a presença de genes de enzimas carbapenemases (KPC e MBLs) e metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtG*, *rmtH*, *rmtF*, *rmtE* e *rmtD*) e o perfil de disseminação clonal desses isolados, a fim de se obter dados fenotípicos e moleculares locais que possam ser úteis para ressaltar a importância da implementação de procedimentos para controlar a disseminação de bactérias resistentes em ambientes hospitalares e apoiar a busca por novas abordagens terapêuticas frente às cepas resistentes de *P. aeruginosa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo não fermentador (BGNNF), aeróbio restrito, oxidase positivo, que pode ser encontrado na microscopia como célula isolada, aos pares ou em cadeias curtas. Além disso, apresenta motilidade devido ao seu flagelo polar monotríqueo. *P. aeruginosa* é caracterizada por apresentar pigmentos fluorescentes difusíveis em meios de cultura, pioverdina e piocianina, importantes no diagnóstico laboratorial da bactéria. É encontrada originalmente no solo, mas pode estar presente na água e colonizando plantas e animais, nos quais está associada à etiologia de diversas infecções humanas e animais, principalmente em pacientes imunocomprometidos devido ao seu caráter oportunista (Azam, Kan, 2018; Parkins, Somayaji, Waters, 2018).

Pseudomonas aeruginosa apresenta extensa capacidade metabólica, exemplificada pelas habilidades de produção de múltiplos metabólitos e polímeros secundários e capacidade de utilização de diversas fontes de carbono e receptores de elétrons. O repertório de genes de *P. aeruginosa* que são substancialmente conservados sugere a maior proporção de genes reguladores observadas em genomas bacterianos conhecidos, exercendo papel fundamental para resposta e adaptação a diversos ambientes, no qual está relacionado a capacidade desse microrganismo de colonizar ambientes bióticos e abióticos (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Parkins, Somayaji, Waters, 2018).

Essa bactéria é a espécie mais importante clinicamente do gênero *Pseudomonas*, devido à sua distribuição global, alta prevalência em países em desenvolvimento, diversidade de fatores de virulência e ao amplo espectro de resistência que pode apresentar em amostras de pacientes. Os mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos apresentados por esse microrganismo estão entre as principais causas de falha terapêutica e altos índices de morbimortalidade em infecções hospitalares (Jacomé et al., 2016; Silva-Júnior et al., 2017; Vaez et al., 2018).

Resistência intrínseca é a habilidade natural de um microrganismo resistir a moléculas tóxicas e antimicrobianos. Patógenos oportunistas são caracterizados por apresentarem alta resistência intrínseca a diversos antimicrobianos. A resistência intrínseca da *P. aeruginosa* envolve diversos mecanismos, dentre eles: a diminuição da permeabilidade da membrana

externa, expressão de bombas de efluxo a múltiplos fármacos e produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Silva-Júnior et al., 2017).

A diminuição da permeabilidade em cepas de *P. aeruginosa* está relacionada à redução do número de proteínas transmembranas porinas e substituição por canais mais específicos e seletivos para absorção de nutrientes. A resistência da *P. aeruginosa* a antimicrobianos de amplo espectro, como cefalosporinas e carbapenêmicos, é comumente causada por esse mecanismo de adaptação. Os genes envolvidos nesse mecanismo são onipresentes em bactérias gram-negativas e podem estar localizados no genoma ou plasmídeo (Khan, Ahmad, Mehboob, 2015; Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Silva-Júnior et al., 2017).

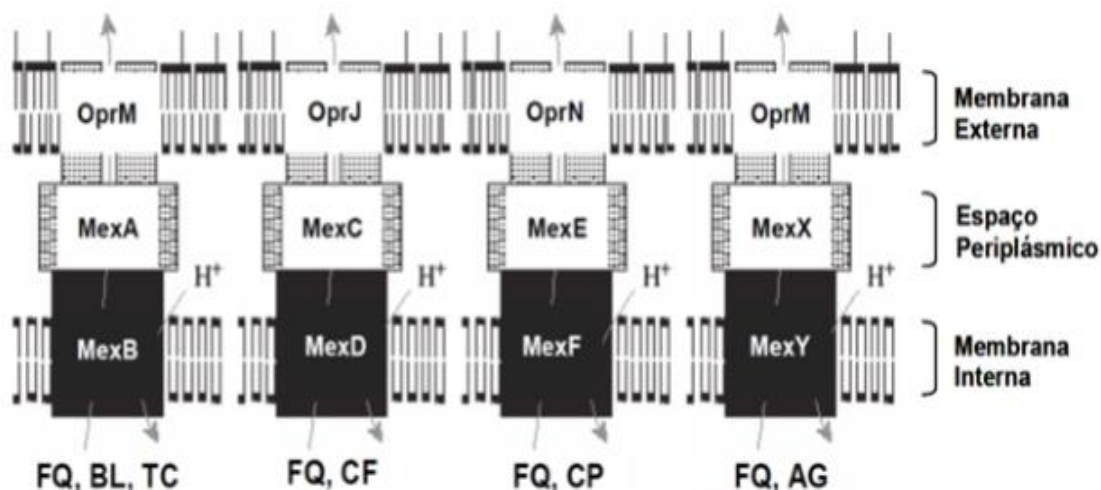
P. aeruginosa possui 4 sistemas de efluxo multidrogas ativos conhecidos, MexAB-OprM, MexXY/OprM(OprA), MexCD-OprJ e MexEF-OprN (Figura 1). Os genes que codificam esses sistemas estão sob influência de diferentes fatores regulatórios, portanto, os níveis de expressão desses sistemas diferem conforme diferentes condições do microambiente no qual o microrganismo está inserido. Os sistemas MexAB-OprM e o MexXY/OprM são os mais prevalentes em cepas de amostras clínicas e estão relacionados à aquisição de resistência a um amplo espectro de antimicrobianos. Existem outras formas de bombas de efluxo nesses microrganismos, porém, seus papéis na resistência às toxinas e antimicrobianos ainda não estão bem esclarecidos (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Du et al., 2018).

A produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos em *P. aeruginosa* está relacionada à presença do gene que codifica uma beta-lactamase indutível, AmpC. A produção dessa enzima normalmente está relacionada à baixa resistência a aminopenicilinas e cefalosporinas. No entanto, a superprodução de AmpC pode conferir resistência a um amplo espectro de antimicrobianos (Parkins, Somayaji, Waters, 2018; Vaez et al., 2018).

Ao contrário dos mecanismos intrínsecos, a resistência adquirida está relacionada à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos e levando a populações bacterianas com resistência irreversível. Além disso, a transferência de material genético intra e interespécies através de elementos genéticos móveis, característica de bacilos gram-negativos, é apontada como uma das principais responsáveis pela aquisição de determinantes de resistência aos antimicrobianos em cepas de *P. aeruginosa* (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Silva-Júnior et al., 2017; Azam, Kan, 2018). Devido à superexpressão de genes de resistência e transmissibilidade por plasmídeos, a resistência adquirida é um mecanismo potente que confere resistência a um amplo espectro de antimicrobianos, além de ocasionar o aumento da prevalência da resistência

a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Azam, Kan, 2018).

Figura 1. Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*.



FQ: forquilonona; BL: beta-lactâmico; TC: tetraciclina; CF: cefalosporina; CP: carbapenêmico; AG: aminoglicosídeo.

Fonte: Neves et al., 2011.

A ampla variedade de mecanismos de resistência que os isolados de *P. aeruginosa* apresentam e sua capacidade de interação e troca de elementos genéticos com outras bactérias estimulam a pesquisa da relação clonal entre isolados de pacientes hospitalizados. Os métodos de tipagem molecular, como o método de análise do *Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano* (ERIC-PCR), são fundamentais na determinação da relação genética de microrganismos que estão epidemiologicamente relacionados, além disso, a tipagem molecular pode auxiliar na determinação de surtos, na identificação de transmissão cruzada entre pacientes e no monitoramento e controle de infecções relacionadas à assistência em saúde (Lincopan et al., 2010; Neves et al., 2011; Tada et al., 2013; Lima et al., 2018; Pereira et al., 2020).

Pseudomonas aeruginosa contribui com cerca de 11% de todas as infecções hospitalares. No Brasil, estudos multicêntricos demonstraram alta incidência de resistência ao imipenem em cepas isoladas de pacientes em UTIs (Neves et al., 2011; Balasoiu et al., 2014; Khan, Ahmad, Mehboob, 2015; Silva-Júnior et al., 2017). Os principais sítios de colonização da bactéria são os rins, o trato urinário e o trato respiratório superior. Devido a sua presença nesses sítios, a *P. aeruginosa* é comumente relatada em infecções cirúrgicas e de feridas, infecções do trato urinário (ITU), pneumonias, dermatites, infecções sistêmicas respiratórias

em pacientes com fibrose cística e bacteremia (Balasoiu et al., 2014; Khan, Ahmad, Mehboob, 2015; Silva-Júnior et al., 2017). Além disso, podem ser responsáveis por diversos outros tipos de infecções em pacientes com queimaduras severas e imunossuprimidos, como pacientes com câncer ou AIDS (Azam, Khan, 2018).

Estudo realizado em um hospital universitário dos Estados Unidos demonstrou um aumento na incidência de *P. aeruginosa* em infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade entre pacientes adultos e pediátricos vivendo com HIV/AIDS, com baixa contagem de linfócitos CD4. Dos 4825 pacientes vivendo com HIV no estudo, infecções causadas por *P. aeruginosa* foram diagnosticadas em 72 (1,5%) dos pacientes (Flanagan et al., 2007). Tofas et al. (2017) identificaram 64 pacientes com infecção da corrente sanguínea causadas por *P. aeruginosa* dentre 192 pacientes com malignidades hematológicas, internados em três hospitais terciários de Atenas, Grécia. A maioria dos pacientes tiveram doença de rápida fatalidade (37/64, 58%). Dos 64 isolados clínicos de *P. aeruginosa* coletados no estudo, 19 apresentaram resistência ao imipenem (30%), 18 à amicacina (28%) e 19 à gentamicina (30%). Além disso, 24 isolados foram identificados como MDR (37,5%), apresentando resistência a 3 ou mais antimicrobianos.

2.2 INFECÇÕES HOSPITALARES

Infecção Hospitalar (IH) é toda manifestação clínica de infecção que ocorre após 72 horas da admissão do paciente, que não possua evidência clínica e dados laboratoriais que comprovem uma infecção anterior a internação do paciente. Quando sintomas de infecção são apresentados antes de 72 horas de internação, porém associados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos, realizados durante este período, também é considerado como IH (Khan, Ahmad, Mehboob, 2015; Siqueira et al., 2018). Recentemente, o termo “Infecções relacionadas a assistência à Saúde” (IRAS) começou a ser usado para designar infecções adquiridas em ambiente hospitalar ou de diagnóstico clínico. O problema das infecções na assistência à saúde não é restrito aos países subdesenvolvidos, sendo visto como um desafio global. As medidas de prevenção visam a diminuição dos índices de morbidade e mortalidade de pacientes internados em hospitais por todo o mundo, denominado de “Desafio Global para a Segurança do Paciente” (Linardi et al., 2014; Khan, Ahmad, Mehboob, 2015; WHO, 2019).

As situações em que as infecções de pacientes internados não são descritas com IRAS são: (1) infecções que estavam presentes no paciente antes da admissão no hospital, porém ocorrendo alterações no patógeno com o surgimento de novos sintomas; (2) as infecções são

adquiridas através da via transplacentária devido a associação com outras doenças como citomegalovírus, rubéola, sífilis e toxoplasmose, caracterizadas por surgirem até 48 horas após o nascimento da criança (Khan, Ahmad, Mehboob, 2015, WHO, 2016; WHO, 2019).

Em média 1 a cada 10 pacientes é afetado por IRAS em todo o mundo. Em hospitais de cuidados graves de países desenvolvidos, a cada 100 pacientes 7 desenvolvem pelo menos uma IRAS. Esse número sobe para 15 em países em desenvolvimento, nos quais os investimentos em saúde ainda são minoritários. Na África, onde há menos investimento em cuidados relacionadas à saúde, 20% das mulheres são acometidas por infecções de feridas após parto por cesariana, afetando sua saúde e a capacidade de cuidar do seu bebê (WHO, 2016; WHO, 2019).

As IRAS possuem origem multifacetada, estando relacionadas aos sistemas e processos de prestação de assistência à saúde e a limitações políticas e econômicas dos sistemas de saúde, bem como ao comportamento humano sujeito pela educação. Assim sendo, são estabelecidas medidas básicas de prevenção e controle das IRAS, como por exemplo, a disponibilização contínua de insumos para a prática correta de higienização das mãos, estabelecimento de corpo profissional exclusivo no cuidado a pacientes portadores de infecções por bactérias resistentes, além de estabelecer área de isolamento para pacientes colonizados/infectados por microrganismos multirresistentes (Brusaferro et al., 2015, Bezerra-Neto., 2018). Estudo realizado por Bezerra-Neto et al. (2018) descreveram a presença de 14 isolados de *Staphylococcus* spp. com CIM ≥ 2 µg/ml para a vancomicina, através do método de microdiluição em caldo, entre 102 cepas de *Staphylococcus* spp. coletadas de profissionais de saúde de um hospital universitário.

Como medida de controle das IRAS e devido ao surgimento de movimentos de sensibilização ao problema foram criadas as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), a primeira intervenção governamental no Brasil para o controle das infecções hospitalares. A CCIH tem como objetivo a implementação dos mecanismos necessários de vigilância epidemiológica, visando o adequado planejamento, elaboração, avaliação e execução do Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH). O PCIH é um conjunto de ações, descritas na Portaria nº. 196 de 24 de junho de 1983, pelo Ministério da Saúde, com o objetivo de reduzir ao máximo possível à incidência e gravidade das infecções hospitalares. Esse programa é formado por uma equipe de multiprofissionais responsáveis pela aplicação desta medida de prevenção das infecções hospitalares (Pereira, Moriya, 1988; Oliveira et al., 2015; WHO, 2019).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a cada ano cerca de 14% dos pacientes internados em hospitais brasileiros contraem algum tipo de infecção hospitalar e aproximadamente 100 mil pessoas morrem por ano em decorrência a infecções contraídas em hospitais. Estudos demonstraram que os pacientes mais acometidos são os das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), onde em média 60% dos pacientes internados apresentam algum tipo de infecção (Leiser et al., 2007; Padrão et al., 2010; WHO, 2016). Em países em desenvolvimento a frequência de IRAS em UTIs alcançam taxas 2 a 3 vezes maiores de frequências em relação às apresentadas por países desenvolvidos (WHO, 2016; WHO, 2019).

As mais prevalentes infecções em UTIs são a pneumonia e a infecção do sítio cirúrgico, seguidas por infecção do trato gastrointestinal, infecção do trato urinário (ITU) e infecção na corrente sanguínea. Estudos associam a alta prevalência de infecções em UTI à utilização de dispositivos médicos (Magill et al., 2014; MacVane, 2016; Menezes et al., 2016). Em um estudo de vigilância com 11.420 pacientes de 183 hospitais dos Estados Unidos, foi observado que infecções associadas ao uso de dispositivos médicos em UTI (infecção da corrente sanguínea associada ao uso de cateter central, infecção do trato urinário associada ao uso de cateter e pneumonia associada à ventilação mecânica) representaram 25,6% das causas de infecções hospitalares no país. Além disso, 39% dos casos de pneumonia estavam relacionados ao uso de ventilação mecânica (Magill et al., 2014; MacVane, 2016; Silva-Júnior et al., 2017).

As principais bactérias causadoras de IHS são *Staphylococcus* sp., entre as bactérias gram-positivas, e as enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, entre as bactérias gram-negativas (Khan, Ahmad, Mehboob, 2015; MacVane, 2016; Menezes et al., 2016). O diagnóstico do microrganismo causador de IRAS é essencial para descobrir a fonte da infecção e para que se aplique o mecanismo de contenção do patógeno, evitando surtos pela disseminação clonal de bactérias resistentes (WHO, 2016; Correa et al., 2017; WHO, 2019).

Infecções causadas por bactérias gram-negativas, em especial *P. aeruginosa*, são consideradas particularmente preocupantes, devido à alta eficiência desses microrganismos na regulação e/ou aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência aos antimicrobianos, especialmente na presença de pressão seletiva exercida pelo uso desses fármacos (Peleg et al., 2011; Siqueira et al., 2018). Siqueira et al. (2018) descreveram a prevalência de infecções hospitalares causadas por bactérias gram-negativas entre 600 amostras de urina, sangue e secreções de pacientes de um hospital universitário do Espírito Santo, Brasil,

entre os anos de 2013-2016. O estudo demonstrou a presença de bactérias gram-negativas em 54% das amostras, sendo a *P. aeruginosa* presente em 21% das amostras de gram-negativas.

2.3 CARBAPENÊMICOS

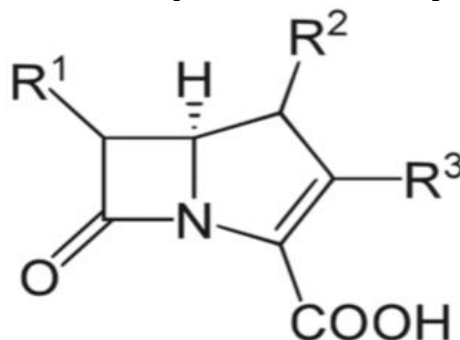
Os carbapenêmicos são antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, devido à presença do anel beta-lactâmico em sua estrutura química, que diferem dos outros representantes dessa classe por possuírem, ligada ao anel beta-lactâmico, um núcleo pentacíclico não-saturado e ligado a um átomo de carbono, que caracteriza o anel carbapenema. Além disso, possuem uma cadeia hidroxietila, em vez de uma cadeia acilamina, em sua estrutura molecular (Figura 2) (Papp-Wallace et al., 2011; Codjoe, Donkor, 2018).

Os carbapenêmicos exercem seu efeito antibacteriano após atravessar a membrana celular dos bacilos gram-negativos, utilizando porinas transmembranas. No espaço periplasmático ligam-se às Proteínas de Ligação a Penicilinas (PBPs), que são importantes para a formação e alongamento do peptidoglicano da parede celular bacteriana. A ligação a essas proteínas impede a construção da parede celular, inibe o crescimento da célula bacteriana e resulta na lise e morte da bactéria. Diante do efeito que exercem nas células bacterianas, esses antimicrobianos são considerados bactericidas (Dahiya et al., 2015; Morrill et al., 2015).

Os carbapenêmicos foram introduzidos na clínica médica na década de 1980 e usualmente utilizados como última opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR. Esses antimicrobianos possuem atividade contra bactérias produtoras das enzimas beta-lactamases ESBL e AmpC. A tienamicina foi o primeiro carbapenêmico e serviu como a referência ou composto modelo para todos os carbapenêmicos (Zhanel, 2007; Dahiya et al., 2015; Morrill et al., 2015).

Os carbapenêmicos amplamente utilizados na clínica são o imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem. Imipenem e meropenem são os antimicrobianos mais utilizados dessa classe por demonstrarem eficácia no tratamento de infecções graves e polimicrobianas, incluindo infecções intra-abdominais, pneumonias e septicemias. No entanto, o imipenem é susceptível a degradação por uma enzima localizada nos túbulos renais denominada desidropeptidase-1 (DHP-1), levando à necessidade da administração de um inibidor da enzima DHP-1 associado ao fármaco, como a cilastatina. O ertapenem demonstrou possuir baixa atividade frente a isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Quanto ao doripenem, esse fármaco teve seu uso clínico inicialmente liberado nos Estados Unidos e na Europa em 2008, para o tratamento de infecções complicadas do trato urinário e intra-abdominais (Zhanel et al., 2007; Morrill et al., 2015; Codjoe, Donkor, 2018).

Figura 2. Estrutura química de um carbapenêmico (imipenem)



Fonte: Dahiya et al., 2015.

A utilização dos carbapenêmicos de forma generalizado associado ao processo de seleção natural das bactérias levou ao surgimento de cepas de bactérias gram-negativas resistentes a esses antimicrobianos ao redor do mundo. Os mecanismos de resistência as carbapenêmicos incluem a mutação ou perda de porinas, presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) mutadas, com baixa afinidade aos carbapenêmicos, aumento da expressão de bombas de efluxo e hidrólise dos antimicrobianos por enzimas beta-lactamases. Além disso, a presença de múltiplos mecanismos de resistência inter-relacionados está associada a bactérias MDR que apresentam concentrações inibitórias mínimas altas para aos carbapenêmicos (Neves et al., 2011; Blair et al., 2014; Morrill et al., 2015).

2.4 CARBAPENEMASES

Nas últimas décadas, a dependência do uso de carbapenêmicos na clínica médica devido ao aumento da incidência de cepas produtoras de ESBL e AmpC e com resistência a antimicrobianos não beta-lactâmicos, acelerou o surgimento e disseminação da resistência a carbapenêmicos mediada por enzimas hidrolíticas. As beta-lactamases relacionadas à resistência aos carbapenêmicos são denominadas carbapenemases, enzimas que apresentam o maior espectro e potencial de hidrólise de beta-lactâmicos (Andrade, Darini, 2016; Codjoe, Donkor, 2018).

Até o início da década de 1990, acreditava-se que as carbapenemases eram codificadas apenas por genes cromossômicos em algumas espécies bacterianas, como L1 em *Stenotrophomonas maltophilia* e BcII em *Bacillus cereus*. Posteriormente, pesquisadores identificaram as enzimas IMP-1, oxacilinase-23 (OXA-23) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-1 codificadas por elementos genéticos móveis em cepas de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente. Essa descoberta despertou maior preocupação em organizações de saúde devido ao potencial de dispersão entre espécies

e disseminação clonal em infecções comunitárias e nosocomiais (Watanabe et al., 1991; Paton et al., 1993; Scaife et al., 1995; Andrade, Darini, 2016).

A partir da realização de estudos moleculares, as enzimas que hidrolisam carbapenêmicos foram classificadas em dois grupos: serina-carbapenemases, enzimas que possuem uma porção de serina no sítio ativo da molécula, e metalo-carbapenemases (metalo-beta-lactamases), enzimas que necessitam da ligação a um cofator metal para que exerçam sua atividade enzimática. As carbapenemases pertencem às classes A, B e D da classificação de Ambler para beta-lactamases. As serina-carbapenemases podem pertencer às classes A ou D de Ambler e são frequentemente encontradas em espécies de enterobactérias ou *Acinetobacter* spp. As metalo-carbapenemases que pertencem à classe B de Ambler são frequentemente encontradas em bacilos gram-negativos não fermentadores (Tabela 1) (Queenan, Bush, 2007; Dahiya et al., 2015; Codjoe, Donkor, 2018).

Yigit et al. (2001) descreveram a presença de uma enzima carbapenemase em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae*, coletado no ano de 1996 em um hospital do Estados Unidos, que apresentava altos níveis de resistência a imipenem e meropenem. Após análise do isolado, através de métodos fenotípicos e da biologia molecular, os pesquisadores afirmaram a existência de uma nova enzima beta-lactamase. A serina-carbapenemase, descrita por Yigit et al. (2001), não apresentava inibição quando exposta ao EDTA e era fracamente inibida pelo ácido clavulânico, dessa forma foi classificada no grupo A de Ambler e foi denominada de KPC-1. Posteriormente, pesquisadores descreveram no ano de 2003, a enzima KPC-2, que apresentava um único aminoácido variante em relação à KPC-1, resultando em uma mutação pontual (Yigit et al., 2001; Dahiya et al., 2015; Andrade, Darini, 2016).

Os genes que codificam enzimas serina-carbapenemases de classe A podem estar localizados no cromossomo, como os genes das enzimas SME, IMI e NMC-A, ou em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons), como os genes das enzimas KPC e GES. Além disso, o tratamento de infecções causadas por microrganismos que possuem genes que codificam enzimas carbapenemases no plasmídeo é extremamente difícil, devido à capacidade desses microrganismos apresentarem resistência a múltiplos fármacos (Andrade, Darini, 2016; Hsu et al., 2017).

As serina-carbapenemases da classe D de Ambler apresentam a capacidade de hidrolisar cloxacilina ou oxacilina e por isso são conhecidas como oxacilinases (enzimas OXA). Carbapenemases OXA são mais frequentemente descritas em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. e enterobactérias da Europa. Essas enzimas apresentam grande diversidade em seu potencial de hidrólise e são eficazes em hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de espectro

restrito e de espectro estendido, monobactâmicos e o imipenem (Dahiya et al., 2015; Codjoe, Donkor, 2018).

As metalo-beta-lactamases são inibidas *in vitro* pelo EDTA, quelante de metais, e são capazes de inibir o ácido clavulânico. Essas enzimas hidrolisam imipenem, penicilinas, cefalosporinas de espectro amplo e restrito, porém, não são capazes de hidrolisar o aztreonam. As primeiras metalo-beta-lactamases foram descritas no *Bacillus cereus*. No ano de 1990, pesquisadores descreveram a presença da enzima IMP, codificada por gene localizado em um plasmídeo conjugativo, em um isolado clínico de *P. aeruginosa* coletado de um hospital do Japão. Até o ano de 2009, as metalo-beta-lactamase frequentemente descritas eram IMP, Verona imipenemase (VIM), German imipenemase (GIM), Seul imipenemase (SIM) e São Paulo metalo-beta-lactamase (SPM), apresentando diferentes prevalências em vários países. SPM é relatada quase que exclusivamente no Brasil e sua incidência alarmante é quando descrita em cepas de *P. aeruginosa*, sendo responsável por altas taxas de morbimortalidade no território brasileiro (Neves et al., 2011; Andrade, Darini, 2016; Labarca et al., 2017).

Em 2009, pesquisadores descreveram a New Delhi metalo-beta-lactamase (NDM) em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Em seguida, vários outros estudos descreveram a presença de variantes dessa enzima em enterobactérias e bacilos não fermentadores em várias partes do mundo. Além disso, essas enzimas foram relatadas em infecções hospitalares, comunitárias, assim como em bactérias isoladas das águas de rios (Andrade, Darini, 2016; Hsu et al., 2017; Codjoe, Donkor, 2018).

Tabela 1. Classificação das enzimas carbapenemases.

Classe de Ambler	Grupo funcional	Enzimas	Inibidores	
			EDTA	Ác. clavulânico
A	2f	NMC	-	+
		IMI	-	+
		SME	-	+
		KPC	-	+
		GES	-	+
B	3	IMP	+	-
		VIM	+	-
		SIM	+	-
		GIM	+	-
		SPM	+	-
D	2d	NDM	+	-
		OXA	-	±

Fonte: Adaptado de Andrade, Darini, 2016.

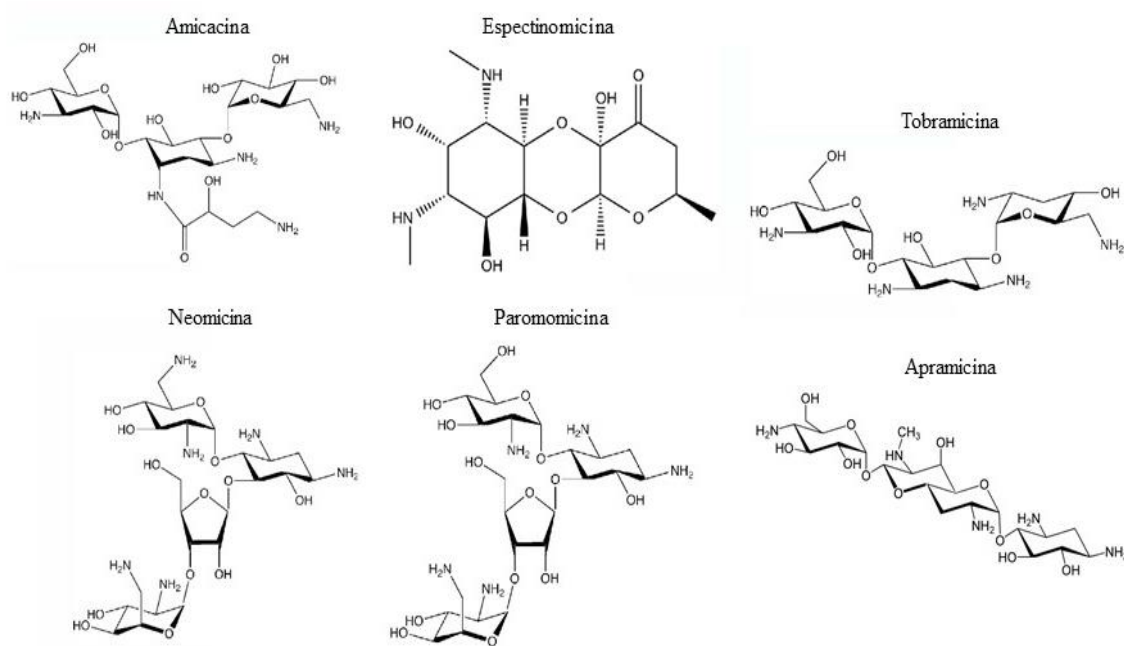
São descritas diversas metodologias que podem ser utilizadas na detecção laboratorial fenotípica das enzimas carbapenemases, dentre elas: focalização isoeletrica, disco-difusão, E-test, teste de Hodge, Carba NP, testes com discos de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina e métodos automatizados (Vitek®, Vitek 2®, Phoenix BD®). Porém, esses testes não são precisos na detecção das enzimas carbapenemases. Dessa forma, as técnicas de biologia moléculas são consideradas como padrão ouro para detecção dessas enzimas (Dahiya et al., 2015; Hsu et al., 2017).

2.5 AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas, desenvolvidos na década de 1940, derivados de substâncias antimicrobianas produzidas pelas bactérias *Streptomyces* e *Micromonospora*, encontradas no solo. Em geral, a estrutura química de um aminoglicosídeo consiste em um núcleo de aminociclitol (estreptamina, 2-desoxistreptamina ou estreptidina) ligado a amino açúcares. No entanto, alguns antibióticos são considerados aminoglicosídeos apesar de não apresentar conformidade com essa estrutura química, como a espectinomicina, que não apresenta amino açúcares ligados ao núcleo de aminociclitol. Esses antimicrobianos são agrupados em 3 tipos, de acordo com suas estruturas químicas: as 4,6-dissubstituídas 2-deoxiestreptaminas (DOS), onde estão incluídas amicacina, gentamicina e tobramicina, aminoglicosídeos utilizados amplamente na clínica médica, em formulações intravenosas ou nebulizadas, para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, gram-positivas e micobactérias atípicas, nas quais podem ser utilizadas em associação com outros fármacos para obtenção de atividade sinérgica; as 4,5-dissubstituídas DOS, como a neomicina e a paromomicina, utilizadas na clínica de forma limitada em razão da sua toxicidade, administradas por via oral ou tópica; as monossusbtituídas DOS, como a apramicina, utilizada para o tratamento de infecções bacterianas na clínica veterinária (Figura 3) (Avent et al., 2011; Becker, Cooper, 2013; Doi, Wachino, Arakawa, 2016).

A estreptomicina, descoberta em 1943 a partir do isolamento de cepas de *Streptomyces griseus*. foi o primeiro aminoglicosídeo desenvolvido e aplicado na prática clínica. Após o uso da estreptomicina no tratamento da tuberculose e de infecções por bactérias gram-negativas, foi possível observar uma alta eficácia de antimicrobianos aminoglicosídeos no tratamento de infecções bacterianas. Posteriormente, numerosos aminoglicosídeos foram identificados ou sintetizados e aprovados para uso clínico, (Becker, Cooper, 2013; Ramirez, Tolmasky, 2017).

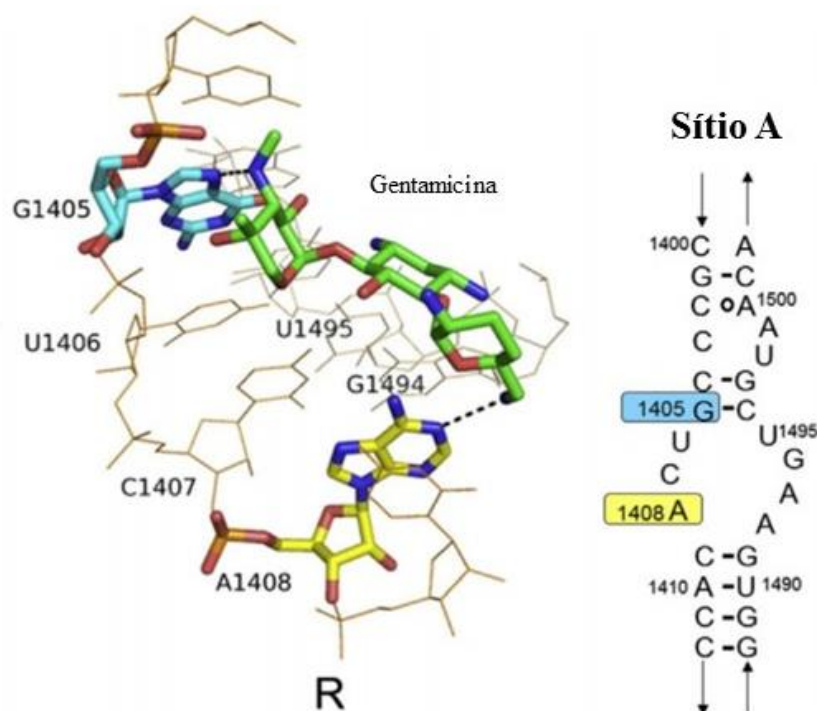
Figura 3. Estrutura química dos aminoglicosídeos representativos.



Fonte: Adaptado de Ramirez, Tolmasky, 2017.

Os aminoglicosídeos penetram nas células bacterianas através do mecanismo conhecido como “*self-promoted uptake*”. Esses fármacos ligam-se a compostos aniônicos presentes na superfície celular, que podem ser lipopolissacarídeos, fosfolipídios, ácidos teicóicos e proteínas da membrana externa. As interações com esses compostos são capazes de desencadear o aumento da permeabilidade da membrana plasmática externa da célula bacteriana, resultando na entrada das moléculas de aminoglicosídeos no espaço periplasmático. Posteriormente, os aminoglicosídeos são carregados para o citoplasma da célula através da participação de sistemas transportadores de elétrons. No citoplasma, esses antimicrobianos ligam-se ao sítio de reconhecimento aminoacil-RNAt (Sítio A) do RNAr 16S (Figura 4), que constitui a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, conduzindo à inibição da síntese de proteínas e consequentemente à morte da célula (Garneau-Tsodikovaa, Labby, 2016; Ramirez, Tolmasky, 2017).

Figura 4. Estrutura tridimensional do Sítio A do RNAr 16S ligado à gentamicina.



Fonte: Doi, Wachino, Arakawa, 2016.

A resistência bacteriana a todas as classes de antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, é considerada como um problema de saúde pública, principalmente quando associada a bactérias de interesse médico. Estudos descrevem uma incidência preocupante de resistência aos aminoglicosídeos em cepas de *P. aeruginosa* (Micek et al., 2015; Tada et al., 2017). Micek et al. (2015) realizou um estudo multicêntrico obtendo 740 isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes com pneumonia de hospitais da Itália, França, Alemanha, Espanha e Estados Unidos, no ano de 2013. O estudo demonstrou uma incidência de 226 (30,5%) de cepas de *P. aeruginosa* MDR. Além disso, das 226 cepas MDR, 66 (29,2%) foram susceptíveis aos aminoglicosídeos, enquanto entre as 505 cepas MDS, 460 (91,1%) demonstraram susceptibilidade aos aminoglicosídeos.

Existem diversos mecanismos associados à resistência aos aminoglicosídeos que atualmente são alvos de estudos, incluem: modificação enzimática e inativação dos aminoglicosídeos por aminoglicosídeo acetiltransferases, nucleotiltransferases ou fosfotransferases; aumento da expressão de bombas de efluxo; diminuição da permeabilidade da membrana bacteriana aos antimicrobianos e modificação da subunidade 30S dos ribossomos, essas modificações podem ocorrer pela substituição de nucleotídeos que codificam a subunidade 30S do ribossomo ou podem ser pós transcricionais. Mutações pontuais no gene

16S RNAr do ribossomo podem conduzir a resistência à estreptomicina em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Garneau-Tsodikovaa, Labby, 2016; Ramirez, Tolmasky, 2017).

2.6 RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS MEDIADA POR METILASES RNAR 16S

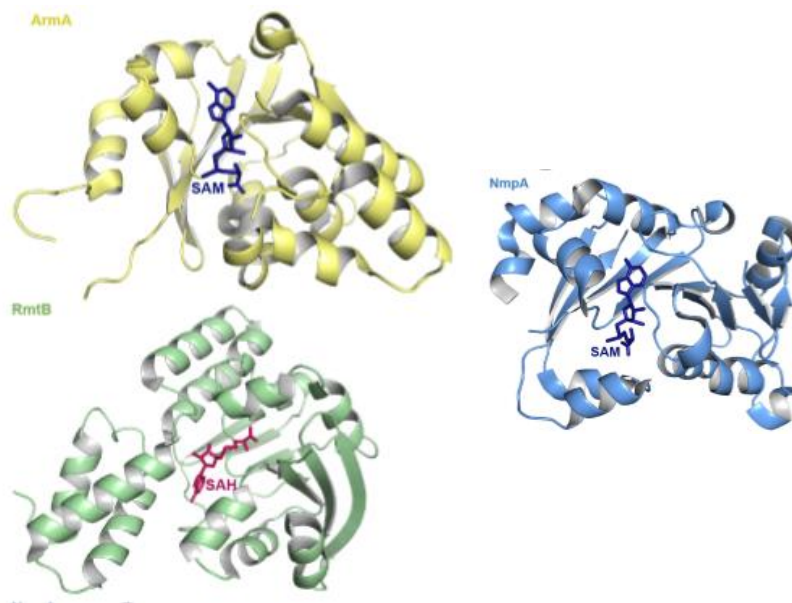
O sítio de ligação dos aminoglicosídeos pode sofrer modificações enzimáticas pós-transcricionais por metiltransferases ribossomais RNAr 16S (RMTases), também chamadas de metilases RNAr 16S. Essas enzimas são capazes de metilar nucleotídeos do sítio de ligação dos aminoglicosídeos, transformando em seus derivados 7-metila correspondentes. As RMTases (Figura 5) podem ser divididas em dois grupos distintos baseados em seus nucleotídeos alvos: metilases RNAr 16S N7-G1405 que conferem resistência às 4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas e as metilases RNAr 16S N1-A1408 que são capazes de conferir resistência aos 3 grupos de aminoglicosídeos. A metilação do DNA em bactérias tem como função o controle de numerosos processos, incluindo a replicação, regulação da transcrição e transposição e o reparo do DNA (Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Garneau-Tsodikovaa, Labby, 2016).

As RMTases ocorrem naturalmente nos actinomicetos, o grupo bacteriano do qual os aminoglicosídeos foram originados, com o objetivo de proteger os seus ribossomos dos aminoglicosídeos que produzem de forma natural. Metilases RNAr 16S N7-G1405 intrínsecas são encontradas em ambos os gêneros *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp., enquanto que a metilase RNAr 16S N1-A1408 intrínseca são identificadas apenas no gênero *Streptomyces* spp. (Galimand, Courvalin, Lambert, 2012; Becker, Cooper, 2013; O'hara et al., 2013).

Acreditava-se que a presença das RMTases estava restrita aos microrganismos produtores de aminoglicosídeos, porém, RMTases codificadas por plasmídeos presentes em várias bactérias patogênicas foram relatadas desde 1996 (Garneau-Tsodikovaa, Labby, 2016; Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Tada et al., 2017).

Entre os microrganismos relatados com a presença de enzimas metilases RNAr 16S estão *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Galimand, Courvalin, Lambert, 2012; Becker, Cooper, 2013; O'hara et al., 2013; Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Ramirez, Tolmasky, 2017). Após os primeiros relatos de microrganismos patogênicos produtores de enzimas metilases RNAr 16S, o número de isolados clínicos de bactérias gram-negativas produtoras dessas enzimas aumentou gradualmente, além disso, foram reportadas novas enzimas RMTases em diversas partes do mundo (Tabela 2) (Becker, Cooper, 2013; O'hara et al., 2013).

Figura 5. Estruturas cristalinas das RMTases ArmA, RmtB e NpmA ligadas ao co-substrato S-adenisil-L-metionina (SAM).



Fonte: Garneau-Tsodikova, Labby, 2016.

Atualmente, são conhecidos 10 tipos de enzimas metilases RNAr 16S, são elas: ArmA, RmtA, RmtB (que inclui as variantes RmtB1 e RmtB2), RmtC, RmtD (que inclui as variantes RmtD1 e RmtD2), RmtE, RmtF, RmtF, RmtG, RmtH e NpmA (O'hara et al., 2013; Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Tada et al., 2017). As enzimas Ribossomais Metiltransferases (RMs) N7-G1405 apresentam de modesta a alta semelhança entre si nas suas sequências de aminoácidos. No entanto, somente uma enzima metilase RNAr 16S N1-A1408 foi descrita até o momento, denominada RNAr adenina N-1-metiltransferase (NpmA) (Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Tada et al., 2017).

Tabela 2. Enzimas metilases RNAr 16S envolvidas na resistência aos aminoglicosídeos, ano, local e espécie do primeiro relato em humanos.

Enzimas Metilases RNAr 16S	Microrganismo (1º isolamento)	País	Ano ¹	Referências
ArmA (Aminoglicosídeo Resistência Metiltransferase)	<i>Citrobacter freundii</i>	Polônia	1996	Golebiewski et al., 2007
RmtA (Ribossomal Metiltransferase A)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	1997	Yokoyama et al., 2003
RmtB (Ribossomal Metiltransferase B)	<i>Serratia marcescens</i>	Japão	2002	Doi et al., 2004
RmtC (Ribossomal Metiltransferase C)	<i>Proteus mirabilis</i>	Japão	2003	Wachino et al., 2006
RmtD (Ribossomal Metiltransferase D)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	2005	Doi et al., 2005
RmtE (Ribossomal Metiltransferase E)	<i>Escherichia coli</i>	EUA	2013	Lee et al., 2014
RmtF (Ribossomal Metiltransferase F)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	França	2011	Galimand, Courvalin, Lambert, 2012
RmtG (Ribossomal Metiltransferase G)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	2010/ 2011	Bueno et al., 2013
RmtH (Ribossomal Metiltransferase H)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	2009	O'hara et al., 2013
NpmA (RNAr adenina N-1- metiltransferase)	<i>Escherichia coli</i>	Japão	2003	Wachino et al., 2007

Ano¹: ano do primeiro isolamento; RNAr: ácido ribonucleico ribossômico; EUA: Estados Unidos da América.

Apramicina e neomicina são citados como os únicos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos que ainda possuem atividade frente a microrganismos produtores de enzimas RMTases N7-G1405, porém, esses antimicrobianos não apresentam atividade frente às enzimas RMTases N1-A1408 intrínsecas (Becker, Cooper, 2013; Doi, Wachino, Arakawa, 2016).

Os dados de prevalência das RMTases em bactérias gram-negativas permanecem escassos, alguns estudos descrevem uma prevalência de 1% em isolados clínicos de enterobactérias da Europa, Japão e Argentina. Entretanto, estudos descrevem prevalências alarmantes, variando de 2,8% a 37%, em isolados clínicos de enterobactérias de países da Ásia, como China, Índia e Coreia (Al-Sheikh et al., 2014; Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Tada et al., 2017). Al-Sheikh et al. (2014) avaliaram a prevalência de RMTases em isolados clínicos de enterobactérias, coletados de um hospital da Arábia Saudita no ano de 2011, e descreveu uma

prevalência de 37% de isolados clínicos produtores de metilases RNAr 16S através da realização de testes de biologia molecular para pesquisa dos genes dessas enzimas.

Além disso, estudos descrevem a coocorrência de genes de enzimas metilases RNAr 16S com ESBLs e carbapenemases em bacilos gram-negativos de interesse médico (Tabela 3). O gene *armA* é frequentemente descrito em Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase do tipo NDM. Logo após a descrição do primeiro caso da NDM-1, estudos relataram a ocorrência de resistência aos aminoglicosídeos 4,6-dissubstituídas DOS em cepas produtoras dessa enzima e de suas variantes. A investigação dos plasmídeos que carregavam os genes *bla_{NMD}* demonstrou que os genes de metilases RNAr 16S, especialmente *armA*, *rmtB*, *rmtC*, e *rmtF*, estão frequentemente inseridos nos mesmos plasmídeos. Além disso, o gene *armA* foi posteriormente descrito em isolados clínicos de *P. aeruginosa* carregando o gene *bla_{IMP-1}* e *K. pneumoniae* carregando o gene *bla_{KPC}*. (Gurung et al., 2010; Doi, Wachino, Arakawa, 2016).

A primeira identificação do gene *rmtD* ocorreu no Brasil, em um isolado clínico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1, desde então o gene *rmtD* foi somente reportado em países da América do Sul. Posteriormente, foi identificado em um isolado clínico de *K. pneumoniae* a coocorrência dos genes *rmtD1* ou *rmtD2* e *bla_{KPC-2}*. Além disso, estudos descrevem uma alta prevalência da coocorrência de metilases RNAr 16S e cefalosporinases, que podem ser encontradas inseridas nos mesmos ou em diferentes plasmídeos (Doi et al., 2007; Lincopan et al., 2010; Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Tada et al., 2017).

A prevalência dos genes de resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos varia em diferentes locais do mundo, além disso, o tempo também é um fator influenciador no perfil de resistência bacteriana, principalmente em bactérias gram-negativas, em que o processo de conjugação é capaz de compartilhar informações genéticas entre microrganismos de diferentes espécies. Neste contexto, estudos moleculares são responsáveis por enfatizar a importância da implementação de procedimentos para controlar a disseminação dos mesmos em ambientes hospitalares e apoiar a busca por novas abordagens terapêuticas frente às cepas resistentes (Lincopan et al., 2010; Garneau-Tsodikovaa, Labby, 2016; Ramirez, Tolmasky, 2017).

Tabela 3. Enzimas metilases RNAr 16S e coocorrência com enzimas beta-lactamases.

Metilases RNAr 16S	Espécies comuns	Co-resistência comum	Prevalência	Distribuição
ArmA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	CTX-M ESBL NDM carbapenemase OXA-23 carbapenemase	Alta em <i>A. baumannii</i> Alta em produtores de NDM	Mundial
RmtA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	Baixa	Japão, Coréia
RmtB	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M ESBL NDM carbapenemase	Alta na China Alta em produtores de NDM	Mundial
RmtC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	NDM carbapenemase	Alta em produtores de NDM	Índia, Reino Unido
RmtD	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CTX-M ESBL KPC carbapenemase	Baixa	América do Sul
RmtE	<i>Escherichia coli</i>	CMY-2 AmpC	Muito baixa	Estados Unidos
RmtF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM carbapenemase	Alta em produtores de NDM	Índia, Reino Unido
RmtG	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M ESBL KPC carbapenemase	Baixa	América do Sul
RmtH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M ESBL	Muito baixa	Iraque
NpmA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter spp.</i>	—	Muito baixa	Japão, Arábia Saudita

Fonte: adaptado de Doi, Wachino, Arakawa, 2016.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital público de Recife, coletados nos anos de 2018 e 2019, a concentração inibitória mínima (CIM) dos aminoglicosídeos e carbapenêmicos frente a esses isolados, a ocorrência e frequência de genes de enzimas carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{NDM}*) e de enzimas metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG*) e o perfil clonal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital de Recife, obtidos durante os anos de 2018 e 2019, frente aos antimicrobianos;
- Determinar as CIMs dos aminoglicosídeos e carbapenêmicos frente a isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- Pesquisar a ocorrência e frequência dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP}* em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos;
- Verificar a ocorrência e frequência de genes de enzimas metilases RNAr 16S (*armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG*) em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos aminoglicosídeos;
- Determinar o perfil clonal, através de ERIC-PCR, dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital de Recife, obtidos durante os anos de 2018 e 2019.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DE ESTUDO

Este trabalho corresponde a um estudo descritivo de base laboratorial. Através deste, foram obtidos dados concernentes do perfil de resistência aos antimicrobianos, da ocorrência de genes de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos, mediada por metilases RNAr 16S, e a relação clonal de isolados clínicos de *P. aeruginosa*, obtidos em um hospital público localizado na Região Metropolitana de Recife-PE, entre os anos de 2018 a 2019.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

Os isolados clínicos da espécie *P. aeruginosa* foram obtidos do Laboratório de Microbiologia de um hospital público em Recife, Pernambuco, reisolados e analisados no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM) do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e no Setor de Microbiologia Clínica do Laboratório Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), nos quais foram realizados os testes moleculares e fenotípicos.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

As cepas bacterianas analisadas no estudo foram provenientes de pacientes de um hospital público de Recife-PE, onde foram coletadas amostras (n= 64) de diferentes regiões de 64 pacientes infectados por *P. aeruginosa*. Esses isolados foram fornecidos pelo Setor de Bacteriologia durante os anos de 2018 e 2019 e fazem parte do projeto de Comitê de Ética e Pesquisa com Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CAE: 0490.0.172.000-11).

4.4 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO

a) Variáveis relacionadas à infecção:

Isolados bacterianos de pacientes infectados: Os isolados clínicos foram cedidos pelo laboratório do hospital em estudo, identificados segundo critérios laboratoriais.

Multidroga resistência: Característica relacionada à capacidade de resistência do patógeno a três ou mais classes de antimicrobianos (CDC, 2013). Categorizado como 1. MDR, 2. Não MDR.

Sítio do material coletado: Tipo de material coletado para cultura bacteriana. Variável coletada no laudo do exame bacteriológico. Categorizado como 1. Aspirado traqueal, 2. Sangue, 3. Urina, 4. Ponta de cateter venoso central, 5. Outros.

b) Variáveis relacionadas à caracterização fenotípica dos microrganismos

Resistências aos carbapenêmicos: valores elevados de CIMs dos carbapenêmicos frente aos isolados clínicos de acordo com o CLSI (CLSI, 2019). Categorizado: 1. Presente, 2. Ausente.

Resistência aos aminoglicosídeos: valores elevados de CIMs dos aminoglicosídeos frente aos isolados clínicos de acordo com o CLSI (CLSI, 2019). Categorizado: 1. Presente. 2. Ausente.

c) Variáveis relacionadas à caracterização genética dos microrganismos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Variáveis relacionadas à caracterização genética da resistência aos carbapenêmicos.

Variável	Definição	Categorização
<i>bla_{KPC}</i>	Gene relacionado à resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC), identificado pela técnica de PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>bla_{SPM-1}</i>	Gene relacionado à resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima São Paulo Metallo-beta-lactamase (SPM), identificado pela técnica de PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>bla_{IMP}</i>	Gene relacionado à resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima Imipenemase (IMP), identificado pela técnica de PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>bla_{VIM}</i>	Gene relacionado à resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima Verona Imipenemase (VIM), identificado pela técnica de PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>bla_{NDM}</i>	Gene relacionado à resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima Nova Delhi Metallo-betalactamase, identificado pela técnica de PCR.	1. Presente 2. Ausente

Tabela 5. Variáveis relacionadas à caracterização genética da resistência ao aminoglicosídeos mediada por metilases RNAr 16S.

Variável	Definição	Categorização
<i>armA</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>Aminoglycoside Resistance Methyltransferase</i> (ArmA), identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtB</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>Ribosomal Methyltransferase</i> B (RmtB), identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtD</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>Ribosomal Methyltransferase</i> D (RmtD), identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtF</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>Ribosomal Methyltransferase</i> F (RmtF), identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>rmtG</i>	Gene relacionado à resistência aos aminoglicosídeos mediada pela metilase RNAr 16S <i>Ribosomal Methyltransferase</i> G (RmtG), identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente

4.5 TÉCNICAS LABORATORIAIS EMPREGADAS

4.5.1 Isolados Bacterianos

A identificação dos isolados e a análise da susceptibilidade foram realizadas utilizando o sistema automatizado BD Phoenix™ (Becton Dickinson, United States), onde foram testados os antimicrobianos: amicacina (AMI), gentamicina (GEN), meropenem (MER), imipenem (IMP), cefepime (CPM), aztreonam (AZT), piperacilina-tazobactam (PPT), levofloxacina (LVX) e ciprofloxacina (CIP). Isolados com resistência a pelo menos três classes de fármacos de uma variedade de classes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes (MDR), e os isolados que mostraram resistência a duas ou menos classes de antimicrobianos foram considerados sensíveis a múltiplos fármacos (MDS). Posteriormente, os isolados foram enviados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, onde foram conservadas em glicerol e mantidas a -20 °C. Essas bactérias foram reativadas em tubos de ensaio contendo meio caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubadas por 48 horas em estufa a 37 °C, semeadas em ágar cetrimida e colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas para análise. Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) da tobramicina e polimixina B, através da microdiluição em caldo, conforme os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2019).

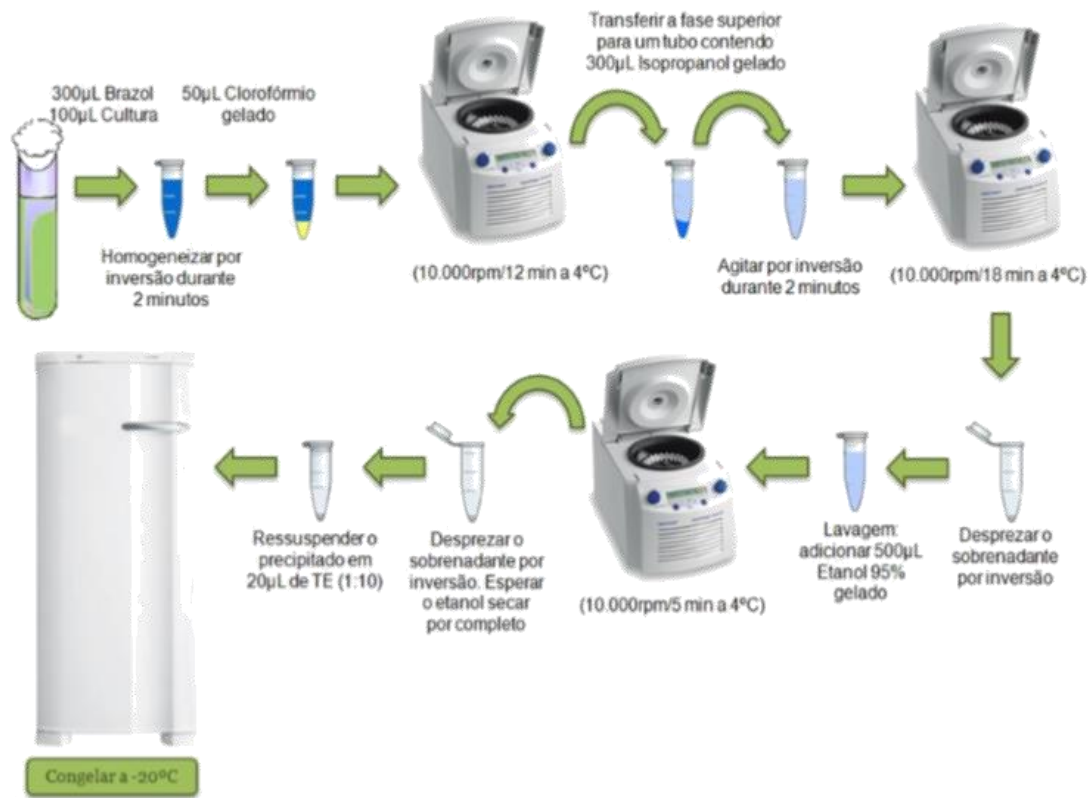
Para a determinação da CIM, foram utilizadas placas com 96 poços, nos quais foi distribuído o meio caldo Müller Hinton cátions ajustados (CAMHB), em seguida foi realizada a diluição das soluções dos antimicrobianos e por último foram adicionadas, nas colunas correspondentes a cada isolado, alíquotas das suspensões bacterianas. As suspensões bacterianas foram preparadas em NaCl 0,9%, utilizando-se as colônias dos isolados que foram previamente semeadas em MHA. As suspensões bacterianas foram ajustadas no 0,5 da escala de MacFarland, diluídas e depositadas nos poços, para a obtenção de uma concentração final de $2-5 \times 10^5$ UFC/poço. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 20 a 24 h (CLSI, 2019). Foram avaliadas as concentrações de 0,5 a 516 µg/mL da tobramicina e de 0,125 a 32 µg/mL da polimixina B. Como controles foram utilizadas as cepas a *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* NCTC 13846. Todas as amostras foram testadas em triplicata. As placas serão incubadas a 35 ± 2 °C, durante 20 a 24 horas (CLSI, 2019).

Para a realização da leitura, foram utilizados a resazurina, um corante de viabilidade celular, e espectrofotometria utilizando leitor de placa de 96 poços (Multiskan FC – Thermo Scientific). Após a incubação das placas de microdiluição foram adicionados 20 µL de resazurina a 0,01% em cada poço e as placas foram incubadas novamente por 1 hora a 35 ± 2 °C. Caso vista a mudança da cor do poço de azul fracamente fluorescente para uma cor rosa com alta fluorescência, o ensaio de viabilidade foi considerado positivo para crescimento bacteriano. A interpretação dos valores das CIMs foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2019).

4.5.2 Extração do DNA total

Após a incubação das colônias em caldo Luria Bertani (LB) a 35 °C durante 24 horas, foi realizada a extração do DNA total de todos os isolados. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido pelo fabricante (Figura 6). O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm e estocados a -20 °C.

Figura 6. Representação esquemática da extração do DNA total por meio do Kit Brazol.



Fonte: Jacomé, 2011.

4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

PCR dos genes de beta-lactamases

Durante a realização das PCRs dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP}* foram utilizados os primers descritos por Poirel et al. (2011) e Jacomé et al. (2016) (Tabela 6). Para a detecção de cada um dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo. Para o gene *bla_{KPC}* cada reação de amplificação incluiu: 5 ng de DNA genômico (0,5 µL), 25 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 5x tampão (5 µL), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 2,0 U Taq DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura. Para os genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP}* cada reação de amplificação incluiu: 25 ng de DNA genômico (1 µL), 10 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 1x tampão (1 µL), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec) (0,6 µL), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 µL) e 1,0 U Taq DNA polimerase (Promega) (0,4 µL) e água ultrapura (Jacomé et al., 2016).

As reações de amplificação para os genes de beta-lactamases foram realizadas no termociclador (Biosystems) nas seguintes condições, descritas por Jacomé et al. (2016): desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos (*bla_{KPC}*) ou 35 ciclos (*bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP}*) de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento de acordo com a temperatura descrita no primer (*bla_{KPC}* 63 °C; *bla_{NDM}* 60 °C, *bla_{VIM}* 56,8 °C; *bla_{SPM-1}* 55,3 °C e *bla_{IMP}* 50,6 °C) por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os controles positivos utilizados no presente estudo foram cepas do estudo de Jacomé et al. (2016).

PCR dos genes de metilases RNAr 16S

Para os genes *armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*, e foram utilizados os primers descritos por Davis et al. (2010), Berçot; Poirel; Nordmann (2011), Hidalgo et al. (2013), Bueno et al. (2013) (Tabela 7). Para a detecção de cada um dos referidos genes, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL para cada tubo. Cada reação incluiu: 10 ng de DNA total (1 µL), 10 pmol de cada *primer* (1 µL para cada *primer*), 8 mM de dNTP (0,6 µL), 5x tampão (5 µL), 25 mM de MgCl₂ (2,0 µL) e 5 U de Taq DNA polimerase (0,2 µL).

As reações de amplificação para os genes *rmtD*, *rmtF*, *rmtG* foram realizadas no termociclador (Biosystems) nas seguintes condições, descritas por Berçot; Poirel; Nordmann (2011): desnaturação inicial a 95 °C durante três minutos; seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C na etapa de desnaturação, 30 segundos a 55 °C na etapa de anelamento e 30 segundos a 72 °C na etapa de extensão; seguidos por uma única etapa de alongamento final a 72 °C durante cinco minutos. Para os genes *armA* e *rmtB* as condições foram as mesmas, exceto a temperatura de anelamento, para estes genes foi de 52 °C. Os controles positivos utilizados no presente estudo foram cepas do estudo de Pereira et al. (2020), os quais foram cedidos pelo pesquisador do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Pernambuco, PhD Danilo Elias Xavier, e foi incluído um controle negativo, correspondente a um tubo contendo todos os componentes da mistura ao qual não foi adicionado DNA molde. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Esses produtos foram corados com *blue-green*, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Tabela 6. *Primers* utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de enzimas carbapenemases.

Genes	Sequência	Fragmento (pb)	Referência
<i>bla_{SPM-1}</i>	F (5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3') R (5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3')	650	Jacomé et al., 2016
<i>bla_{IMP}</i>	F (5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3') R (5'-GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT-3')	361	Jacomé et al., 2016
<i>bla_{VIM}</i>	F (5'-CAGATTGCCGATGGTGTTTGG-3') R (5'-AGGTGGGCCATTCAGCCAGA-3')	523	Jacomé et al., 2016
<i>bla_{KPC}</i>	F (5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3') R (5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3')	1011	Jacomé et al., 2016
<i>bla_{NDM}</i>	F(5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3) R(5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3)	621	Poirel et al., 2011

F: forward, R: reverse, pb: pares de base.

Tabela 7. *Primers* utilizados para a pesquisa dos genes codificadores de metilases RNAr 16S.

Genes	Sequência	Fragmento (pb)	Referência
<i>armA</i>	F (5'-ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC-3') R (5'-ATCTCAGCTCTATCAATATCG-3')	101	Berçot, Poirel, Nordman, 2011
<i>rmtB</i>	F (5'-ACTTTTACAATCCCTCAATAC-3') R (5'-AAGTATATAAGTTCTGTTC-3')	171	Berçot, Poirel, Nordman, 2011
<i>rmtD</i>	F (5'-GGAAAAGGACGTGGACA-3') R (5'-TCCATCGATTCCACAGG-3')	171	Berçot, Poirel, Nordman, 2011
<i>rmtF</i>	F (5'-GCGATACAGAAAACCGAAGG-3') R (5'-ACCAGTCGGCATAGTGCTTT-3')	589	Hidalgo et al., 2013
<i>rmtG</i>	F (5'-AAATACAGCGATGTGTGTCC-3') R (5'-ACACGGCATCTGTTTCTTCC-3')	250	Bueno et al., 2013

F: forward, R: reverse, pb: pares de base.

4.5.4 Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR)

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTG AGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da

enzima *Taq* DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com *Blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (Duan et al., 2009).

4.5.5 Sequenciamento

O produto de PCR dos genes foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente purificado através do kit de purificação de DNA Wizard (SV gel e PCR clean-up System) (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação o fragmento de DNA foi levado ao sequenciamento através do método de terminação em cadeia de Sanger. Este apresentou resultado satisfatório e as sequências de nucleotídeos foram confrontadas com as sequências disponíveis em bancos de dados, usando os algoritmos BlastN e BlastX BlastNetwork disponíveis no NCBI (Lima et al., 2018).

4.5.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Epi-Info (v. 7). A descrição da amostra foi feita por meio de cálculo de frequência com intervalo de confiança de 95% (IC95%) para as variáveis categóricas e de mediana para as variáveis numéricas.

5 RESULTADOS

5.1 EMERGÊNCIA DO GENE *rmtD1* EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PORTADORES DOS GENES *bla*_{KPC} E/OU *bla*_{VIM-2} NO BRASIL

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo não fermentador de grande importância clínica devido à sua distribuição global, alta prevalência em países em desenvolvimento, diversidade de fatores de virulência e ao amplo espectro de resistência. As características genéticas desse microrganismo incentivam as pesquisas de genes de resistência bacteriana e relação clonal entre isolados de *P. aeruginosa* de pacientes hospitalizados (Silva-Júnior et al., 2017; Siqueira et al., 2018; Vaez et al., 2018). Os carbapenêmicos e aminoglicosídeos estão entre as principais classes de fármacos utilizadas no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, em muitos casos esses antimicrobianos são utilizados em associação para alcançar um esquema terapêutico eficaz. Porém, cepas de *P. aeruginosa* que carregam genes que codificam enzimas de resistência a ambos os fármacos estão cada vez mais emergentes. A prevalência dos genes de resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos varia em diferentes locais do mundo, além disso, o tempo também é um fator influenciador no perfil de resistência bacteriana, principalmente em bactérias gram-negativas, em que o processo de conjugação é capaz de compartilhar informações genéticas entre microrganismos de diferentes espécies (Lincopan et al., 2010; Garneau-Tsodikovaa, Labby, 2016; Ramirez, Tolmasky, 2017; Urbanowicz et al., 2019).

Estudos realizados no Brasil, que avaliaram a presença dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtG* e *rmtD*, por Doi et al. (2007), Fristsche et al. (2008), Bueno et al., (2013) e Quiles et al. (2015) relataram a primeira ocorrência dos genes *rmtD*, *rmtB*, *rmtG* e *armA*, respectivamente, em isolados clínicos de enterobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores. A primeira identificação do gene *rmtD* ocorreu em um isolado clínico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 (Doi et al., 2007). Posteriormente, foi identificado em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* a coocorrência dos genes *rmtD1* ou *rmtD2* e *bla*_{KPC-2} (Bueno et al., 2013).

As principais enzimas de resistência descritas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* são IMP, VIM, SPM e KPC. SPM é relatada quase que exclusivamente no Brasil, sendo responsável por altas taxas de morbimortalidade no território brasileiro (Neves et al., 2011; Andrade, Darini, 2016; Labarca et al., 2017). Os dados de prevalência das RMTases em bactérias gram-negativas permanecem escassos, alguns estudos descrevem uma prevalência de 1% em isolados clínicos

de enterobactérias da Europa, Japão e Argentina. Entretanto, estudos descrevem prevalências alarmantes, variando de 2,8% a 37%, em isolados clínicos de enterobactérias de países da Ásia, como China, Índia e Coreia (Al-Sheikh et al., 2014; Doi, Wachino, Arakawa, 2016; Tada et al., 2017).

Estudos epidemiológicos moleculares são essenciais para a detecção da origem e da disseminação de microrganismos, com a finalidade de desenvolver estratégias preventivas para controlar a transmissão de bactérias entre os pacientes. Além disso, a partir das ferramentas de genotipagem bacteriana é possível evidenciar as relações entre microrganismos de mesma espécie em determinada área geográfica durante um período de tempo determinado (Jacomé et al., 2016; Tabak et al., 2019).

Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital de Recife-PE, Brasil, quanto à presença de genes de enzimas carbapenemases e metilases RNAr 16S e o perfil de disseminação clonal desses isolados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados Bacterianos

Foram analisados 64 isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes internados em um hospital público de Recife-PE, Brasil, entre os anos de 2018 e 2019. De acordo com os critérios de inclusão e perfil de susceptibilidade dos microrganismos, 34 foram selecionados para a realização dos testes fenotípicos complementares e testes de caracterização molecular. Foram considerados como critério de exclusão amostral: amostras de vigilância, amostras repetidas do mesmo paciente e isolados clínicos sensíveis a carbapenêmicos e/ou aminoglicosídeos.

Identificação e perfil de susceptibilidade

A identificação dos isolados e a análise da susceptibilidade foram inicialmente realizadas utilizando o sistema automatizado BD Phoenix™ (Becton Dickinson, United States), onde foram testados os antimicrobianos: amicacina (AMI), gentamicina (GEN), meropenem (MER), imipenem (IMP), cefepime (CPM), aztreonam (AZT), piperacilina-tazobactam (PPT), levofloxacina (LVX) e ciprofloxacina (CIP). Posteriormente, os isolados foram enviados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, onde foram mantidos congelados em glicerol a -20 °C na coleção bacteriana do laboratório. Essas bactérias foram reativadas em tubos de ensaio contendo meio caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubadas a 37 °C por 48

horas em estufa, semeadas em ágar cetrímida e colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas para análise. Foram determinadas as CIMs da tobramicina e polimixina B, através da microdiluição em caldo, conforme os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2019).

Para a determinação da CIM, foram utilizadas placas com 96 poços, nos quais foi distribuído o meio caldo Müller Hinton cátions ajustados (CAMHB), em seguida foi realizada a diluição das soluções dos antimicrobianos e por último foram adicionadas, nas colunas correspondentes a cada isolado, alíquotas das suspensões bacterianas. As suspensões bacterianas foram preparadas em NaCl 0,9%, utilizando-se as colônias dos isolados que foram previamente semeadas em MHA. As suspensões bacterianas foram ajustadas no 0,5 da escala de MacFarland, diluídas e depositadas nos poços, para a obtenção de uma concentração final de $2-5 \times 10^5$ UFC/poço. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 20 a 24 h (CLSI, 2019). Foram avaliadas as concentrações de 0,5 a 516 µg/mL da tobramicina e de 0,125 a 32 µg/mL da polimixina B. Como controles foram utilizadas as cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* NCTC 13846. Todas as amostras foram testadas em triplicata. As placas serão incubadas a 35 ± 2 °C por 20 a 24 horas (CLSI, 2019).

Para a realização da leitura, foram utilizados a resazurina, um corante de viabilidade celular, e espectrofotometria utilizando leitor de placa de 96 poços (Multiskan FC, Thermo Scientific). Após a incubação das placas de microdiluição foram adicionados 20 µL de resazurina a 0,01% em cada poço e as placas foram incubadas novamente por 1 hora a 35 ± 2 °C. Caso vista a mudança da cor do poço de azul fracamente fluorescente para uma cor rosa com alta fluorescência, o ensaio de viabilidade era considerado positivo para crescimento bacteriano. A interpretação dos valores das CIMs foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2019).

Extração do DNA total

Após a incubação das colônias em caldo Luria Bertani (LB) a 35 °C durante 24 horas, foi realizada a extração do DNA total de todos os isolados. Essa extração foi efetuada por meio do Kit Brazol (LGC-Biotecnologia), conforme o protocolo oferecido pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação para os genes de β -lactamases foram realizadas no termociclador (Biosystems) nas condições e utilizando os primers descritos por Jacomé et al. (2016) para os genes *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP}*, e nas condições e primers descritos por Poirel et al. (2011) para o gene *bla_{NDM}*. Cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 μ L para cada tubo. Para o gene *bla_{KPC}* cada reação de amplificação incluiu: 5 ng de DNA genômico (0,5 μ L), 25 pmol de cada *primer* (1 μ L para cada *primer*), 5x tampão (5 μ L), 200 μ M de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec) (0,6 μ L), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 μ L) e 2,0 U Taq DNA polimerase (Promega) (0,4 μ L) e água ultrapura. Para os genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP}* cada reação de amplificação incluiu: 25 ng de DNA genômico (1 μ L), 10 pmol de cada *primer* (1 μ L para cada *primer*), 1x tampão (1 μ L), 100 μ M de dNTP (Ludwig Biotec) (0,6 μ L), 1,5 mM MgCl₂ (1,5 μ L) e 1,0 U Taq DNA polimerase (Promega) (0,4 μ L) e água ultrapura. Os controles positivos utilizados no presente estudo foram cepas do estudo de Jacomé et al. (2016).

O ensaio de PCR para os genes de metilases RNAr 16 S *armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF* e *rmtG*, foram realizados de acordo com os primers e condições descritas por Davis et al. (2010), Berçot; Poirel; Nordmann (2011), Hidalgo et al. (2013). Cada reação incluiu: 10 ng de DNA total (1 μ L), 10 pmol de cada *primer* (1 μ L para cada *primer*), 8 mM de dNTP (0,6 μ L), 5x tampão (5 μ L), 25 mM de MgCl₂ (2,0 μ L) e 5 U de Taq DNA polimerase (0,2 μ L).

Os controles positivos utilizados no presente estudo foram cepas do estudo de Pereira et al. (2020), os quais foram cedidos pelo pesquisador do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Pernambuco, PhD Danilo Elias Xavier, e foi incluído um controle negativo, correspondente a um tubo contendo todos os componentes da mistura ao qual não foi adicionado DNA molde.. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Esses produtos foram corados com *blue-green*, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Sequenciamento

O produto de PCR dos genes foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente purificado através do kit de purificação de DNA Wizard (SV gel e PCR clean-up System) (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação o fragmento de DNA foi levado ao sequenciamento através do método de terminação em cadeia de Sanger. Este apresentou resultado satisfatório e as sequências de nucleotídeos foram confrontadas com as

sequências disponíveis em bancos de dados, usando os algoritmos BlastN e BlastX BlastNetwork disponíveis no NCBI (Lima et al., 2018).

Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR)

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3']), Tampão 1x, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com *Blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (Duan et al., 2009).

RESULTADOS

De um total de 64 isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital terciário de Recife-PE, Brasil, obtidos entre os anos de 2018 e 2019, 53,1% (34/64) foram caracterizados como MDR, enquanto 46,9% (30/64) eram MDS. As amostras de secreção traqueal e urina foram as que apresentaram maior porcentagem de cepas MDR, 62% (13/21) e 57,1% (8/14), respectivamente (Tabela 8). Dentre os 64 isolados, apenas 34 isolados foram selecionados para a determinação das CIM da tobramicina e polimixina B e testes moleculares para a pesquisa de genes de enzimas β -lactamases e metilases RNAr 16S. Foram determinados como critérios de exclusão amostral, amostras de vigilância, amostras repetidas do mesmo paciente e isolados clínicos que não apresentaram resistência a um aminoglicosídeo ou carbapenêmico.

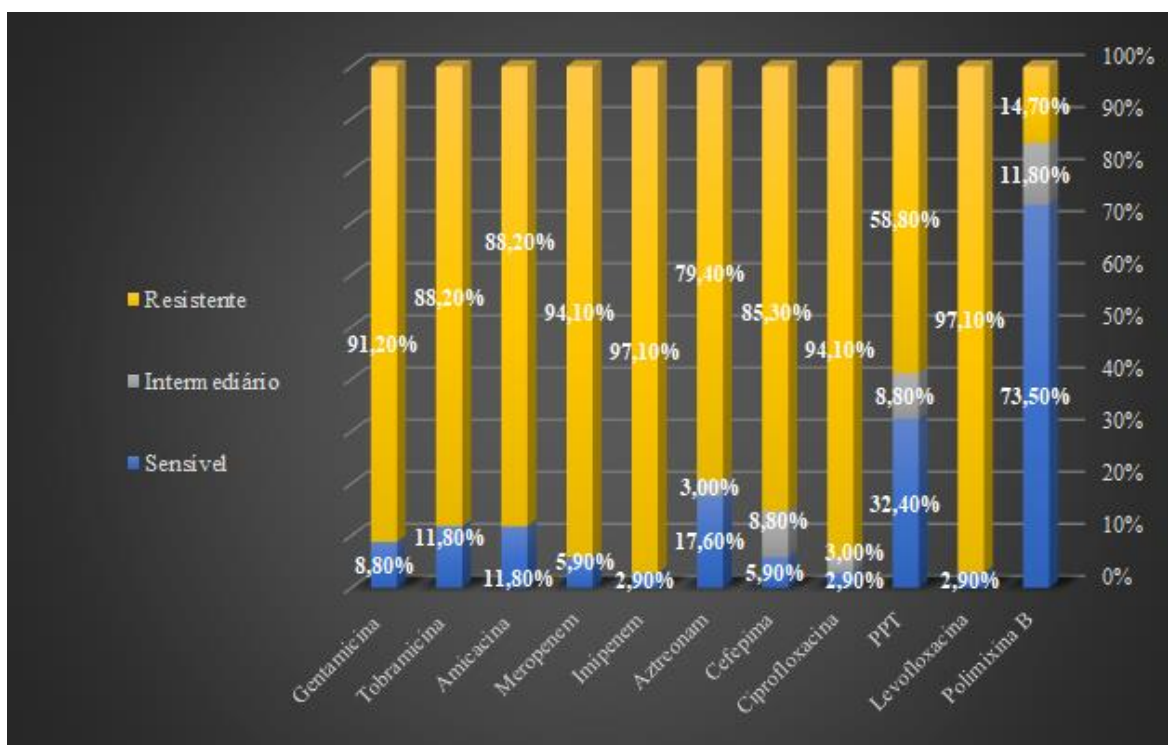
Tabela 8. Frequência de cepas multidroga-resistentes de *P. aeruginosa* nos locais de coleta dos isolados.

Perfil de resistência	Origem da amostra				
	Secreção Traqueal	Sangue	Urina	Ponta de Cateter	Outros
(%) MDR	13/21 (62%)	4/11 (36,4%)	8/14 (57,1%)	2/4 (50%)	7/14 (50%)
(%) Não-MDR	8/21 (38%)	7/11 (63,3%)	6/14 (42,9%)	2/4 (50%)	7/14 (50%)

MDR: multidroga-resistentes

Dentre os 34 isolados, 88% (30/34) apresentaram resistência à tobramicina, 11,8% (4/34) susceptibilidade intermediária à poliximina B e 14,7% (5/34) demonstraram resistência à polimixina B, seguindo padronização do CLSI (CLSI, 2019). Os maiores percentuais de isolados resistentes foram observados frente aos antimicrobianos imipenem (97,1%) e levofloxacina (97,1%), enquanto que os fármacos que demonstraram serem os mais efetivos foram a polimixina B (75,3%) e a piperacilina/tazobactam (32,4%) (Figura 7). Dentre todos os isolados, 5,9% (2/34) foram caracterizados como microrganismos pan-resistentes, pois demonstraram resistência frente a todos os antimicrobianos testados.

Figura 7. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital em Recife-PE, durante o período 2018 a 2019.



PPT: piperacilina-tazobactam

Das cepas selecionadas para os testes moleculares, 97% (33/34) apresentaram resistência a imipenem e/ou meropenem. Dentre os 33 isolados analisados quanto a presença dos genes de resistência a β -lactâmicos *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP}, 33,3% (11/33) dos isolados carregavam o gene *bla*_{KPC} e 39,4% (13/33) dos isolados foram positivos para o gene *bla*_{VIM}. Após o alinhamento e análise do sequenciamento do produto de PCR do gene *bla*_{VIM} foi verificado que trata-se do gene *bla*_{VIM-2}. Não foi detectada a presença dos *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1} e

bla_{IMP} nos isolados analisados. Além disso, 91,2% (31/34) dos isolados clínicos apresentaram resistência a amicacina e/ou gentamicina e foram analisados quanto a presença dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*. Dentre esses genes, o gene *rmtD* foi identificado em 35,5% (11/31) das amostras. Após o alinhamento e análise do sequenciamento do produto de PCR do gene *rmtD* foi verificado que trata-se da variável *rmtD1* do gene. Os outros genes não foram detectados entre os isolados analisados. Oito isolados carregavam ambos os genes *bla_{KPC}* e *rmtD1*, enquanto a coocorrência dos genes *bla_{VIM-2}* e *rmtD1* foi detectada em 3 cepas e 1 isolado apresentou os genes *bla_{KPC}*, *bla_{VIM-2}* e *rmtD1* (Tabela 9).

A análise da ERIC-PCR dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* demonstrou a disseminação de 3 clones no hospital, C1, C2 e C3. Os isolados PA01, PA04 e PA16, apresentaram um único padrão de banda, demonstrado 100% de similaridade genética, nomeados de clone C1. Os isolados PA05 e PA19, apresentaram um único perfil na ERIC-PCR, denominado de C2. Os isolados PA15, PA46, PA50 e PA65, demonstraram 100% de similaridade genética, caracterizado como o perfil clonal C3. Os outros isolados apresentaram perfis genéticos distintos, nos quais os coeficientes de similaridade foram inferiores a 80% (Figura 8).

O perfil clonal C1 foi encontrado em isolados clínicos de pacientes lotados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e Coronariana (UCO), o perfil C2 em pacientes lotados na UTI e o perfil C3 em pacientes internados nas Unidades de Terapia intensiva e Cirurgia Geral. Esse resultado, sugere que houve uma disseminação entre unidades do hospital dos clones C1 e C3. A região de coleta de todos os isolados clínicos com os perfis de ERIC-PCR C1 e C2 foi secreção traqueal, enquanto as regiões de coleta de isolados clínicos do perfil C3 foram sangue, urina, ponta de cateter e secreção traqueal (Tabela 10).

Tabela 9. Tipo de amostra, perfil de susceptibilidade, genes de resistência e perfil da ERIC-PCR de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital público de Recife-PE, Brasil, coletados durante o período 2018 a 2019.

Isolado	Material	CIM (µg/mL)						Genes RMTases	Genes β-lactamases	ERIC
		AMI	GEN	TOB	IMP	MER	POL B			
PA01	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C1
PA03	Urina	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C4
PA04	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C1
PA05	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	4[I]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C2
PA07	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	4[I]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C5
PA09	Ponta de Cateter	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C6
PA10	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{VIM-2}</i> , <i>bla_{KPC}</i>	C7
PA11	Sec. Traqueal	8[S]	>8[R]	2[S]	1[S]	1[S]	1[S]	-	-	C8
PA13	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla_{KPC}</i>	C9
PA14	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>	C10
PA15	Sangue	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C3
PA16	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C1
PA18	Urina	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	8[R]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C11
PA19	Sec. Traqueal	8[S]	>8[R]	1[S]	>8[R]	>8[R]	4[I]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C2
PA33	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	-	-	C12
PA34	Urina	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	<i>rmtD1</i>	-	C13
PA41	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C14
PA43	Urina	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	-	C15
PA45	Urina	>32[R]	>8[R]	512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	-	C16
PA46	Ponta de Cateter	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	32[R]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C3
PA49	Urina	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C17
PA50	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C3
PA56	Sec. Úlcera	8[S]	2[S]	1[S]	>8[R]	1[S]	8[R]	-	-	C18
PA57	Urina	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	32[R]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C19
PA58	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C20
PA60	Urina	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C21
PA65	Urina	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0,5[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{KPC}</i>	C3
PA69	Sangue	8[S]	4[S]	2[S]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C22
PA73	Sangue	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	<i>bla_{KPC}</i>	C23
PA74	Sangue	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C24
PA78	Urina	>32[R]	>8[R]	512[R]	>8[R]	>8[R]	32[R]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C25
PA80	Sec. de Ferida	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>	C26
PA81	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla_{KPC}</i>	C27
PA82	Sec. Traqueal	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	4[I]	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	C28

PA: *Pseudomonas aeruginosa*; R: resistente; I: intermediário; S: sensível; ERIC: consenso intergênico repetitivo enterobacteriano; CIM; concentração inibitória mínima; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; IMP: imipenem; MER: meropenem; POL B: polimixina B.

Figura 8. Padrões do Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital público de Recife-PE, Brasil, coletados durante o período 2018 a 2019. Na coluna da esquerda: o coeficiente de similaridade das amostras. No meio, a identificação dos isolados. Na coluna da direita: o padrão das bandas da ERIC-PCR.

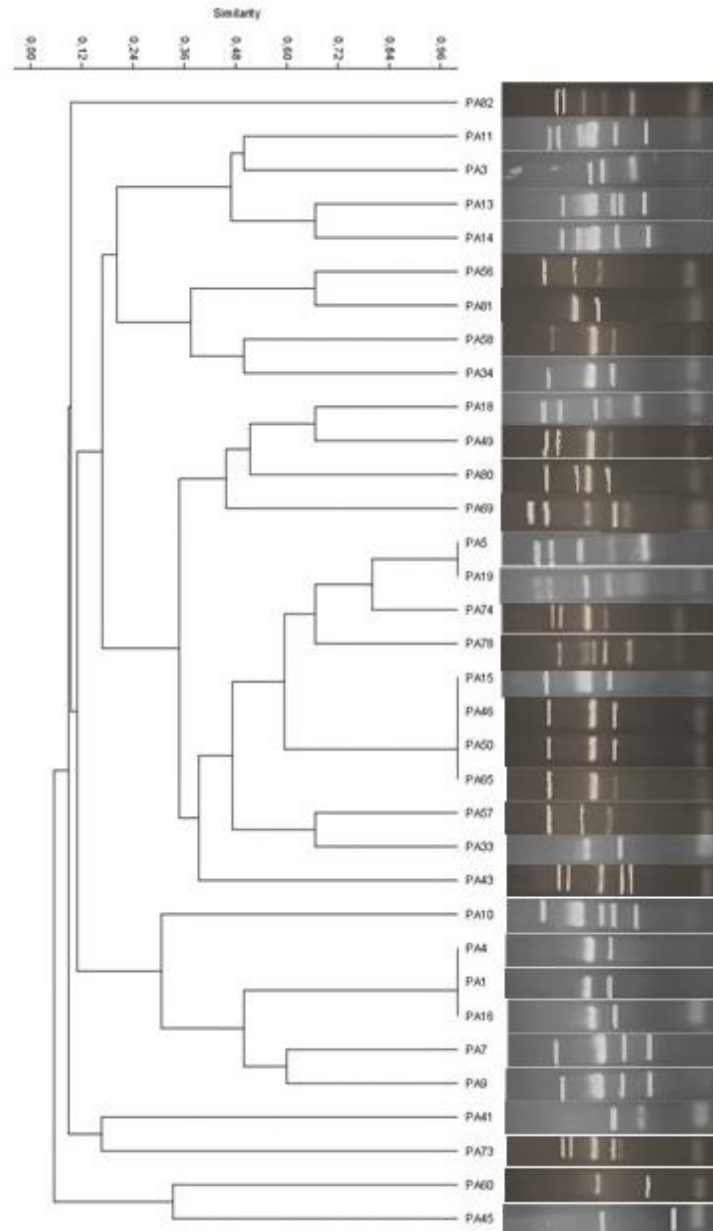


Tabela 10. Identificação do isolado, ERIC-PCR, região de coleta e perfil de resistência de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de um hospital público de Recife-PE, Brasil, coletados durante o período 2018 a 2019.

Isolado	ERIC-PCR	Setor do Hospital	Amostra	Resistência Antimicrobiana
PA01	C1	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA03	C4	UTI	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, CIP, CPM, LVX
PA04	C1	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, CIP, CPM, LVX
PA05	C2	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, CIP, CPM, LVX
PA07	C5	UCO	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA09	C6	UTI	Ponta de Cateter	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, LVX
PA10	C7	UCO	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA11	C8	UTI	Secreção Traqueal	GEN, AZT, CIP, LVX
PA13	C9	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA14	C10	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, CIP, CEF/TAZ, CPM, LVX
PA15	C3	Cirurgia Geral	Sangue	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA16	C1	UCO	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA18	C11	Cirurgia Geral	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, CIP, CPM, POL B, LVX
PA19	C2	UTI	Secreção Traqueal	MER, IMP, AZT, LVX
PA33	C12	Cardiologia	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA34	C13	UCO	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA41	C14	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA43	C15	UTI	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA45	C16	UTI	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, CIP, CPM, LVX
PA46	C3	UTI	Ponta de Cateter	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, POL B, LVX
PA49	C17	UTI	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, CIP, CPM, LVX
PA50	C3	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA56	C18	Clínica Médica	Secreção Úlcera	IMP, POL B, LVX
PA57	C19	Cardiologia	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, POL B, LVX
PA58	C20	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA60	C21	UTI	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, CIP, CPM, LVX
PA65	C3	UTI	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA69	C22	UTI	Sangue	MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX

PA73	C23	UTI	Sangue	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA74	C24	UTI	Sangue	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA78	C25	Emergência	Urina	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, PPT, CIP, CPM, POL B, LVX
PA80	C26	Clínica Médica	Sec. de Ferida	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA81	C27	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, AZT, PPT, CIP, CPM, LVX
PA82	C28	UTI	Secreção Traqueal	AMI, GEN, TOB, MER, IMP, PPT, CIP, CPM, LVX

PA: *Pseudomonas aeruginosa*; ERIC: consenso intergênico repetitivo enterobacteriano; UTI: unidade de terapia intensiva; UCO: unidade coronariana; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; IMP: imipenem; MER: meropenem; POL B: polimixina B; AZT: aztreonam; PPT: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina; CPM: cefepime; LVX: levofloxacina.

DISCUSSÃO

O aumento da frequência de isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR está sendo cada vez mais reportado em países em desenvolvimento. Estudos desenvolvidos no Brasil, entre os anos de 2009 a 2017, relataram a polimixina como sendo por muitas vezes o único antimicrobiano eficaz frente às cepas de *P. aeruginosa*. Além disso, são reportados casos de cepas pan-resistentes de *P. aeruginosa* em isolados clínicos de pacientes dos hospitais de Recife-PE (Jácome et al., 2016; Silva-Júnior et al., 2017). No presente estudo, o resultado do perfil de susceptibilidade das cepas de *P. aeruginosa* de pacientes de um hospital terciário de Recife-PE, revelou uma alta frequência de cepas multidroga-resistentes entre os pacientes hospitalizados da região, demonstrando poucas opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções. A polimixina B foi o fármaco que demonstrou maior efetividade frente esses isolados clínicos, 75,3% (25/34) dos isolados foram sensíveis ao fármaco e 11,8% (4/34) apresentaram susceptibilidade intermediária. A piperacilina/tazobactam foi o segundo fármaco com maior efetividade frente a essas cepas, porém apenas 32,4% (11/34) dos microrganismos foram sensíveis a esse antimicrobiano. Foi observada a presença de 2 cepas pan-resistentes de *P. aeruginosa*, uma delas isolada de um paciente lotado na UTI e outra de um paciente da cardiologia. Similarmente, um estudo realizado com isolados clínicos de *P. aeruginosa* coletados de hospitais públicos de Recife-PE, entre 2006 e 2010, evidenciou a presença de 54,1% (33/61) de isolados MDR, dos quais 9 isolados apresentaram susceptibilidade apenas a polimixina B, e 3 isolados pan-resistentes (Jacomé et al., 2012).

Nesse estudo, foram detectados 33,4% (11/33) dos isolados portadores do gene *bla_{KPC}* e 39,4% (13/33) dos isolados portadores do gene *bla_{VIM-2}* entre os 33 isolados resistentes a imipenem e/ou meropenem. Apenas uma cepa demonstrou a coocorrência de ambos os genes.

Diferentemente desse estudo, em um trabalho desenvolvido com isolados clínicos coletados entre os anos de 2012 e 2014, de um hospital universitário de Recife-PE, foram detectados que 35,5% (11/31) das cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem e/ou meropenem carregavam o gene *bla_{SPM-1}* e 25,8% (8/21) foram positivos para o gene *bla_{KPC}* (Jacomé et al., 2016).

Lima et al. (2020) avaliaram a presença dos genes das enzimas KPC, SHV, IMP e VIM em isolados clínicos de *P. aeruginosa* de hospitais de Recife-PE, coletados no ano de 2016, e identificaram o gene *bla_{KPC}* em 63% das cepas e o gene *bla_{VIM}* em 7% dos isolados. Similarmente, Scavuzzi et al. (2019), analisaram a ocorrência de genes de resistência aos β -lactâmicos em cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos de um hospital terciário de Recife-PE, coletados no ano de 2018, e identificaram que o gene *bla_{VIM-2}* esteve presente em 36%, *bla_{NDM}* em 29%, *bla_{KPC}* em 14%, *bla_{IMP-7}* em 7% e *bla_{GES-1}* em 7% das amostras. O estudo de Scavuzzi et al. (2019) sugere que há um aumento da circulação do gene *bla_{VIM-2}* entre cepas de *P. aeruginosa* do Brasil. Os resultados obtidos pelo presente estudo reforçam que houve um aumento da disseminação de *P. aeruginosa* portadoras do gene *bla_{VIM-2}*, manutenção da frequência de cepas dessa espécie portadoras do gene *bla_{KPC}* e uma diminuição significativa da frequência do gene *bla_{SPM-1}* nesses microrganismos. Assim, pode-se relatar um novo perfil epidemiológico molecular de resistência bacteriana aos β -lactâmicos entre as cepas de *P. aeruginosa* de Recife, estado de Pernambuco, Brasil, discordando do perfil genético de outros estados do Brasil onde foram descritas a ocorrência de *bla_{SPM}* e *bla_{VIM}* em linhagens de *P. aeruginosa* (Goncalves et al., 2017).

No presente estudo, alguns isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentaram resistência aos carbapenêmicos testados, porém não apresentavam nenhum dos genes de enzimas carbapenemases analisados. Esse fato sugere que a resistência nesses isolados clínicos esteja relacionada a mutações ou perda de porinas, presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) mutadas, com baixa afinidade aos carbapenêmicos, aumento da expressão de bombas de efluxo ou genes de enzimas carbapenemases não testados no presente estudo.

Os genes de metilases RNAr 16S são cada vez mais identificados associados a outros genes de resistência, principalmente genes de enzimas β -lactamases (Doi, Wachino, Arakawa, 2016). Esse fato pode estar relacionado a terapia associada com aminoglicosídeos e carbapenêmicos utilizada na clínica médica no tratamento de pacientes infectados por bactérias Gram-negativas resistentes às polimixinas. Dos 11 isolados identificados como portadores do gene *rmtD1* no presente estudo, 10 (91%) estavam carregando genes de resistência ao carbapenêmicos, *bla_{KPC}* e/ou *bla_{VIM-2}*. Similarmente, Tada et al. (2014) no Japão, investigaram 49 isolados clínicos de *A. baumannii* MDR e detectaram o gene *armA* em todos os isolados.

Além disso, é importante afirmar que a epidemiologia das metilases RNAr 16S codificadas por plasmídeos na América do Sul, ainda é pobremente investigada (Pereira et al., 2020), evidenciando a necessidade de estudos de epidemiologia molecular dessas enzimas.

O aumento da circulação de cepas carreando o gene *bla_{VIM-2}* pode ter sido um fator essencial no surgimento dos primeiros isolados com coocorrência dos genes *bla_{VIM-2}* e *rmtD1*, nunca antes relatado, e dos genes *bla_{VIM}* e *bla_{KPC}*, relatada anteriormente por Lima et al. (2020) em isolados clínicos de Recife-PE. O gene *rmtD1* foi reportado pela primeira vez no Brasil, em um isolado clínico de *P. aeruginosa* portador do gene *bla_{SPM-1}*. Posteriormente, esse gene foi relatado principalmente em cepas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* da América do Sul. Além disso, estudos relataram a coocorrência dos genes *bla_{KPC}* e *rmtD1* nesses microrganismos (Doi et al., 2007; Bueno et al., 2013).

Cavalcanti et al. (2015) em um trabalho realizado com nove isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos que carreavam genes de enzimas β -lactamases, provenientes de três hospitais públicos de Recife-PE, avaliaram a presença dos genes *armA*, *rmtB*, *rmtC*, e *rmtD* e detectaram apenas o gene *rmtD* em um dos isolados que apresentou elevada CIM a amicacina e gentamicina. Similarmente, o presente estudo detectou 8 isolados que carreavam ambos os genes *bla_{KPC}* e *rmtD1*, entre 33 isolados resistentes aos carbapenêmicos. Além disso, as cepas caracterizadas como pan-resistentes carreavam os genes *bla_{KPC}* e *rmtD*, e apresentaram elevadas CIM aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e a polimixina B. O isolados clínicos portadores do gene *rmtD1*, apresentavam CIM a tobramicina variando de 128 a 516 mg/L, maiores do que as identificadas em cepas não portadoras do gene e resistentes aos aminoglicosídeos.

De acordo com os 28 perfis de ERIC-PCR observados no presente estudo, 4 cepas portadoras dos genes *bla_{KPC}* e *rmtD1* apresentaram 100% de similaridade. Essas bactérias foram identificadas em diferentes unidades do hospital, sugerem que houve a circulação de um clone patogênico entre pacientes no hospital do estudo. Similarmente, Lincopan et al. (2010) relataram dois casos de balanopostite em um hospital de São Paulo, Brasil, causada por isolados de *P. aeruginosa* que apresentavam o gene *rmtD* e os resultados da Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR), revelaram que os isolados apresentavam relação clonal.

Existem poucas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos β -lactâmicos e aminoglicosídeos. Diante disso, há uma urgente necessidade de revisão de protocolos de controle e novos tratamentos para prevenir a disseminação de microrganismos patogênicos portadores de genes de resistência no ambiente

hospitalar (Hashemi et al., 2016; Pereira et al., 2020). Assim, estudos de epidemiologia molecular são essenciais como indicadores para avaliar a eficácia dessas medidas de prevenção.

6. CONCLUSÃO

- A polimixina B foi o antimicrobiano mais efetivo frente aos isolados clínicos analisados no estudo. Foram identificados 2 isolados clínicos pan-resistentes.
- O gene *bla_{SPM-1}*, reportado frequentemente nas cepas MBL de *P. aeruginosa* no Brasil, não foi detectado em nenhuma das cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, entretanto o gene *bla_{VIM-2}* apresentou a maior frequência entre os microrganismos resistentes aos carbapenêmicos.
- Foi observado que 72,8% (8/11) das cepas portadoras do gene *rmtD1* carregavam o gene *bla_{KPC}*. Esse fato pode estar relacionado a disseminação clonal e/ou através de vetores genéticos de genes de resistência entre microrganismos no hospital.
- O presente estudo trata-se do primeiro relato da coocorrência dos genes *bla_{VIM-2}* e *rmtD1* em um mesmo microrganismo. A coocorrência desses genes, pode estar relacionada ao aumento da circulação de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2 na região.
- Os padrões de ERIC-PCR identificaram 28 perfis de banda diferentes, demonstrando a presença de 3 clones patogênicos circulando no hospital. Esses microrganismos foram encontrados em pacientes da UTI, UCO e Cirurgia Geral.
- É importante a realização de estudos de epidemiologia molecular locais em diferentes intervalos de tempo, pois a partir desses estudos pode-se monitorar as medidas de prevenção de infecções nosocomiais, em diferentes unidades hospitalares, e prevenir a disseminação de microrganismos patogênicos portadores de genes de resistência. Além disso, alerta a comunidade científica sobre a necessidade do desenvolvimento e implementação de novas opções terapêuticas e uso racional de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- AL SHEIKH, Y. A. et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, n. 1, p. 24432, jan. 2014.
- ANDRADE, L. S.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, jan/mar. 2017.
- AVENT, M. L. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity: Aminoglycosides: review and monitoring. **Internal Medicine Journal**, v. 41, n. 6, p. 441–449, jun. 2011.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, jul. 2018.
- BALASOIU, M. et al. *Pseudomonas Aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. **Current Health Sciences Journal**, n. 2, p. 85–92, 4 abr. 2014.
- BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 105–115, 18 jan. 2013.
- BERÇOT, B.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 442-445, 2011.
- BEZERRA NETO, A. M. et al. Occurrence of the *vanA* gene in *Staphylococcus epidermidis* from nasopharyngeal secretion of health-care workers, Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 304–309, jun. 2018.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, jan. 2015.
- BRUSAFERRO, S. et al. Harmonizing and supporting infection control training in Europe. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 4, p. 351–356, abr. 2015.
- BUENO, M. F., et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397-400, 2013.
- CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, out. 2012.
- CAVALCANTI, F. L. et al. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-9, 2015.
- CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 21 dez. 2017.
- CORRÊA, L. L. et al. Heterologous Expression and Functional Characterization of the Exogenously Acquired Aminoglycoside Resistance Methyltransferases RmtD, RmtD2, and RmtG. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 699-702, 2015.

- CORREA, M. E. G. et al. Mechanism of aggression and defense and its correlation with the hospital infection control commission. **Revista Científica Fagoc Saúde**, v. 2, p. 1-6, 2017.
- DAHIYA, S. et al. Carbapenemases: A Review. **International Journal of Advanced Health Science**, v. 2, n. 4, p. 11-17, mar. 2015.
- DAVIS, M. A. et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2666–2669, 1 jun. 2010.
- DOI, Y. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 852-856, 2007.
- DOI, Y. et al. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 491–496, 1 fev. 2004.
- DOI, Y.; WACHINO, J. I.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.
- DU, D. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, set. 2018.
- DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511–517, jul. 2009.
- FLANAGAN, J. L. et al. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1954–1962, 1 jun. 2007.
- FRITSCH, T. R., et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1843-5, 2008.
- GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3960–3962, jul. 2012.
- GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 11–27, 2016.
- GOLEBIEWSKI, M. et al. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum-lactamase gene blaCTX-M-3. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3789–3795, 1 nov. 2007.
- GONÇALVES, I. R. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : association with virulence genes and biofilm formation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 211–217, abr. 2017.

GURUNG, M. et al. Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*_{IMP-1} in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 4, p. 468–470, dez. 2010.

GURUNG, M. et al. Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*_{IMP-1} in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 4, p. 468–470, dez. 2010.

HASHEMI, A. et al. Detection of Antibiotic Resistance Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients in Iran. **British Microbiology Research Journal**, v.12, n.4, p.1–6, 2016.

HIDALGO, L. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1543–1550, 1 jul. 2013.

HSU, L.-Y. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in South and Southeast Asia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 1–22, jan. 2017.

JÁCOME, P. R. L. A. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *P. aeruginosa* procedentes de hospitais públicos de Recife-PE. 99 f. **Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Pernambuco**, 2011.

JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 707–712, dez. 2012.

JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 658–665, 1 jul. 2016.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509–514, jul. 2015.

LABARCA, J. A. et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1–17, 27 ago. 2014.

LEE, C.-S. et al. *Escherichia coli* sequence type 354 coproducing CMY-2 cephalosporinase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 4246–4247, jul. 2014.

LIMA, A. V. A. et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, p.mdr.2019.0214, 2020.

LIMA, J. L. C. et al. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.22, n.2, p.129–136, 2018.

- LINARDI, V. R. et al. Isolamento de *Staphylococcus aureus* MRSA entre os funcionários de um hospital geral da região leste de Minas Gerais. **Revista de Saúde Pública do SUS**, v. 2, n. 2, 2014.
- LINCOPAN, N. et al. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e344–e347, 2010.
- MACVANE, S. H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 1, p. 25–37, jan. 2017.
- MAGILL, S. S. et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 27 mar. 2014.
- MENEZES, J. M. R. et al. Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 199–207, abr. 2016.
- MICEK, S. T. et al. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 19, n. 1, dez. 2015.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 15 fev. 2017.
- MORRILL, H. J. et al. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. ofv050–ofv050, 11 jun. 2015.
- NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, ago. 2011.
- O'HARA, J. A. et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2413–2416, maio 2013.
- OLIVEIRA, F. R. P. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e atuação do farmacêutico hospitalar: contexto e importância. **Boletim Informativo Geum**, v. 6, n. 3, p. 37–42, 2015.
- PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, nov. 2011.
- PARKINS, M. D.; SOMAYAJI, R.; WATERS, V. J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 29 ago. 2018.
- PATON, R. et al. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 81–87, fev. 1993.
- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 13 maio 2010.

- PEREIRA, J. N. P. et al. Clonal Dissemination of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Carriers of 16S rRNA Methylase Genes in an Oncological Hospital in Recife, Brazil. **Current Microbiology**, v.77, n.1, p.32–39, 2020.
- PEREIRA, M. S.; E MORIYA, T. M. Controle de infecção hospitalar. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 41, n. 1, p. j9 - 4fi, 1988.
- POIREL, L.; BENOUDA, A.; HAYS, C.; *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.12, p.2781–2783, 2011.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 1 jul. 2007.
- QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p.174-7, 2015.
- RAMIREZ, M.; TOLMASKY, M. Amikacin: Uses, resistance and prospects for inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2267, 19 dez. 2017.
- SCAIFE, W. et al. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 36, n. 3, p. 585–586, mar. 1995.
- SCAVUZZI, A. M. L. et al. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2-harboring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.19, p.181–182, 2019.
- SILVA-JÚNIOR, V. V. DA et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring blaGES-1 and blaGES-11 in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764–768, dez. 2017.
- SIQUEIRA, C. C. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of microorganisms in a university hospital from Vitória (ES), Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 2, 2018.
- TABAK, Y. P. et al. Incremental clinical and economic burden of suspected respiratory infections due to multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Journal of Hospital Infection**, v.103, n.2, p.134–141, 2019.
- TADA, T. et al. Dissemination of 16S rRNA Methylase ArmA-Producing *Acinetobacter baumannii* and Emergence of OXA-72 Carbapenemase Coproducers in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.5, p.2916–2920, 2014.
- TADA, T. et al. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 251-256, 2013.
- TADA, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in nepal coproducing metallo- β -lactamases and 16S rRNA methyltransferases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, set. 2017.

TAYLOR, E. et al. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK and Ireland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 2, p. 278–282, ago. 2018.

TIJET, N. et al. *rmtD2*, a New allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in *Enterobacteriaceae* isolates from Argentina for more than a decade. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 904–909, fev. 2011.

TOFAS, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 4, p. 335–341, ago. 2017.

URBANOWICZ, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.74, n.10, p.3117–3119, 2019.

VAEZ, H. et al. Metallo-beta-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Le Infezioni in Medicina**, v. 2018, n. 3, p. 216–225, fev. 2018.

WACHINO, J. -I. et al. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m1A1408 Methyltransferase, NpmA, Found in a Clinically Isolated *Escherichia coli* Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4401–4409, 1 dez. 2007.

WACHINO, J. -I. et al. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase, RmtC, Found in a *Proteus mirabilis* Isolate Demonstrating Extraordinary High-Level Resistance against Various Aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 178–184, 1 jan. 2006.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147–151, 1 jan. 1991.

WEINSTEIN, M. P. **M100-performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29TH Edition**. S.l.: CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. **GLOBAL SURVEY ON INFECTION PREVENTION AND CONTROL AND HAND HYGIENE**. S.l.: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. **GUIDELINES ON CORE COMPONENTS OF INFECTION PREVENTION AND CONTROL PROGRAMMERS AT THE NATIONAL AND ACUTE HEALTH CARE FACILITY LEVEL**. S.l.: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016.

YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 1 abr. 2001.

YOKOYAMA, K. et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1888–1893, dez. 2003.

YU, Y.; ZHANG, Q.; DENG, Z. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. **F1000 Research (F1000 Faculty Rev)**, v. 6, n. 723, p. 1-9, 2017.

ZHANEL, G. G. et al. Comparative Review of the Carbapenems: **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027–1052, 2007.

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO

Revista: Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Fator de impacto: 5.068

Qualis: A1

ISSN: 0305-7453

Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying *bla*_{KPC} and/or *bla*_{VIM-2} genes in Brazil

Sérgio Dias Costa-Júnior^{1,2*}, Adriana Maria Costa Marques da Silva², Jussyêgles Niedja da Paz Pereira², Jailton Lobo da Costa Lima², Isabella Macário Ferro Cavalcanti¹, Maria Amélia Vieira Maciel²

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

²Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

*Corresponding author: Sérgio Dias Costa-Júnior, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil. E-mail address: sergio_dias16@hotmail.com

Running title: Emergence of *rmtD1* gene in *Pseudomonas aeruginosa* harbouring *bla*_{KPC} and/or *bla*_{VIM-2}

ABSTRACT

Objectives: The present study aimed to characterize the susceptibility profile of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, collected from a hospital between 2018 and 2019, to describe the phenotypic, genetic, and clonal profile of carbapenem and aminoglycoside resistance of these isolates.

Methods: Sixty-four *P. aeruginosa* isolates were collected from a hospital in Recife-PE, and species and antimicrobial susceptibility profile were identified using the automated BD Phoenix TM system. In addition, broth microdilution was performed to determine the MICs of tobramycin and polymyxin B. Eventually, the isolates were subjected to PCR and sequencing to detect the carbapenemase enzyme genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM-1}*, and *bla_{IMP}*) and 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, and *rmtG*); ERIC-PCR was conducted for clonal profile determination.

Results: Among the 64 isolates considered in the present study, 34 were selected for complementary molecular phenotypic tests, as per the sample inclusion criteria. The *bla_{KPC}* and *bla_{VIM-2}* genes were identified in 32.4% (11/34) and 38.2% (13/34) of the isolates tested, respectively. The *rmtD1* gene was detected in 32.4% (11/34) of the isolates analyzed. Eight isolates carried both the *bla_{KPC}* and *rmtD1* genes while co-occurrence of *bla_{VIM-2}* and *rmtD1* genes was detected in three strains, and one isolate had all of *bla_{KPC}*, *bla_{VIM-2}*, and *rmtD1* genes. ERIC-PCR molecular typing demonstrated the spread of three pathogenic clones across the hospital.

Conclusions: Since it is the first report of co-occurrence of *bla_{VIM-2}* and *rmtD1* genes in microorganisms, the present study is of great significance. Moreover, it emphasizes the need to comply with bacterial spread control measures in the hospital environment.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenemases, 16S rRNA methylases; clonal dissemination.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a non-fermenting Gram-negative bacillus of great clinical importance owing to its global distribution, high prevalence in developing countries, diversity of virulence factors, and broad spectrum of resistance. The genetic characteristics of this microorganism encourage the search for genes associated with bacterial resistance and clonal relationship across *P. aeruginosa* isolates from hospitalized patients¹⁻³. Carbapenems and aminoglycosides are among the main classes of drugs used to treat infections by *P. aeruginosa*; in many cases, these antimicrobials are used in combination to achieve an effective therapeutic regimen. However, *P. aeruginosa* strains carrying genes encoding resistance enzymes to both the drugs have been emerging increasingly. The prevalence of genes imparting resistance to carbapenems and aminoglycosides varies in different locations around the world. Time is also an influencing factor in the profile of bacterial resistance, especially in Gram-negative bacteria, in which the conjugation process is able to share genetic information across microorganisms of different species⁴⁻⁷.

Studies conducted in Brazil, aimed to evaluate the presence of *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtG*, and *rmtD* genes, reported the first occurrence of these genes in clinical isolates from enterobacteria and non-fermenting Gram-negative bacilli⁸⁻¹¹. First identification of the *rmtD* gene occurred in a clinical isolate of *P. aeruginosa* harboring SPM-1⁸. Subsequently, the co-occurrence of *rmtD1* or *rmtD2* and *bla*_{KPC-2} genes was identified in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*¹⁰.

The main resistance enzymes, described in clinical isolates of *P. aeruginosa*, are IMP, VIM, SPM, and KPC. SPM is reported almost exclusively in Brazil, being responsible for high rates of morbidity and mortality in the Brazilian territory¹²⁻¹⁴. Data on the prevalence of RMTases in Gram-negative bacteria, however, remain scarce; some studies have described a prevalence of 1% in clinical isolates of enterobacteria from Europe, Japan, and Argentina. However, studies also report alarming prevalence, ranging from 2.8% to 37%, in clinical isolates of enterobacteria from Asian countries, such as China, India, and Korea¹⁵⁻¹⁷.

Molecular epidemiological studies are essential for identifying the origin and spread of microorganisms, in order to develop preventive strategies to control their transmission across patients. Using bacterial genotyping tools, it is also possible to show the relationships among

microorganisms of the same species in a given geographic area during a specific period of time^{18, 19}.

The present study aimed to genetically characterize the clinical isolates of *P. aeruginosa* from a hospital in Recife-PE, Brazil, in order to investigate the presence of genes for carbapenemase enzymes and 16S rRNA methylases, and clonal dissemination profile of these isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates

Sixty-four clinical isolates, from patients admitted to a hospital in Recife-PE, Brazil between the years 2018 and 2019, were analyzed. According to the inclusion criteria and susceptibility profile of the microorganisms, 34 isolates were selected for the complementary phenotypic tests and molecular characterization tests.

Identification and susceptibility profile

Identification of the isolates and susceptibility analysis were initially carried out using the automated BD Phoenix TM system (Becton Dickinson, United States). Subsequently, the isolates were sent to the Laboratory of Bacteriology and Molecular Biology, where they were kept frozen in glycerol at -20 °C in the bacterial collection of the laboratory. These bacteria were reactivated in test tubes containing half brain-heart infusion broth (BHI), incubated for 48 h in an oven at 37 °C, sown on ceftrimide agar, and placed in an oven at 37 °C for 24 h for analysis. MICs of tobramycin and polymyxin B were determined through broth microdilution, according to the standards established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)²⁰.

For the determination of MIC, 96-well plates were used, in which the broth medium, namely cation-adjusted Mueller-Hinton adjusted cations broth (CAMHB), was distributed, dilution of the antimicrobial solutions was performed, and finally aliquots of bacterial suspensions were added to the columns corresponding to each isolate. Bacterial suspensions were prepared in 0.9% NaCl, using the colonies of isolates previously sown in MHA. The bacterial suspensions were adjusted to 0.5 on the MacFarland scale, diluted, and deposited in the wells, to obtain a final concentration of $2-5 \times 10^5$ CFU/well. Subsequently, the plates were incubated at 37 ± 2 °C for 20–24 h (CLSI, 2019). The concentrations of 0.5 to 516

$\mu\text{g/mL}$ tobramycin and 0.125 to 32 $\mu\text{g/mL}$ polymyxin B were evaluated. *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *E. coli* NCTC 13846 strains were used as controls. All samples were tested in triplicate. The plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 20–24 h (CLSI, 2019). To perform the reading, resazurin, a cell viability dye, and spectrophotometry using a 96-well plate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific), were selected. After incubating the microdilution plates, 20 μL of 0.01% resazurin were added to each well and the plates were incubated again for 1 h at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. If the well color changed from a faintly fluorescent blue to a pink color with high fluorescence, the viability test was considered positive for bacterial growth. Interpretation of the CIM values was performed according to the criteria established by CLSI²⁰.

Total DNA extraction

After incubating the colonies in Luria Bertani broth (LB) at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h, the extraction of total DNA from all isolates was performed. This extraction was performed using the Brazol Kit (LGC-Biotechnology), according to the protocol offered by the manufacturer. The extracted DNA was quantified by spectrophotometry in a wavelength range from 260 to 280 nm.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplification reactions for β -lactamases genes were performed in the thermocycler (Biosystems) under the conditions and using the primers described by Jacomé *et al.*¹⁸ for the *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP} genes, and under the conditions and primers described by Poirel *et al.*²¹ for the *bla*_{NDM} gene. Each amplification reaction was prepared in a final volume of 25 μL for each tube. For the *bla*_{KPC} gene each amplification reaction included: 5 ng of genomic DNA (0.5 μL), 25 pmol of each primer (1 μL for each primer), 5x buffer (5 μL), 200 μM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (Ludwig Biotec) (0.6 μL), 1.5 mM MgCl₂ (1.5 μL) and 2.0 U Taq DNA polymerase (Promega) (0.4 μL) and ultrapure water. For the *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP} genes each amplification reaction included: 25 ng of genomic DNA (1 μL), 10 pmol of each primer (1 μL for each primer), 1x buffer (1 μL), 100 μM dNTP (Ludwig Biotec) (0.6 μL), 1.5 mM MgCl₂ (1.5 μL) and 1.0 U Taq DNA polymerase (Promega) (0.4 μL) and ultrapure water.

PCR assay for the 16S rRNA methylase genes *armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, and *rmtG* were performed according to the primers and conditions described by Davis *et al.*²², Berçot; Poirel;

Nordmann²³, Hidalgo *et al.*²⁴. Each reaction included: 10 ng total DNA (1 µL), 10 pmol of each primer (1 µL for each primer), 8 mM dNTP (0.6 µL), 5x buffer (5 µL), 25 mM MgCl₂ (2.0 µL) and 5 U of Taq DNA polymerase (0.2 µL). During the performance of the PCR, positive and negative controls were included for each of the researched genes. PCR products were submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel in 0.5x TBE buffer. These products were stained with blue-green, viewed on an ultraviolet light transilluminator and photo documented.

Sequencing

PCR product was quantified by spectrophotometry and then purified using the DNA Wizard purification kit (SV gel and PCR clean-up System) (Promega) according to the manufacturer's instructions. After purification, the DNA fragment was taken for sequencing. This showed a satisfactory result and the nucleotide sequences were compared with the sequences available in databases, using the BlastN and BlastX BlastNetwork algorithms available at NCBI²⁵.

Repetitive Enterobacterial Intergenic Consensus (ERIC-PCR)

ERIC-PCR reactions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, including: 100 ng of genomic DNA, 10 pmol of the primers (ERIC1[5'ATGTAAGCTCCTGGGGA TTCAC-3']; ERIC-2 [5' -AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3']), 1x Buffer, 200 µM deoxyribonucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂ and 1.0 U of Taq DNA polymerase enzyme. Amplification parameters used in ERIC-PCR were: initial denaturation at 95 °C for 3 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 92 °C for 1 minute, annealing at 36 °C for 1 minute and extension at 72 °C for 8 minutes. After the 30 cycles, a 16 minute final stretching step was performed at 72 °C. PCR products were stained with blue-green and subjected to 1.5% electrophoresis in an agarose gel, visualized under UV light and photo-documented for further analysis of clonal profiles²⁶.

Ethics statement.

This study was approved by the Ethics Committee on Human Research of University Federal of Pernambuco with CAAE 0490.0.172.000-11.

RESULTS

Sixty-four clinical isolates of *P. aeruginosa* from a hospital in Recife-PE, Brazil, obtained between the years 2018 and 2019; 53.1% (34/64) was characterized as MDR while 46.9% (30/64) was MDS. Samples of tracheal secretion and urine showed the highest percentage of MDR strains, being 62% (12/21) and 57.1% (4/11), respectively. Among the 64 isolates, only 34 were selected for the determination of MICs of tobramycin and polymyxin B, and for molecular tests to search for genes corresponding to β -lactamase enzymes and 16S rRNA methylases. The sample exclusion criteria were: surveillance samples, repetitive samples from the same patient, and clinical isolates that did not show resistance to an aminoglycoside or carbapenem.

Among the strains selected for molecular tests, 97% (33/34) showed resistance to imipenem and/or meropenem. Of the 33 isolates analyzed for the presence of β -lactam resistance genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP}, 33.3% (11/33) of the isolates carried the *bla*_{KPC} gene and 39.4% (13/33) of the isolates were positive for the *bla*_{VIM} gene. After the alignment and analysis of the sequencing of the PCR product of *bla*_{VIM} gene it was verified that it is the *bla*_{VIM-2} gene. The presence of *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP} was not detected in the analyzed isolates. Furthermore, 91.2% (31/34) of the clinical isolates showed resistance to amikacin and/or gentamicin and were analyzed for the presence of genes *armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*. Among these genes, the *rmtD* gene was identified in 35.5% (11/31) of the samples. After the alignment and analysis of the sequencing of the PCR product of the *rmtD* gene, it was verified that it is the variable *rmtD1* of the gene. The other genes were not detected among the analyzed isolates. Eight isolates carried both the *bla*_{KPC} and *rmtD1* genes, while the co-occurrence of the *bla*_{VIM-2} and *rmtD1* genes was detected in 3 strains and 1 isolate showed the *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM-2} and *rmtD1* genes (Table 1).

Clinical isolates of *P. aeruginosa* demonstrated the spread of three clones, C1, C2, and C3, in the hospital. Isolates PA01, PA04, and PA16 presented a single band pattern, demonstrated 100% genetic similarity, and were named clone C1. Isolates PA05 and PA19 presented a single profile in ERIC-PCR, and was called C2. The isolates PA15, PA46, PA50, and PA65 showed 100% genetic similarity, and were characterized as the C3 clonal profile. Other isolates had distinct genetic profiles, in which the similarity coefficients were less than 80%. C1 clonal profile was found in clinical isolates from patients assigned to the Intensive Care Units (ICU) and Coronary Care Units (CCU), C2 profile associated with patients

assigned to the ICU, and C3 profile associated with patients admitted to the intensive care and general surgery units, demonstrating a spread of clones C1 and C3 across different hospital units. All clinical isolates with ERIC-PCR-based C1 and C2 profiles were from tracheal secretion, whereas clinical isolates of C3 profile were from blood, urine, catheter tip, and tracheal secretion (Figure 1).

DISCUSSION

Increased frequency of clinical isolates of MDR *P. aeruginosa* has been reported in developing countries. Studies conducted in Brazil, between the years 2009 to 2017, have reported polymyxin as the only effective antimicrobial against *P. aeruginosa* strains. In addition, cases of pan-resistant strains of *P. aeruginosa* in clinical isolates from patients in hospitals of Recife-PE have also been reported^{1, 18, 27}. In the present study, susceptibility profile of *P. aeruginosa* strains from patients in a hospital in Recife-PE revealed a high frequency of multidrug-resistant strains among hospitalized patients in the region, suggesting the availability of very few therapeutic options for the treatment of these infections.

Polymyxin B was the drug that demonstrated as most effective antimicrobial against these clinical isolates, 75.3% (25/34) of the isolates being sensitive to the drug and 11.8% (4/34) having intermediate susceptibility. Piperacillin/tazobactam was the second drug with high effectiveness against these strains; however, only 32.4% (11/34) of the microorganisms were sensitive to this antimicrobial drug. Presence of two pan-resistant strains of *P. aeruginosa* was observed, one isolated from a patient in the ICU and another from a cardiology patient. Similarly, a study conducted with clinical isolates of *P. aeruginosa*, collected from public hospitals in Recife-PE between 2006 and 2010, had shown the presence of 54.1% (33/61) MDR isolates, of which nine were susceptible only to polymyxin B, and three were pan-resistant²⁸.

In this study, 11 isolates with *bla*_{KPC} gene and 13 with *bla*_{VIM-2} gene were detected in the 33 isolates resistant to imipenem and/or meropenem. Only one strain demonstrated the co-occurrence of both genes. In contrast, in a study conducted with clinical isolates collected from 2012 to 2014 in university hospital in Recife-PE, 35.5% (11/31) of strains of *P. aeruginosa* resistant to imipenem and/or meropenem were found to carry the *bla*_{SPM-1} gene and 25.8% (8/21) were positive for the *bla*_{KPC} gene¹⁸.

Lima et al.²⁷ evaluated the presence of genes of the enzymes KPC, SHV, IMP, and VIM in the clinical isolates of *P. aeruginosa* collected in 2016 from hospitals in Recife-PE, and

identified the *bla*_{KPC} gene in 63% of the strains and *bla*_{VIM} gene in 7%. Similarly, Scavuzzi et al.²⁹ analyzed the occurrence of β -lactam resistance genes in carbapenem-resistant strains of *P. aeruginosa*, collected in 2018 from a tertiary hospital in Recife-PE, and identified the *bla*_{VIM-2} gene to be present in 36%, *bla*_{NDM} in 29%, *bla*_{KPC} in 14%, *bla*_{IMP-7} in 7%, and *bla*_{GES-1} in 7% of the samples. Scavuzzi et al.²⁹ suggested an increase in the circulation of *bla*_{VIM-2} gene among strains of *P. aeruginosa* in Brazil. Results obtained from the present study reinforced the increase in spread of *P. aeruginosa* carrying the *bla*_{VIM-2} gene, maintenance of the frequency of strains carrying the *bla*_{KPC} gene, and a significant decrease in the frequency of *bla*_{SPM-1} gene in these microorganisms. Thus, a new molecular epidemiological profile of bacterial resistance to β -lactams, across the strains of *P. aeruginosa* in Recife, Pernambuco state, Brazil, may be reported, which disagrees with the genetic profile of the other states of Brazil that described the occurrence of *bla*_{SPM} and *bla*_{VIM} in strains of *P. aeruginosa*³⁰.

The 16S rRNA methylase genes have been increasingly identified in association with other resistance genes, mainly β -lactamase enzyme genes³¹. Thus, 91% (10/11) of the isolates, identified as carriers of the *rmtD1* gene in the present study, also harbor genes for resistance to carbapenems, such as *bla*_{KPC} and/or *bla*_{VIM-2}. Tada et al.³¹, in Japan, had investigated 49 clinical isolates of MDR *A. baumannii* and detected the *armA* gene in all of them. In addition, the epidemiology of 16S rRNA methylases encoded by plasmids in South America still remains poorly investigated³², highlighting the need for studies on the molecular epidemiology of these enzymes.

Increased circulation of strains carrying the *bla*_{VIM-2} gene may have been an essential factor in the emergence of the first isolates with co-occurrence of *bla*_{VIM-2} and *rmtD1* genes (reported never before), and of *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} genes, previously reported by Lima et al.²⁷ in clinical isolates from Recife-PE. The *rmtD1* gene was first reported in Brazil, in a clinical isolate of *P. aeruginosa* carrying the *bla*_{SPM-1} gene. Subsequently, this gene was reported mainly in strains of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* from South America. Studies have reported the co-occurrence of *bla*_{KPC} and *rmtD1* genes in these microorganisms^{8, 10}.

In a study conducted with nine clinical isolates of *P. aeruginosa*, resistant to carbapenems and carrying genes of β -lactamases enzymes, from three public hospitals in Recife-PE, evaluated the presence of *armA*, *rmtB*, *rmtC*, and *rmtD* genes, and detected only the *rmtD* gene in one of the isolates showing elevated MIC to amikacin and gentamicin³³. Similarly, the present study detected eight isolates carrying both *bla*_{KPC} and *rmtD1* genes, out

of 33 isolates resistant to carbapenems. In addition, strains characterized as pan-resistant carried the *bla*_{KPC} and *rmtD* genes, and showed high MICs to carbapenems, aminoglycosides, and polymyxin B.

According to the 28 ERIC-PCR profiles observed in the present study, four strains carrying the *bla*_{KPC} and *rmtD1* genes showed 100% similarity. These bacteria were identified in different units of the hospital, demonstrating that a pathogenic clone circulated across the patients in the study hospital. Similarly, Lincopan et al.⁴ had reported two cases of balanoposthitis in a hospital in São Paulo, Brazil, caused by the isolates of *P. aeruginosa* with the *rmtD* gene, and results of ERIC-PCR revealed the isolates to present clonal relationship.

There are few therapeutic options for the treatment of infections caused by *P. aeruginosa* strains resistant to β -lactams and aminoglycosides. Therefore, there is an urgent need to review control protocols and desing new treatments to prevent the spread of pathogenic microorganisms carrying resistance genes in the hospital environment³²⁻³⁴. Molecular epidemiology studies are essential as indicators to assess the effectiveness of these preventive measures.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Danilo Elias Xavier PhD from the Institute Aggeu Magalhães, Fiocruz, Pernambuco, Brazil, for providing the positive controls used for the execution of the PCRs of 16S rRNA methylase genes.

FUNDING

This work was supported by the Foundation of Support for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) [APQ-0814-4.03/17] and Brazillian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

TRANSPARENCY DECLARATIONS

None to declare

REFERENCES

1. Silva Júnior VV da, Ferreira LD, Alves LR, *et al.* Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-11} in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; **50**: 764–8.

2. Siqueira CCM, Guimarães AC, Mata TFD, *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of microorganisms in a university hospital from Vitória (ES), Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2018; **54**. Available at: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1676-2444.20180014>. Accessed February 6, 2020.
3. Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo Z, Khademi F. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: A systematic review and metaanalysis. *J Global Infect Dis* 2018; **10**: 212.
4. Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, Levy CE. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; **14**: e344–7.
5. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med Chem Commun* 2016; **7**: 11–27.
6. Ramirez M, Tolmasky M. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. *Molecules* 2017; **22**: 2267.
7. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2019; **74**: 3117–9.
8. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase RmtD and Metallo-Lactamase SPM-1 in a Panresistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51**: 852–6.
9. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of Methyltransferases Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; **52**: 1843–5.
10. Bueno MFC, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2397–400.
11. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and ArmA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res* 2015; **48**: 174–7.
12. Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab* 2011; **47**: 409–20.
13. Andrade LN, Darini ALC. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? *Journal of Infection Control* 2017; **6**: 16–25.
14. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2015; **45**: 568–85.
15. Al Sheikh YA, Marie MAM, John J, Krishnappa LG, Dabwab KHM. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan Journal of Medicine* 2014; **9**: 24432.

16. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America* 2016; **30**:523–537.
17. Tada T, Shimada K, Satou K, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Nepal Coproducing Metallo- β -Lactamases and 16S rRNA Methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e00694-17, /aac/61/9/e00694-17.atom.
18. Jácome PRL de A, Alves LR, Jácome-Júnior AT, *et al.* Detection of bla SPM-1, bla KPC, bla TEM and bla CTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *Journal of Medical Microbiology* 2016; **65**: 658–65.
19. Tabak YP, Merchant S, Ye G, *et al.* Incremental clinical and economic burden of suspected respiratory infections due to multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Journal of Hospital Infection* 2019; **103**: 134–41.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100Ed29. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: **29th** informational supplement 2019; Wayne, PA.
21. Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; **66**: 2781–3.
22. Davis MA, Baker KNK, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a Gene Conferring Multiple-Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54**: 2666–9.
23. Berçot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; **71**: 442–5.
24. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, *et al.* Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68**: 1543–50.
25. Lima JL da C, Alves LR, Jacomé PRL de A, Bezerra Neto JP, Maciel MAV, Morais MMC de. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2018; **22**: 129–36.
26. Duan H, Chai T, Liu J, *et al.* Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research* 2009; **109**: 511–7.
27. Araújo Lima AV, da Silva SM, do Nascimento Júnior JAA, *et al.* Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance* 2020: mdr.2019.0214.
28. Jácome PRL de A, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2012; **45**: 707–12.
29. Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, de Oliveira ÉM, Beserra FG, Lopes AC de S. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2-harboring

Pseudomonas aeruginosa isolates in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2019; **19**: 181–2.

30. Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DW da F, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology* 2017; **48**: 211–7.

31. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. Dissemination of 16S rRNA Methylase ArmA-Producing *Acinetobacter baumannii* and Emergence of OXA-72 Carbapenemase Coproducers in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; **58**: 2916–20.

32. da Paz Pereira JN, de Andrade CA das N, da Costa Lima JL, de Lima Neto RG, de Araújo PSR, Maciel MAV. Clonal Dissemination of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Carriers of 16S rRNA Methylase Genes in an Oncological Hospital in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* 2020; **77**: 32–9.

33. Cavalcanti FL de S, Mirones CR, Paucar ER, *et al.* Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; **110**: 1003–9.

34. Hashemi A, Fallah F, Erfanimanesh S, Chirani A, Dadashi M. Detection of Antibiotic Resistance Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients in Iran. *BMRJ* 2016; **12**: 1–6.

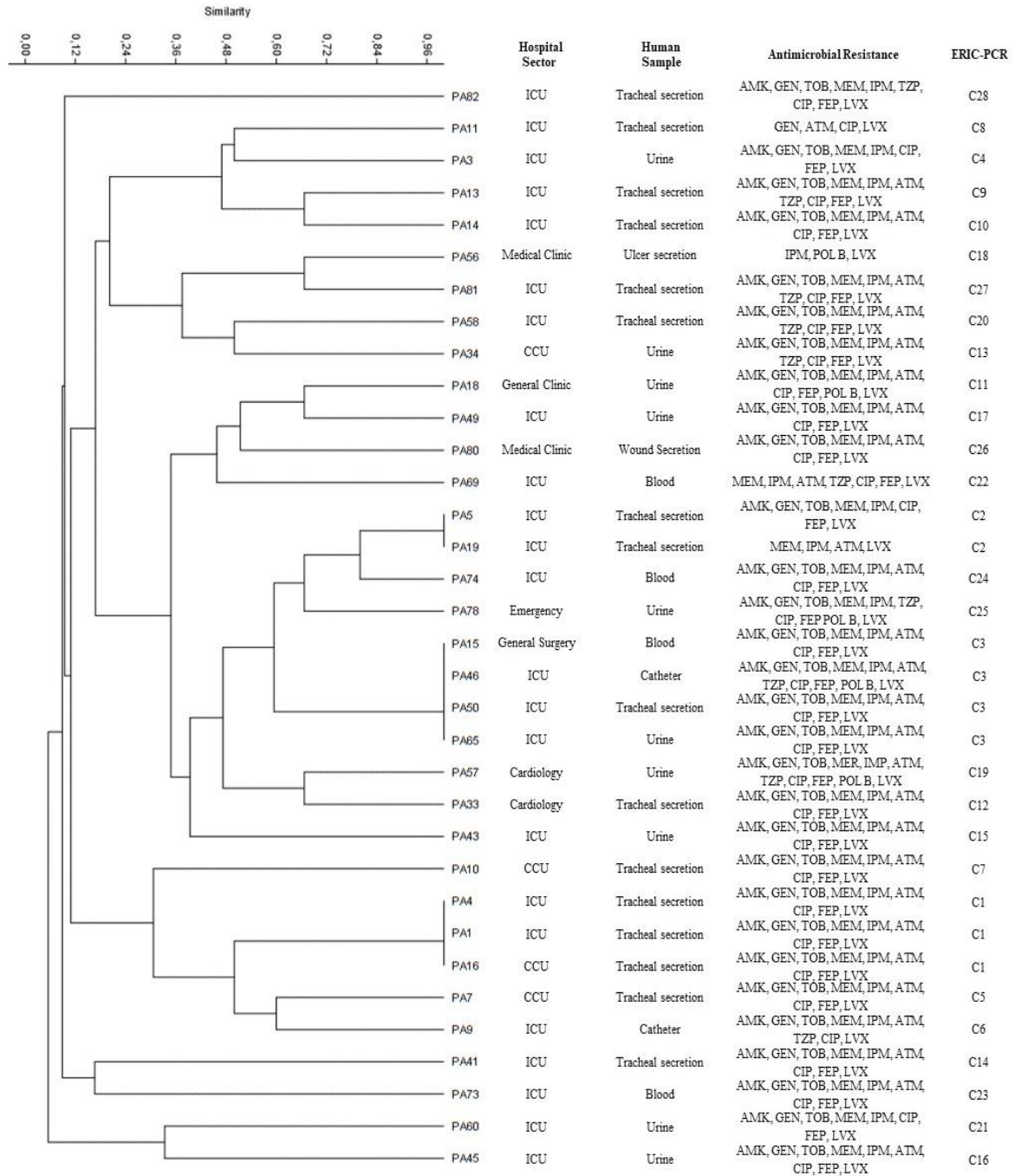
Table 1. Type of sample, susceptibility profile, resistance genes and ERIC-PCR profile of clinical isolates of *P. aeruginosa* from a hospital in Recife-PE, Brazil.

Isolate	Sample	MIC(mg/L)						RMTases genes	B-lactamases genes	ERIC
		AMK	GEN	TOB	IPM	MEM	POL B			
PA01	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C1
PA03	Urine	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C4
PA04	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C1
PA05	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	4[I]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C2
PA07	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	4[I]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C5
PA09	Catheter	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C6
PA10	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{KPC}	C7
PA11	Tracheal secretion	8[S]	>8[R]	2[S]	1[S]	1[S]	1[S]	-	-	C8
PA13	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla</i> _{KPC}	C9
PA14	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}	C10
PA15	Blood	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C3
PA16	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C1
PA18	Urine	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	8[R]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C11
PA19	Tracheal secretion	8[S]	>8[R]	1[S]	>8[R]	>8[R]	4[I]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C2
PA33	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	-	-	C12
PA34	Urine	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	<i>rmtD1</i>	-	C13
PA41	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C14
PA43	Urine	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	-	C15
PA45	Urine	>32[R]	>8[R]	512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	-	C16
PA46	Catheter	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	32[R]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C3
PA49	Urine	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C17
PA50	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C3
PA56	Ulcer secretion	8[S]	2[S]	1[S]	>8[R]	1[S]	8[R]	-	-	C18
PA57	Urine	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	32[R]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C19
PA58	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C20
PA60	Urine	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C21
PA65	Urine	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.5[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC}	C3
PA69	Blood	8[S]	4[S]	2[S]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C22
PA73	Blood	>32[R]	>8[R]	64[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	-	<i>bla</i> _{KPC}	C23
PA74	Blood	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	-	C24
PA78	Urine	>32[R]	>8[R]	512[R]	>8[R]	>8[R]	32[R]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C25
PA80	Wound secretion	>32[R]	>8[R]	>512[R]	>8[R]	>8[R]	0.25[S]	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}	C26
PA81	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	128[R]	>8[R]	>8[R]	1[S]	-	<i>bla</i> _{KPC}	C27
PA82	Tracheal secretion	>32[R]	>8[R]	256[R]	>8[R]	>8[R]	4[I]	-	<i>bla</i> _{VIM-2}	C28

S: susceptible; I: intermediate; R: resistant

Figure 1. Dendrogram of the ERIC-PCR and phenotypic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

ICU: intensive care unit; CCU:coronary care unit. ERIC-PCR: repetitive enterobacterial intergenic consensus - polymerase chain reaction.



**Emergence of rmtD1 gene in clinical isolates of
Pseudomonas aeruginosa carrying blaKPC and/or blaVIM-2
genes in Brazil**

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID:	JAC-2020-0215
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	08-Feb-2020
Complete List of Authors:	Costa-Junior, Sérgio; Federal University of Pernambuco, Department of Tropical Medicine; Federal University of Pernambuco, Department of Tropical Medicine Lima, Jailton Iobo; Federal University of Pernambuco, Tropical Medicine Silva, Adriana Maria; Federal University of Pernambuco, Department of Tropical Medicine Paz Pereira, Jussuêgles; Federal University of Pernambuco, Department of Tropical Medicine Cavalcanti, Isabella; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA); Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV), Laboratório de Microbiologia e Imunologia Maciel, Maria Amélia; Universidade Federal de Pernambuco, Medicina Tropical
Keywords:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carbapenemases, 16S rRNA methylases, clonal dissemination

SCHOLARONE™
Manuscripts