

PATRÍCIA BATISTA ROCHA

**BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO
ENTRE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas*
ISOLADAS DE ALFACES**



**Monografia apresentado ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2017**

**Trabalho realizado no
Departamento de Microbiologia Médica,
do Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes, UFRJ, sob a orientação da
Professora Raquel Regina Bonelli e
coorientação de Larissa Alvarenga Batista
Botelho**

R672b Rocha, Patrícia Batista
BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO ENTRE
BACTÉRIAS DO GÊNERO Pseudomonas ISOLADAS DE ALFACES
/ Patrícia Batista Rocha. -- Rio de Janeiro, 2017.
60 f.

Orientadora: Raquel Regina Bonelli.
Coorientadora: Larissa Alvarenga Batista Botelho.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. ESBL. 2. Pseudomonas. 3. Alfases. I. Regina
Bonelli, Raquel , orient. II. Alvarenga Batista
Botelho, Larissa, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Patrícia Batista Rocha**
 DRE: 114009457

BANCA EXAMINADORA: Profa. Beatriz Meurer Moreira (Presidente)
 Dr. Laís Lisboa Corrêa
 Suzanne de Oliveira Nunes
 Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Suplente)

Título da Monografia: **“Betalactamases de espectro estendido entre
 bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de alfaces”**

Local: Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica/ Instituto de
 Microbiologia Paulo de Góes / CCS/ UFRJ

Data e hora de início: 30 de novembro de 2017 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2017.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>Beatriz Meurer Moreira</u> Profa. Beatriz Meurer Moreira
<u>10,0</u>	<u>Laís Lisboa Corrêa</u> Dr. Laís Lisboa Corrêa
<u>10,0</u>	<u>Suzanne de Oliveira Nunes</u> Suzanne de Oliveira Nunes
	<u>Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto</u> Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto
Aluno:	<u>Patrícia Batista Rocha</u> Patrícia Batista Rocha
Orientador:	<u>Raquel Regina Bonelli</u> Profa. Raquel Regina Bonelli
Coorientador:	<u>Larissa Alvarenga Batista Botelho</u> Dra. Larissa Alvarenga Batista Botelho
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha avó Diva Ignácia Evangelista Frittelli (*in memoriam*), que escreveu em meu livro de comemorações palavras que me ajudaram muito em determinado momento de minha vida. Graças a essas palavras, eu comecei essa segunda graduação. Graças a essas palavras, estou me formando novamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas pessoas que Ele colocou em meu caminho, pelas oportunidades que surgiram na minha vida, pelo livre arbítrio de escolher e por me mostrar de várias formas que nunca estive só.

Agradeço a meus pais Paulo e Madalena pelo amor, pelo total apoio em minhas escolhas, pela paciência, pela educação que me deram e por me ensinarem a superar as dificuldades.

Agradeço aos meus irmãos Eduardo e Lucas pela ajuda nas tarefas do dia-a-dia, pelo companheirismo e por sempre conseguirem arrancar um sorriso de mim.

Agradeço à minha avó Diva (*in memorian*) e à minha tia (e madrinha) Maria Isabel por me ensinarem que, mesmo com muitos obstáculos, é possível vencer na vida, através de muita luta. Vocês são minhas melhores referências nesse assunto!

Agradeço aos meus tios e primos por sempre torcerem por mim e acreditarem no meu potencial.

Agradeço aos meus escoteiros e a todo o 98º Grupo Escoteiro do Ar Bartolomeu Lourenço de Gusmão por alegrarem meus sábados e por terem paciência com as minhas eventuais ausências em atividades por conta da faculdade. A vocês, meu grato, gratíssimo!

Agradeço aos meus amigos, em especial à Luciana e Beatriz, por apoiarem minha decisão de começar essa graduação, por compreenderem minha ausência em alguns momentos ao longo desses 4 anos e por me proporcionarem momentos inesquecíveis e de boas gargalhadas.

Agradeço ao meu namorado João Henrique pelo carinho, pelo companheirismo, por ouvir meus desabafos, por me apoiar, por me estimular a ser melhor, por me fazer crescer e por me fazer feliz.

Agradeço a toda equipe do LImm/UFRJ pelo ambiente de muita alegria, pela amizade e carinho, por me ensinarem técnicas novas, pelos breves momentos de descontração e por me fazerem sentir muito prazer em trabalhar em um laboratório onde todos compartilham dos mesmos sentimentos.

Agradeço à minha orientadora Raquel Bonelli e à minha coorientadora Larissa Botelho pela paciência em me ensinarem e por aceitarem o desafio de me orientar com esse trabalho.

Agradeço à FAPERJ pela bolsa de iniciação científica concedida a mim pelo período de 2 anos.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amores de quatro patas: aos meus cachorros Thor (*in memorian*) e Skip, e às minhas gatinhas Bigode, Jojo e Lu. Meus anjinhos que me fizeram rir quando eu queria chorar, que me fizeram companhia em noites longas e que, certamente, fizeram a minha vida ser mais feliz.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

(Albert Einstein)

RESUMO

PATRÍCIA BATISTA ROCHA

BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO ENTRE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Pseudomonas* ISOLADAS DE ALFACES

Orientadora: Raquel Regina Bonelli

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Betalactamases de espectro estendido (ESBL) consistem em um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, além de monobactâmicos. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são ubíquias, podendo estar presentes em diversos ambientes como solo, água, animais, vegetais e hospitais. Possuem mecanismos de resistência intrínsecos (como a produção de AmpC e baixa permeabilidade de membrana) e adquiridos a betalactâmicos, sendo capazes de produzir ESBL. As ESBL estão disseminadas em vários ambientes e reservatórios, mas é pouco frequente sua descrição em bactérias isoladas de vegetais. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de ESBL em 246 bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de alfaces utilizando cefepime 2 µg/mL como pressão seletiva. A coleção de trabalho foi definida após determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de cefepime sobre estas amostras, em concentrações que variaram de 1 a 32 µg/mL. Quarenta e cinco amostras com CMI ≥ 16 µg/mL foram consideradas resistentes e submetidas a teste fenotípico para detecção presuntiva de ESBL, utilizando discos de piperacilina (100 µg), ceftazidima (30 µg) e piperacilina-tazobactam (100 µg-10 µg). Os discos com piperacilina e ceftazidima foram dispostos a 20 e 15 mm de distância, de centro a centro, do disco contendo tazobactam. Vinte e quatro amostras apresentaram discreta distorção de halo na presença do inibidor de betalactamases, indicando a possível produção de ESBL nessas amostras. Genes codificadores de ESBL do tipo TEM, SHV, GES, CTX-M, PER, VEB e OXA foram pesquisados nestas amostras usando protocolos de PCR simplex e multiplex. Apenas quatro amostras foram positivas na detecção de genes, tendo sido detectados *bla*_{TEM} (n=2), *bla*_{OXA}_{grupo1} (n=1), *bla*_{OXA}_{grupo10} (n=1). Estas amostras têm mesma origem de mercado e alface, o que sugere uma contaminação ocasional e não uma ampla disseminação de bactérias carreadoras de ESBL nas alfaces coletadas. No entanto, devido à inespecificidade das PCR's e ao fenótipo não muito típico apresentado pelas amostras, são necessários testes adicionais, como sequenciamento de produtos de PCR, para confirmação da presença e identidade desses genes nas amostras identificadas como possíveis produtoras de ESBL. Por fim, *Pseudomonas* sp. podem não ser importantes agentes disseminadores de ESBL em alfaces comercializadas na cidade do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: ESBL, *Pseudomonas*, alfaces, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}

ABSTRACT

PATRICIA BATISTA ROCHA

EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE AMONG BACTERIA GENUS *Pseudomonas* ISOLATED FROM LETTUCES

Orientadora: Raquel Regina Bonelli

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) are an important mechanism of resistance to beta-lactam antimicrobials. These enzymes are capable of hydrolyzing the beta-lactam ring of penicillins; first, second, third and fourth generation cephalosporins; as well as monobactams. Bacteria of the genus *Pseudomonas* are ubiquitous, and may be present in different environments such as soil, water, animals, vegetables and hospitals. They have intrinsic resistance mechanisms to beta-lactams (such as the production of AmpC, and low membrane permeability), and may also produce acquired beta-lactamases, including ESBL. ESBLs are widespread in various environments and reservoirs, but rarely described in bacteria isolated from vegetables. The present study aimed to investigate the occurrence of ESBL in 246 bacteria of the genus *Pseudomonas* isolated from lettuces using cefepime 2 µg/mL as selective pressure. The study collection was defined after determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of cefepime on these samples at concentrations ranging from 1 to 32 µg/mL. Forty-five isolates with MIC \geq 16 µg/mL were considered resistant and subjected to a phenotypic test for presumptive ESBL detection using discs impregnated with piperacillin, ceftazidime, and piperacillin-tazobactam. Distortion in the presence of the tazobactam was observed in twenty-four isolates, suggesting the production of ESBL. Genes encoding TEM, SHV, GES, CTX-M, PER, VEB and OXA beta-lactamases were screened in these isolates using simplex and multiplex PCR protocols. Only four isolates provided positive results, being identified *bla*_{TEM} (n = 2), *bla*_{OXAgroup1} (n = 1), and *bla*_{OXAgroup10} (n = 1). These isolates were obtained from the same market and a single lettuce source, which suggests an occasional contamination and not a dissemination of ESBL producers in the collected lettuces. However, due to the non-specificity of PCRs and the unclear ESBL phenotype presented by the isolates, additional tests such as PCR product sequencing, are required to confirm the presence and identity of these genes in the isolates identified as possible ESBL producers. *Pseudomonas* sp. are not important ESBL disseminating agents in lettuces marketed in the city of Rio de Janeiro.

Key-words: ESBL, *Pseudomonas*, lettuces, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de penicilinas ativas contra microrganismos gram-negativos e inibidores de betalactamases de estrutura betalactâmica.....	4
Figura 2 - Estrutura de cefalosporinas, carbapenemas, monobactâmicos e de inibidores de betalactamases de estrutura não betalactâmica.....	5
Figura 3 - Diagrama representando a classificação de betalactamases segundo Bush e Jacoby (2010).....	9
Figura 4 - Distribuição das amostras de <i>Pseudomonas</i> sp. incluídas neste estudo conforme a CMI para cefepime.....	27
Figura 5 - Fenótipos observados no teste de disco aproximação para as amostras controle e duas amostras da coleção.....	29
Figura 6 - Gel representativo demonstrando a amplificação de gene que codifica rRNA 16S para 20 das 25 amostras testadas.....	30
Figura 7 - Resultado da PCR para detecção de <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{GES}</i> , utilizando temperatura de anelamento 54° C (Campana, 2013).....	30
Figura 8 - Resultado da PCR teste com aumento de temperatura de anelamento para detecção de <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{GES}</i>	31
Figura 9 - Resultado da PCR para detecção de <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{GES}</i> , utilizando como temperatura de anelamento 60°C.....	31
Figura 10 - Resultado das PCR simplex para pesquisa de <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{TEM}</i> em amostras que apresentaram bandas dentro do tamanho esperado nas reações multiplex realizadas para os mesmos genes.....	32
Figura 11 - Resultado da PCR para detecção de <i>bla_{CTX-M-grupo1 e grupo2}</i> , <i>bla_{CTX-M-grupo8}</i> e <i>bla_{CTX-M-grupo9}</i> , utilizando temperatura de anelamento 54° C (Campana, 2013).....	33
Figura 12 - Resultado das PCR teste com aumento de temperatura de anelamento para detecção de <i>bla_{CTX-M-grupo1 e grupo2}</i> , <i>bla_{CTX-M-grupo8}</i> e <i>bla_{CTX-M-grupo9}</i>	34
Figura 13 - Resultado da PCR para detecção de <i>bla_{CTX-M-grupo1 e grupo2}</i> , <i>bla_{CTX-M-grupo8}</i> e <i>bla_{CTX-M-grupo9}</i> , utilizando como temperatura de anelamento 58°C.....	34
Figura 14 - Resultado das PCR simplex realizadas para pesquisa de genes <i>bla_{CTX-M-grupo8}</i> e <i>bla_{CTX-M-grupo9}</i> em amostras onde bandas de tamanho esperado foram previamente identificadas por reações multiplex.....	35
Figura 15 - Reação multiplex para detecção de <i>bla_{OXA-grupo1}</i> , <i>bla_{OXA-grupo2}</i> , <i>bla_{OXA-grupo10}</i> e <i>bla_{OXA-grupo18-45}</i>	36
Figura 16 - Resultado das PCR simplex para pesquisa de genes <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i> e <i>bla_{OXA-10}</i> nas amostras que apresentaram bandas na altura esperada utilizando reação multiplex.....	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Número total de amostras do gênero <i>Pseudomonas</i> isoladas a partir da pressão seletiva de MC suplementado de 2 µg/mL de cefepime, segundo cultivo de alface, mercado e coleta.....	22
Quadro 1 - Sequência de Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de ESBL.....	25
Tabela 2 - Número de amostras de <i>Pseudomonas</i> com CMI para cefepime igual ou maior a 16 µg/mL, conforme seu cultivo de alface, mercado e coleta.....	28
Tabela 3 - Características das amostras de <i>Pseudomonas</i> possivelmente produtoras de ESBL segundo resultados genotípicos quanto à sua origem, identificação e perfil fenotípico de resistência a betalactâmicos selecionados.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-ACA: Ácido 7- α -aminocefalosporínico
 μ g: micrograma (unidade de medida)
 μ L: microlitro (unidade de medida)
Arg164: Arginina na posição 164
Arg244: Arginina na posição 244
Arg276: Arginina na posição 276
ATCC: *American Type Culture Collection*
CAZ: Ceftazidima (disco)
CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*
CMI: Concentração mínima inibitória
CPM: Cefepime
D-Ala-D-Ala: 2 Alaninas na configuração D
DNA: ácido desoxirribonucleico
E. coli O157:H7: *E. coli* enterohemorrágica sorotipo O157:H7
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL: *Extended spectrum beta-lactamase* (Betalactamases de espectro estendido)
GC: Cefalosporina de “n” geração
GlcNAc: N-acetilglicosamina
GlcNAc-MurNAc-pp: cadeias pentapeptídicas de N-acetilglicosamina e Ácido N-acetilmurâmico
Glu104: Ácido Glutâmico na posição 104
Glu240: Ácido Glutâmico na posição 240
Gly238: Glicina na posição 238
Gly157Asp: Glicina na posição 157 sendo substituída por Aspartato
Gly170Asn: Glicina na posição 170 sendo substituída por Asparagina
Gly170Ser: Glicina na posição 170 sendo substituída por Serina
MALDI-TOF: *Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight*
Mm: milímetro
MurNAc: Ácido N-acetilmurâmico
pAmpC: AmpC plasmidiais
Pb: pares de bases
PBPs: Proteínas Ligantes de Penicilina
PCR: *Polimerase chain reaction*
PIP: piperacilina (disco)
Pp: pentapeptídica
PSE: *Pseudomonas Specific Enzyme*
ST69: *Multilocus sequence type*
TSA: *Trypticase soy agar*
TZP: Piperacilina:tazobactam (disco)
UDP-MurNAc: Uridina difosfato ácido N-acetilmurâmico
UFC: unidades formadoras de colônia

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Betalactâmicos.....	1
1.1.1 Estrutura comum e mecanismo de ação.....	1
1.1.2 Breve histórico e características das subclasses de betalactâmicos	1
1.2 Betalactamases.....	8
1.2.1 ESBL.....	11
1.3 Gênero <i>Pseudomonas</i>	13
1.3.1 Mecanismos de resistência aos betalactâmicos no gênero <i>Pseudomonas</i>	13
1.4 Disseminação de ESBL em ambiente e alimentos	17
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Origem e características das amostras	22
4.2 Definição da coleção de estudo: avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) de cefepime.....	22
4.3 Teste fenotípico por disco difusão.....	23
4.4 Extração de DNA e detecção do gene 16S	24
4.5 Detecção dos genes de ESBL por PCR	24
5. RESULTADOS	27
5.1 Concentração mínima inibitória (CMI) de Cefepime.....	27
5.2 Fenótipo ESBL	28
5.3 PCR.....	29
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Betalactâmicos

1.1.1 Estrutura comum e mecanismo de ação

Os betalactâmicos são antimicrobianos que atuam interferindo na síntese de peptideoglicano, um componente importante da parede celular bacteriana. A unidade fundamental do peptideoglicano consiste em monômeros de N-acetilglicosamina (no inglês *N-acetyl-D-glucosamine*, GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (no inglês *N-acetyl-Muramic-Acid*, MurNAc) ligado a uma cadeia pentapeptídica (pp) que em seu terminal apresenta dois resíduos de alanina (D-Ala-D-Ala). Na formação do peptideoglicano, longas cadeias de GlcNAc-MurNAc-pp são interligadas transversalmente entre si pela ação de enzimas transpeptidases. Neste processo, o terminal D-Ala-D-Ala do pentapeptídeo é essencial para o reconhecimento da enzima e para a reação de transpeptidação (Neu, 1985a; Madigan *et al.*, 2010).

Considerando aspectos estruturais, betalactâmicos são divididos em quatro subclasses: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactâmicos. Apesar de apresentarem variações, estas subclasses apresentam em comum, em sua estrutura, a ocorrência do anel betalactâmico. Este anel é essencial para a atividade antimicrobiana, uma vez que sua estrutura tridimensional mimetiza o terminal D-Ala-D-Ala. Tal similaridade faz com que as transpeptidases interajam com a droga, formando um intermediário acetilado estável que implica na inibição da síntese do peptideoglicano. A possível interação entre as transpeptidases e o anel betalactâmico fez com que estas enzimas, no contexto da microbiologia, passassem a ser também conhecidas como Proteínas Ligantes de Penicilina (no inglês *Penicillin Binding Proteins* ou PBPs) (Suárez e Gudiol, 2009; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014).

1.1.2 Breve histórico e características das subclasses de betalactâmicos

1.1.2.1 Penicilinas

Em 1928, Alexander Fleming, médico pesquisador, descobriu uma substância capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* em placas de Petri. Essa substância recebeu o nome de penicilina, uma vez que foi produzida a partir do mofo causado por *Penicillium notatum*, e entrou para a história como o primeiro agente da era dos antimicrobianos produzidos comercialmente. A partir dessa descoberta, outros pesquisadores passaram a realizar estudos a

fim de compreender a estrutura e as propriedades da penicilina e, como resultado, foi observado que esse agente conseguia tratar infecções em camundongos. Nos anos seguintes, procedimentos para obtenção de penicilina mais purificada implicaram na produção comercial da penicilina G (também chamada de benzilpenicilina), o que culminou com sua introdução na clínica humana em 1941 (Neu, 1985a; ACS, 2017).

Estruturalmente, as penicilinas são formadas por três componentes: o anel tiazolidina; o anel betalactâmico; e uma cadeia lateral derivada de ácido D- α -aminoadípico, que determina muitas de suas propriedades farmacológicas incluindo a extensão de seu espectro antimicrobiano (Suárez e Gudiol, 2009) (Figura 1). Com o sucesso no tratamento de infecções estreptocócicas, gonocócicas e treponêmicas, a penicilina passou a ser utilizada e produzida em grande escala na 2ª Guerra Mundial (Neu, 1985a; ACS, 2017). No entanto, com a difusão do uso de penicilina para o tratamento de variadas infecções, em 1944, em decorrência de genes codificadores de penicilinasas, surgiram as primeiras amostras clínicas de *S. aureus* resistentes à penicilina (Kirby, 1944 *apud* Tavares, 2000). O aumento das taxas de resistência à penicilina observado nos anos 1950 levou à pesquisa por novas variantes destas drogas que pudessem ser resistentes à ação das penicilinasas. A partir do isolamento do núcleo de penicilina (formado pelos anéis betalactâmico e tiazolidina ligados) por Batchelor *et al.* (1959), foi possível o estudo e o desenvolvimento de penicilinas semissintéticas. As primeiras drogas obtidas por esta abordagem tinham como principal característica a resistência às penicilinasas descritas em *Staphylococcus*. Alguns exemplos são a oxacilina e a meticilina (Tipper, 1985; Nathwani e Wood, 1993).

Por outro lado, a adição de um grupamento amino à cadeia lateral do anel betalactâmico, ainda da década de 1960, levou ao desenvolvimento das aminopenicilinas (Figura 1). Esta subclasse de penicilinas tem como principais representantes a ampicilina e a amoxicilina, e é caracterizada por uma melhor absorção oral e maior espectro de ação em comparação às penicilinas até então desenvolvidas, sendo ativas também contra microrganismos gram-negativos (Tipper, 1985; Essack, 2001). Graças a estas características, as aminopenicilinas foram rapidamente incorporadas como alternativa terapêutica para uma série de infecções. No entanto, falhas terapêuticas associadas ao seu uso evidenciaram, em poucos anos, a ocorrência de betalactamases também em bactérias gram-negativas de importância clínica (Nathwani e Wood, 1993). Em resposta a este cenário, ao final da década de 1970 e início de 1980, aumentaram as evidências da possibilidade de combinação destas drogas com inibidores de betalactamases, como o ácido clavulânico e o sulbactam (Reeves, Bywater e Holt, 1978;

Aronoff *et al.*, 1984) (Figura 1). A combinação de aminopenicilinas com inibidores de betalactamase é uma estratégia terapêutica utilizada até os dias de hoje.

Também na década de 1960, a adição de um radical ácido carboxílico ao anel betalactâmico marcou o desenvolvimento das carboxipenicilinas, cuja primeira representante foi a carbenicilina, seguida alguns anos depois pelo lançamento da ticarcilina, com melhor atividade antipseudomonas (Rolinson e Sutherland, 1967; Rodriguez, Inagaki e Bodey, 1973; Essack, 2001) (Figura 1). Outra penicilina antipseudomonas desenvolvida durante os anos 1970 foi a piperacilina, principal representante das ureidopenicilinas, que tem sua particularidade estrutural baseada na incorporação de um radical piperazina à molécula (Fu e Neu, 1978) (Figura 1). Carboxipenicilinas e ureidopenicilinas distinguem-se das demais subclasses de penicilinas por apresentarem estabilidade às betalactamases cromossômicas do tipo AmpC, viabilizando seu emprego para o tratamento de infecções causadas por microrganismos como *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. (Essack, 2001). As combinações ticarcilina:ácido clavulânico e piperacilina:tazobactam são até os dias de hoje extensivamente empregadas na clínica médica (Drawz e Bonomo, 2010).

1.1.2.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas, produzidas por fungos do gênero *Cephalosporium*, foram descobertas em 1945 e disponibilizadas para amplo uso clínico cerca de 20 anos depois (Mandell, 1985). Estruturalmente, as cefalosporinas diferem das penicilinas pelo anel dihidroxitiazina associado ao anel betalactâmico, formando uma estrutura chamada ácido 7- α -aminocefalosporínico (no inglês 7- α -aminocephalosporinic acid; 7-ACA) (Essack, 2001; Suárez e Gudiol, 2009) (Figura 2). De maneira geral, as cefalosporinas apresentam um espectro bacteriano mais amplo e são mais resistentes à ação de algumas betalactamases, quando comparadas com as penicilinas (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014).

Assim que foram lançadas, as cefalosporinas de primeira geração (1^ªGCs), que incluem drogas como cefalotina e cefazolina, passaram a ser amplamente utilizadas em profilaxia cirúrgica, graças às suas boas propriedades farmacocinéticas, atividade antiestafilococos e atividade contra bacilos gram-negativos (Sabath, 1989; Asbel e Levison, 2000). Em muitos hospitais com perfil epidemiológico de alta prevalência de *S. aureus* sensíveis a betalactâmicos, a cefazolina é ainda hoje uma opção de antibioticoprofilaxia cirúrgica (CCIH-UFRJ, 2012; CCIH-Hospital Sírio Libanês, 2014).

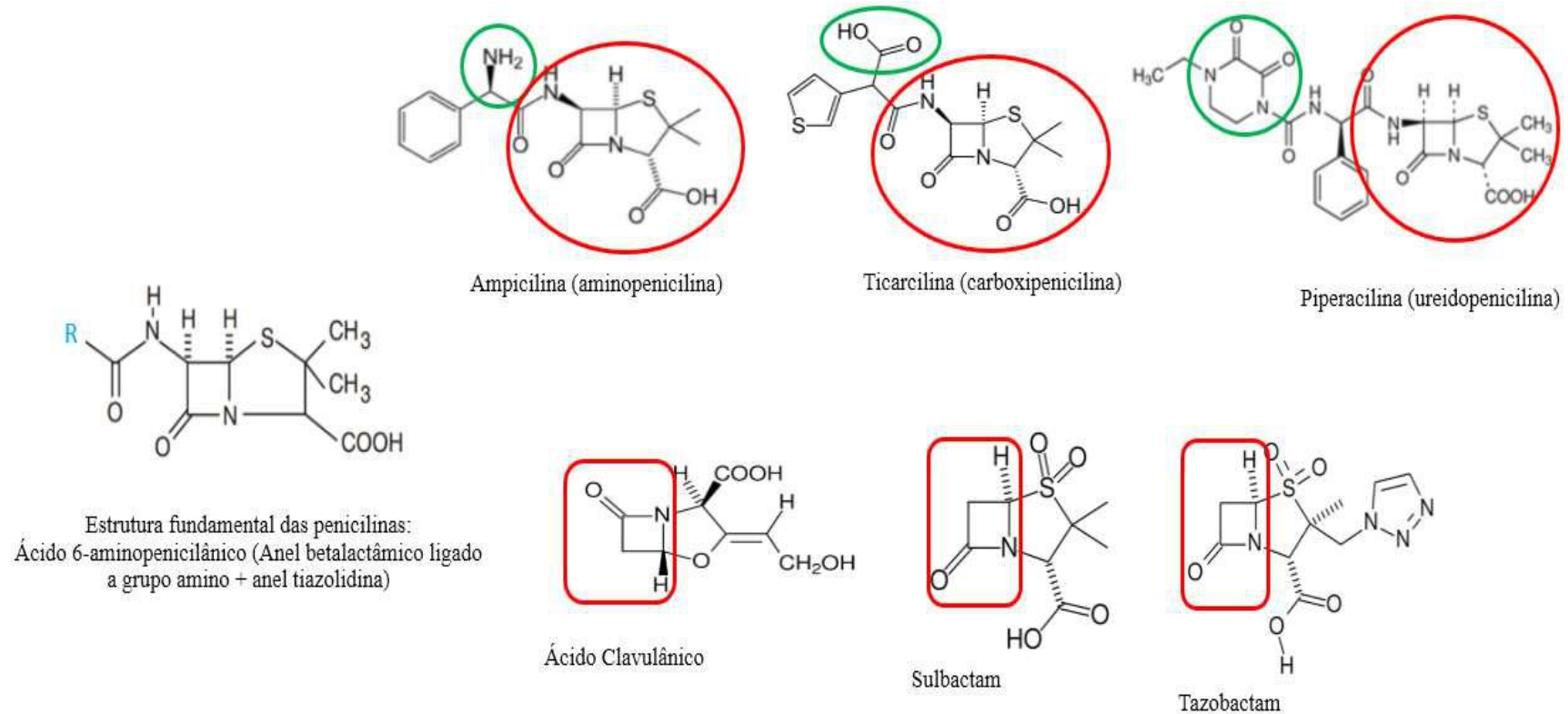


Figura 1 - Estrutura de penicilinas ativas contra microrganismos gram-negativos e inibidores de betalactamases de estrutura betalactâmica. Estrutura fundamental das penicilinas (à esquerda); penicilinas semi-sintéticas (superior, à direita) com seus respectivos grupos substituintes específicos (destacados em verde) e com o núcleo ácido 6 aminopenicilânico (destacado em vermelho). Inibidores de betalactamases com estrutura betalactâmica (destacado em vermelho) (inferior, à direita). R (azul): radical

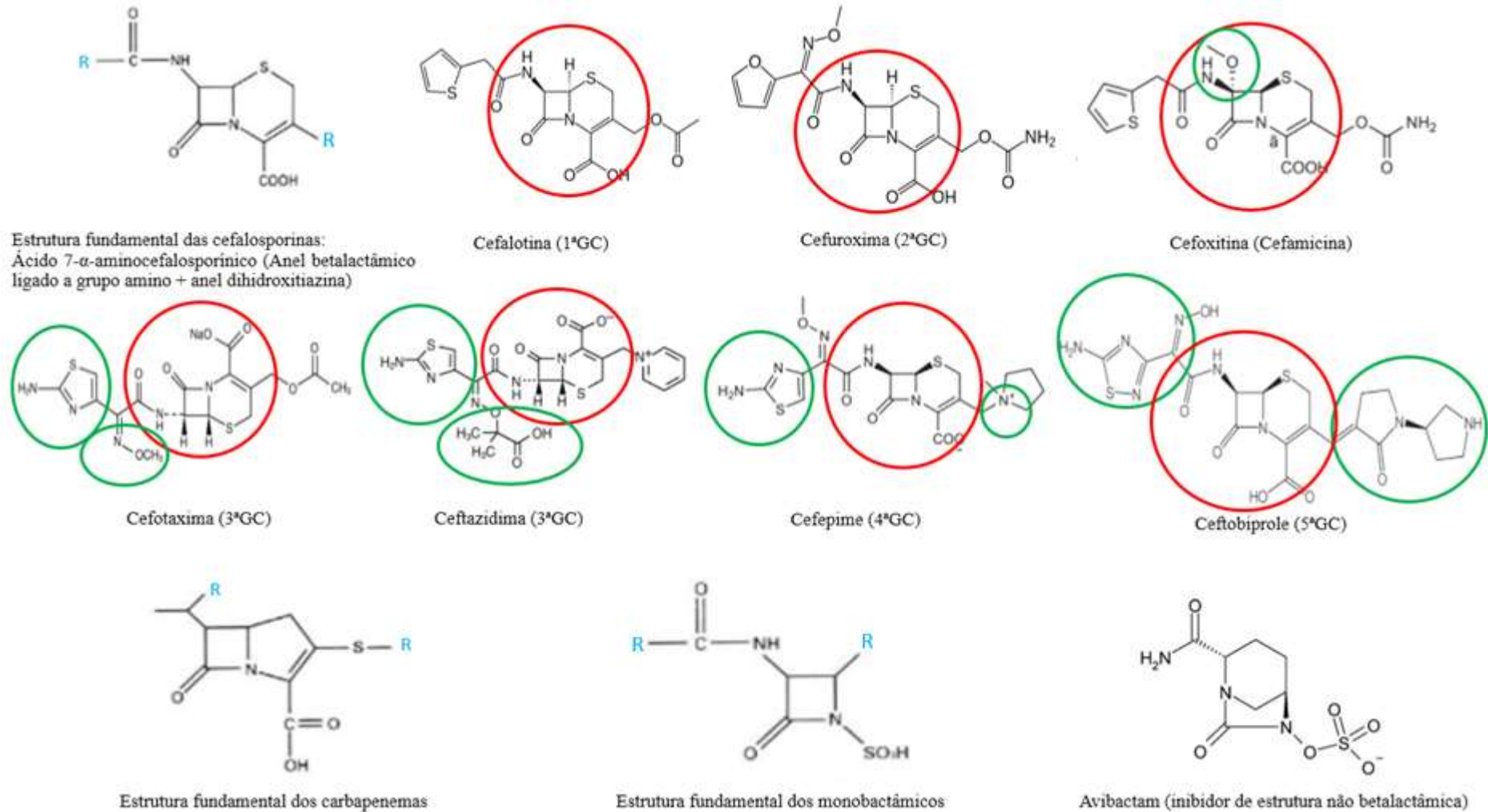


Figura 2 - Estrutura de cefalosporinas, carbapenemas, monobactâmicos e de inibidores de betalactamases de estrutura não betalactâmica. Estrutura fundamental das cefalosporinas (à esquerda, superior); cefalosporinas de 1^aGC, 2^a GC, cefamicinas; 3^a GC e 4^a GC com seus respectivos grupos específicos (destacados em verde) e núcleo ácido 7- α -aminocefalosporínico (destacado em vermelho). R (azul): radical

Em comparação com as 1^aGCs, as cefalosporinas de segunda geração (2^aGCs), como a cefuroxima, apresentam melhor atividade contra bactérias gram-negativas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. e maior estabilidade contra betalactamases do tipo TEM e SHV clássicas (de espectro restrito) e cefalosporinases cromossomais da classe C (Essack, 2001). Estas características fazem com que microrganismos como *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. sejam incluídos no seu espectro de ação (Tartaglione e Polk, 1985; Sader e Jones, 1992).

Consideradas por alguns autores um subgrupo das 2^aGCs, as cefamicinas, cuja principal representante é a cefoxitina, tem a mesma estrutura fundamental das cefalosporinas, com a adição de um grupo metoxi ao mesmo carbono do 7-ACA onde se liga a cadeia lateral (C-7) (Figura 2). Compostos contendo grupos 7- α -metoxi são ativos contra microrganismos gram-negativos, mas atuam como excelentes indutores de expressão de betalactamases cromossomais, especialmente entre os gêneros *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., o que na prática seleciona linhagens com expressão desreprimida destas enzimas. Cefamicinas são consideradas excelentes antimicrobianos contra gram-negativos anaeróbicos, como *Bacteroides* spp. (Sader e Jones, 1992; Essack, 2001).

As cefalosporinas de terceira geração (3^aGCs) representam uma evolução importante no desenvolvimento das cefalosporinas. Estas drogas possuem grupamentos aminotiazolil e iminometoxi como substituintes, o que promove uma melhor estabilidade frente às betalactamases cromossômicas de classe C e aumento de espectro de atividade com relação às gerações anteriores de cefalosporinas (Essack, 2001) (Figura 2). Cefalosporinas de terceira geração podem ser divididas, de modo geral, em dois subgrupos: as que apresentam atividade significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*, como por exemplo ceftazidima e cefoperazona, e as que com atividade antipseudomonas mais discreta. Neste último grupo estão incluídas drogas como ceftriaxona e cefotaxima (Sader e Jones, 1992).

Cefotaxima é a mais utilizada 3^aGC, apresentando potente atividade contra *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. produtoras de betalactamases de espectro restrito; no entanto sua performance contra *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* é mais inconsistente. Apresenta também moderada atividade contra anaeróbios gram-positivos. Ceftriaxona tem espectro de ação semelhante à cefotaxima, mas apresenta diferentes propriedades farmacocinéticas. Ceftazidima, por sua vez, é a 3^aGC menos ativa contra cocos gram-positivos, mas seu espectro de ação é semelhante ao da cefotaxima contra a maioria das enterobactérias, além de ser a mais potente cefalosporina contra *P. aeruginosa* (Sader e Jones, 1992).

A partir da década de 1990, a emergência de betalactamases de espectro estendido (no inglês *extended spectrum beta-lactamase*, ESBL) e de betalactamases do tipo AmpC plasmidiais (pAmpC, as quais são expressas em níveis muito mais elevados do que as AmpC cromossomais sujeitas à regulação gênica) entre microrganismos gram-negativos passou a comprometer a efetividade das 3^aGCs no contexto clínico (Sader e Jones, 1992). Este desafio levou ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas como a combinação de ceftazidima com avibactam (um não betalactâmico inibidor de betalactamases do tipo ESBL, AmpC e algumas OXA; Figura 2) para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* e microrganismos da família *Enterobacteriaceae* carreadoras de ESBL e produtoras de AmpC (Zhanel *et al.*, 2013; Pitart *et al.*, 2015).

Modificações adicionais nas moléculas de cefalosporinas levaram ao desenvolvimento das cefalosporinas de quarta geração (4^aGCs), que tem como representantes cefepime e ceftiproma. A incorporação de um grupamento 7-aminotiazolil e carga positiva no nitrogênio quaternário em C-3 do 7-ACA, que caracteriza estas drogas, aumentou a estabilidade das mesmas frente a *P. aeruginosa* e enterobactérias produtoras betalactamases intrínsecas, além de ter ampliado o espectro de ação, em comparação às 3^aGCs (Figura 2) (Asbel e Levison, 2000; Essack, 2001). Dessa forma, 4^aGCs possuem atividade antipseudomonas, ação sobre bactérias gram-negativas e cocos gram-positivos (Sader e Jones, 1992; Suárez e Gudíol, 2009).

Por fim, mais recentemente uma quinta geração de cefalosporinas (5^aGCs) foi desenvolvida com ênfase na expansão da atividade de cefalosporinas contra microrganismos gram-positivos, notadamente os *S. aureus* resistentes a meticilina (no inglês *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA). MRSA tem seu mecanismo de resistência fundamentado na aquisição de uma PBP alternativa, denominada PBP2a. Esta enzima difere das PBP regularmente encontradas em *Staphylococcus* e o espectro de resistência alcançado com sua produção se estende a praticamente todos os betalactâmicos, com exceção à ceftobiprole e ceftarolina. Tais cefalosporinas, representantes das 5^aGCs, apresentam afinidade à molécula PBP2a (Fuda *et al.*, 2004; Bassetti *et al.*, 2013; Ghamrawi, Neuner e Rehm, 2015). O ceftobiprole também é efetivo contra microrganismos gram-negativos, possuindo atividade antipseudomonas (Figura 2) (Kisgen e Whitney, 2008).

1.1.2.3 Carbapenemas

Os carbapenemas constituem uma terceira subclasse de betalactâmicos, desenvolvida em 1970, a partir da tienamicina, substância obtida de *Streptomyces cattleya* (Neu, 1985b). São betalactâmicos que apresentam estrutura diferenciada pela presença do anel carbapenêmico

fusionado ao anel betalactâmico e o grupamento hidroxietil no lugar do grupamento acilamido encontrado em penicilinas e cefalosporinas. Além disso, os átomos de hidrogênio no carbono 5 (C-5) e carbono 6 (C-6) apresentam orientação *trans*, o que torna os carbapenemas mais estáveis contra hidrólise por betalactamases, principalmente por ESBL e cefalosporinases do tipo AmpC (Figura 2). Imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem compõem essa classe de antimicrobianos. Esses agentes possuem o maior espectro de atividade entre todos os betalactâmicos (Dalhoff, Janjic e Echols, 2006). Devido a esta característica, os carbapenemas são utilizados no tratamento de variadas infecções. Imipenem possui melhor atividade contra cocos gram-positivos, enquanto meropenem e ertapenem são mais eficazes contra bacilos gram-negativos. O doripenem é potente tanto contra microrganismos gram-positivos quanto contra gram-negativos, sendo menos suscetível à hidrólise por carbapenemases (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

1.1.2.4 Monobactâmicos

Na década de 1980, a partir do isolado de *Chromobacterium violaceum*, foram desenvolvidos os monobactâmicos, com uma estrutura monocíclica de betalactâmicos (Neu, 1985b). Essa subclasse de betalactâmicos tem como único representante o aztreonam, sendo indicado no tratamento de algumas infecções causadas por bactérias aeróbias gram-negativas. Aztreonam possui atividade sinérgica contra esses microrganismos quando combinado com aminoglicosídeos (Asbel e Levison, 2000).

1.2 Betalactamases

As betalactamases consistem em um dos mais importantes mecanismos de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos. São enzimas produzidas por microrganismos gram-positivos e gram-negativos que hidrolisam o anel betalactâmico. Os genes responsáveis pela produção de betalactamases podem ser encontrados tanto no cromossomo quanto em plasmídeos, podendo estar associados a elementos geneticamente móveis (Poole, 2004).

Quanto ao seu sítio catalítico, as betalactamases podem ser classificadas em dois grupos: serinobetalactamases e metalobetalactamases. No caso das serinobetalactamases, um radical livre de serina realiza um ataque nucleofílico ao anel betalactâmico, gerando uma ligação covalente acil-éster, enquanto que nas metalobetalactamases é o zinco que realiza um ataque nucleofílico ao anel. Em ambos os casos, a consequência é a hidrólise do anel betalactâmico e

a formação de ácidos penicilóicos, que não possuem propriedades antimicrobianas (Wright, 2005).

Há duas classificações aceitas na literatura científica que organizam as betalactamases em diferentes grupos. A classificação de Ambler faz a divisão dessas enzimas em quatro classes (A-D), de acordo com a similaridade de aminoácidos. As classes A, C e D são compostas por serinobetalactamases e a classe B é composta por metalobetalactamases (Ambler, 1980). Por outro lado, a classificação proposta por Bush, Jacoby e Medeiros (1995) baseia-se nas propriedades funcionais das enzimas, como perfis de substratos e inibidores. Ainda que estes critérios sejam até os dias de hoje utilizados como base para toda a classificação de betalactamases, após a identificação de novas enzimas, com diferentes propriedades e estruturas, um novo esquema de classificação foi proposto por estes autores, integrando as propostas previamente publicadas e acrescentando novas subclasses capazes de acomodar com maior especificidade betalactamases com diferentes propriedades funcionais (Bush e Jacoby, 2010). A Figura 3 representa o novo esquema de classificação proposto por Bush e Jacoby (2010) contendo a classe molecular de Ambler (1980), grupos funcionais, subgrupos, substratos em que essas enzimas atuam, perfil inibitório e alguns exemplos de enzimas que se encontram nesses grupos. Além disso, as betalactamases da Figura 3 também foram organizadas segundo seu sítio ativo.

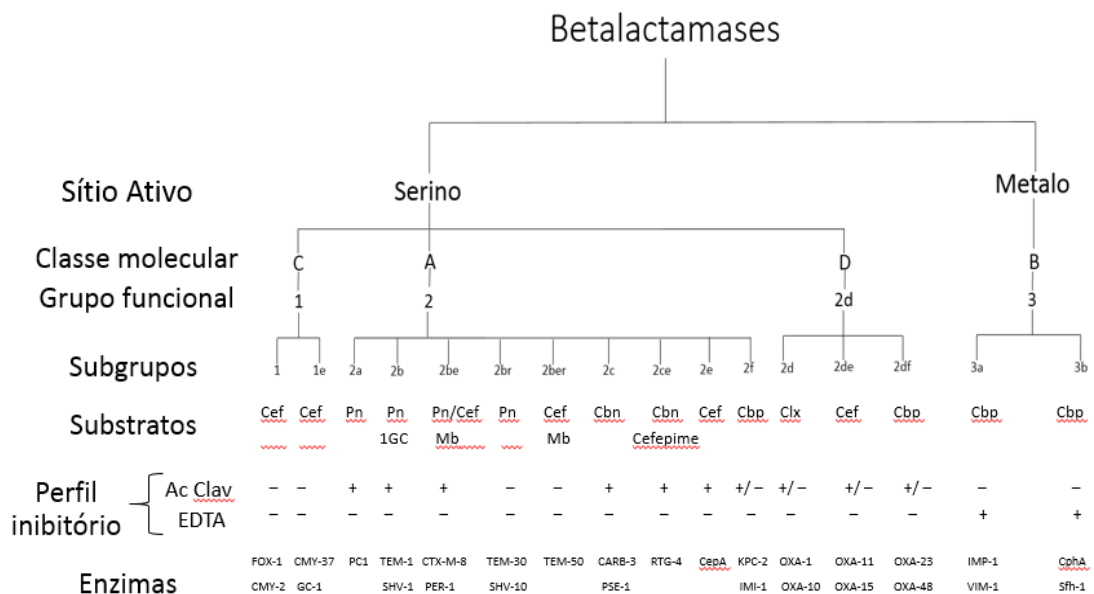


Figura 3 - Diagrama representando a classificação de betalactamases segundo Bush e Jacoby (2010). Cef: cefalosporinas. Pn: penicilinas. Mb: monobactâmicos. Cbn: carbenicilina. Cbp: carbapenemas. Clx: cloxacilina. Ac Clav: ácido clavulânico.

No grupo 1 encontram-se as cefalosporinases pertencentes à classe molecular C, que tem por característica atuar melhor sobre cefalosporinas e cefamicinas do que em benzilpenicilinas, e serem resistentes à inibição por ácido clavulânico. Enzimas como CMY e FOX pertencem a esse grupo. O subgrupo 1e, composto por algumas CMY, como CMY-10, CMY-19 e CMY-37, ganha destaque por apresentar maior atividade contra ceftazidima e outras oximinocefalosporinas (Bush e Jacoby, 2010).

No grupo 2, encontram-se serinobetalactamases, as quais são divididas em subgrupos de acordo com suas especificidades: o subgrupo 2a representa as penicilinases que apresentam melhor hidrólise em benzilpenicilinas do que em cefalosporinas e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, que é o caso das PC1; no subgrupo 2b encontram-se as betalactamases que hidrolisam similarmente benzilpenicilinas e cefalosporinas primárias (como a cefalotina). São inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. Compõem esse subgrupo a maioria das enzimas do tipo SHV e TEM, como por exemplo SHV-1, TEM-1 e TEM-2. O subgrupo 2be compreende as ESBL, que além de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas primárias, também atuam na hidrólise de 3^aGCs, 4^aGCs e monobactâmicos. Várias famílias de enzimas compõem esse subgrupo, incluindo variantes de SHV, TEM, GES e CTX-M, entre muitas outras. Dada sua relevância dentro da proposta do presente projeto, ESBL serão tratadas com maior detalhe em um tópico a seguir (1.2.1). No subgrupo 2br encontram-se penicilinases resistentes à inibição por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, como a TEM-30 e a SHV-10. O subgrupo 2ber é composto por enzimas como TEM-50, que possui a característica do 2be (hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos) e a característica do 2br (resistência à inibição por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam). O subgrupo 2c representa as enzimas que causam uma hidrólise aumentada em carbenicilina e as enzimas do subgrupo 2ce, além de ter esse mesmo efeito em carbenicilina, apresentam também a capacidade de hidrolizar 4^aGCs como cefepime e cefpiroma. Sendo representados por enzimas da família OXA, os subgrupos 2d (hidrolisam cloxacilina e oxacilina), 2de (hidrolisam cloxacilina, oxacilina e oximinobetalactâmicos) e 2df (hidrolisam cloxacilina, oxacilina e carbapenemas) são os únicos do grupo 2 que pertencem à classe molecular D, enquanto todos os outros subgrupos pertencem à classe A. O subgrupo 2e concentra cefalosporinases de espectro estendido que são inibidas por ácido clavulânico, mas não por aztreonam, como por exemplo a CepA. Como última subclasse no grupo 2, no subgrupo 2f estão agrupadas as serinobetalactamases carbapenemases (KPC-2, IMI-1, SME-1) que são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (Bush e Jacoby, 2010).

Enzimas pertencentes à classe molecular B de Ambler (1980), que possuem zinco no seu sítio ativo, foram agrupadas por Bush e Jacoby no grupo 3. São metalobetalactamases, passíveis à inibição pelo quelante de íons metálicos EDTA. O grupo 3 apresenta subdivisões estruturais (B1, B2 e B3) e funcionais (3a, 3b, 3c). Dentro do subgrupo 3a, onde encontram-se as principais famílias codificadas por plasmídeos (como IMP, VIM e NDM), estão categorizadas as enzimas de classe B1 e B3, devido à similaridade funcional que apresentam, sendo capazes de hidrolisar um amplo espectro de betalactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas, mas não monobactâmicos. O subgrupo 3b representa as enzimas de classe molecular B2 (CphA, Sfh1), as quais possuem a característica de hidrolisar preferencialmente carbapenemas, em contraste com penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Bush e Jacoby, 2010; Tada *et al.*, 2014).

1.2.1 ESBL

Encontradas primeiramente em amostras de *Klebsiella*, na década de 1980, na Alemanha, as ESBL constituem um dos mecanismos de resistência mais problemáticos no tratamento de infecções causadas por microrganismos gram-negativos. Sua atividade hidrolítica atinge uma ampla gama de antimicrobianos betalactâmicos e seus genes estão associados a plasmídeos, elementos geneticamente móveis e integrons, o que contribui para o sucesso de sua disseminação (Poirel, Naas e Nordmann, 2008).

As ESBL fazem parte da classe molecular A de Ambler (1980) e do grupo 2be de Bush e Jacoby (2010), o que significa que são serinobetalactamases e são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. Apesar de apresentar suscetibilidade a cefamicinas e carbapenemas, os microrganismos produtores de ESBL podem apresentar resistência a tais antibióticos se neles houver perda de porinas (no caso de carbapenemas) ou se forem concomitantemente produtores de enzimas AmpC (que hidrolisam cefamicinas) (Poole, 2004).

Muitas famílias de enzimas compõem o grupo das ESBL. Entre elas há variações estruturais e de perfil hidrolítico. As famílias SHV e TEM foram as primeiras ESBL descritas. São enzimas que derivaram de TEM-1, TEM-2 e SHV-1, nas quais mutações em sítios específicos levaram a alterações estruturais na cavidade que dá acesso ao sítio catalítico da enzima, incluindo no seu espectro de substratos possíveis 3^aGC e 4^aGC com seus volumosos substituintes (Figura 2). Mutações em Glu104, Arg164, Gly238 e Glu240 em TEM, e Gly238 e Glu240 em SHV, são responsáveis pelo fenótipo de ESBL. Apesar de não ser essencial, o resíduo de Arg276 em TEM, numa posição equivalente a Arg244 em SHV, parece ter um papel

importante na hidrólise de oximinocefalosporinas por estas enzimas (Bradford, 2001; Poole, 2004; Shaikh *et al.*, 2015).

Normalmente não associadas a integrons, ESBL do tipo TEM e SHV são disseminadas por elementos genéticos móveis como transposons e sequências de inserção (Poirel, Naas e Nordmann, 2008). Estas enzimas são comuns em *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e outros membros da família *Enterobacteriaceae*, podendo também ser encontrada em *Burkholderia cepacia*, *Capnocytophaga ochracea*, *Aeromonas* spp., *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* (Bradford, 2001; Poole, 2004; Shaikh *et al.*, 2015).

Enzimas do tipo CTX-M destacaram-se por sua rápida disseminação na década de 2000 (Cantón e Coque, 2006). Betalactamases CTX-M têm sua origem associada ao cromossomo de espécies de *Kluyvera*, de forma que, diferentemente das ESBL TEM e SHV, não foram oriundas de mutações de aminoácidos em enzimas de espectro restrito previamente caracterizadas. Sua disseminação está associada à transferência horizontal de genes, através de plasmídeos conjugativos, transposons e sequências de inserção, frequentemente associados a integrons (Poirel, Naas e Nordmann, 2008; Cantón, González-Alba e Galán, 2012; Shaikh *et al.*, 2015). A atividade hidrolítica de enzimas CTX-M é maior sobre cefotaxima do que sobre ceftazidima, podendo também hidrolisar cefepime. São melhor inibidas por tazobactam do que por ácido clavulânico ou sulbactam (Bradford, 2001; Bush e Jacoby, 2010; Shaikh *et al.*, 2015). Em função de suas sequências de aminoácidos, betalactamases CTX-M podem ser divididas 5 grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25) com um grande número de variantes compondo cada um deles. São encontradas em vários membros da família *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* e *Shigella sonnei*, além de bactérias de outras famílias, como é o caso da espécie *Vibrio cholerae* (Bradford, 2001; Poole, 2004; Cantón, González-Alba e Galán, 2012).

As enzimas do tipo OXA pertencentes ao grupo 2 de Bush e Jacoby também podem ser consideradas ESBL devido ao seu perfil hidrolítico. São relativamente raras, encontradas na maioria das vezes em *P. aeruginosa*, podendo também ser identificadas em outras bactérias gram-negativas (Bradford, 2001; Poole, 2004; Shaikh *et al.*, 2015). Muitas enzimas dessa família são derivadas de OXA-10, como é o caso de OXA-11, OXA-14 e OXA-16, entre outras. As substituições de alguns aminoácidos conferem a estas enzimas o fenótipo de ESBL. Dentre essas substituições, destaca-se Gly157Asp, que é necessária para a resistência à ceftazidima (Bradford, 2001; Strateva e Yordanov, 2009). Genes codificadores de ESBL do tipo OXA

podem estar localizados em plasmídeos ou no cromossomo, mas não estão associados a integrons (Poole, 2004; Bush e Jacoby, 2010).

ESBL como BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, IBC-1, IBC-2 são de disseminação mais restrita e têm sua ocorrência associada a um número limitado de gêneros bacterianos. Especificamente entre *P. aeruginosa*, são encontradas ESBL pertencentes às famílias VEB, PER e GES (Bradford, 2001; Poole, 2004; Poirel, Naas e Nordmann, 2008; Bush e Jacoby, 2010; Drawz e Bonomo, 2010; Shaikh *et al.*, 2015).

1.3 Gênero *Pseudomonas*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilos gram-negativos, possuem flagelo polar, são aeróbias estritas, não fermentadores, catalase e oxidase positivas. São ubiqüitárias, não possuindo muitas exigências nutritivas, o que permite sua adaptação a diversos ambientes como água, solo, alimentos, animais e ambientes hospitalares. Possuem adesinas, permitindo sua adesão a superfícies, o que contribui para formação de biofilmes. Algumas espécies podem produzir pigmentos fluorescentes. Dentre as espécies de *Pseudomonas*, a espécie *P. aeruginosa* se destaca por causar diversas infecções oportunistas, sendo algumas nosocomiais, além de possuir diversos mecanismos de virulência (Trabulsi e Alterthum, 2008; Tortora, Funke e Case, 2010; Brooks *et al.*, 2014).

1.3.1 Mecanismos de resistência aos betalactâmicos no gênero *Pseudomonas*

Diferentes mecanismos de resistência a betalactâmicos, intrínsecos e adquiridos, já foram descritos em bactérias do gênero *Pseudomonas*. São relatados na literatura principalmente em *P. aeruginosa*, espécie patogênica que causa infecções oportunistas. Esses mecanismos podem atuar concomitantemente ou de forma isolada e representam um problema na escolha terapêutica para o tratamento das infecções causadas por estes microrganismos.

1.3.1.1 Baixa permeabilidade de membrana: sistema de efluxo e perda de porinas

Em comparação com membros da família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* é mais resistente à ação antimicrobiana devido à presença de eficientes sistemas de efluxo que conectam a membrana citoplasmática à membrana externa, com ampla especificidade de substratos. Trata-se, portanto de um mecanismo de resistência intrínseco e não enzimático, que

afeta betalactâmicos e outras classes de antimicrobianos (Normark e Normark, 2002; Strateva e Yordanov, 2009).

Quatro sistemas de efluxo são bem caracterizados em *Pseudomonas* (MexA–MexB–OprM; MexC–MexD–OprJ, MexE–MexF–OprN; MexX–MexY–OprM), sendo cada sistema composto por uma proteína de membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF, MexY), que funciona como bomba dependente de energia; por uma proteína de membrana externa (OprM, OprJ e OprN); e por uma proteína localizada no periplasma, ligando a proteína de membrana externa com a proteína de membrana citoplasmática (MexA, MexC, MexE, MexX) (Normark e Normark, 2002; Strateva e Yordanov, 2009).

Em relação aos betalactâmicos: o sistema MexA–MexB–OprM tem como substrato todos os betalactâmicos, exceto imipenem; MexC–MexD–OprJ e MexX–MexY–OprM atuam em cefepime, cefpiroma, meropenem e penicilinas, exceto carbenicilina e sulbenicilina; e MexE–MexF–OprN atua apenas em carbapenemas (Normark e Normark, 2002; Strateva e Yordanov, 2009). O sistema MexA–MexB–OprM é expresso constitutivamente em níveis basais, enquanto outros são induzidos a partir da presença de betalactâmicos (Mesaros *et al.*, 2007). A expressão de MexA–MexB–OprM está sujeita a um repressor codificado por *mexR*. Mutações nesse gene levam a uma expressão exacerbada dessas proteínas e, conseqüentemente, ao aumento da resistência aos substratos do sistema (Mesaros *et al.*, 2007; Strateva e Yordanov, 2009).

Os sistemas de efluxo consistem em um importante mecanismo de resistência em *Pseudomonas*, uma vez que reduzem as possibilidades de antimicrobianos a serem utilizados no tratamento de infecções causadas por este microrganismo. No entanto, além de sua ação direta, podem atuar em combinação com outros mecanismos de resistência e favorecer a ocorrência de mutações, estimuladas por baixas concentrações intracelulares de antimicrobianos (Normark e Normark, 2002; Mesaros *et al.*, 2007).

Além do sistema de efluxo, a variada expressão de porinas também afeta a permeabilidade da membrana externa. Entre as porinas que ocorrem em *Pseudomonas* (OprF, OprP/O, OprD, OprB), OprD merece destaque no contexto da resistência aos betalactâmicos, por ser responsável pela entrada de aminoácidos e carbapenemas no periplasma. Duas mutações específicas ocorrem com frequência no gene *oprD*: uma delas é a deleção de 11 pb, causando uma mudança de quadro de leitura que origina um novo códon de terminação; e a outra refere-se a uma larga deleção (de 1024 pb) que se estende desde a região a montante (também chamada de região *upstream*) ao promotor até parte do gene que codifica a proteína (nucleotídeos de -519 a 685), levando à sua não transcrição (Yoneyama e Nakae, 1993). Outras deleções de

fragmentos no genoma (Shen *et al.*, 2015) e mecanismos dependentes de chaperona Hfq (que, na presença de metais, atua como repressor de *oprD*) (Ducret *et al.*, 2016) também afetam o gene, levando à perda de OprD.

1.3.1.2 Alteração de PBP

Embora pouco descrita na literatura, a alteração de PBP em *Pseudomonas* pode levar a algum grau de resistência aos betalactâmicos. Há relatos de *P. aeruginosa* apresentando PBP-4 alterada com baixa afinidade por imipenem isoladas de pacientes com fibrose cística (Strateva e Yordanov, 2009). A superprodução de PBP-3 confere uma redução de suscetibilidade a agentes betalactâmicos (Bellido *et al.*, 1990; Strateva e Yordanov, 2009).

1.3.1.3 Produção de betalactamases

Diversas betalactamases, incluindo uma intrínseca e várias adquiridas, de diferentes estruturas e perfis hidrolíticos já foram descritas em *Pseudomonas*.

Betalactamases do tipo AmpC fazem parte de um sistema que atua na reutilização de monômeros de peptidoglicano em muitos gêneros bacterianos. Em *Pseudomonas*, o gene *ampC* é encontrado no cromossomo e é expresso constitutivamente em níveis basais. A ocorrência de quebras no peptidoglicano motivadas pela ação de betalactâmicos resulta na formação de monômeros UDP-MurNAc ligados a três, quatro ou cinco aminoácidos que são transportados para o citosol por uma proteína transmembranar AmpG. No citosol, tais moléculas competem com UDP-MurNAc (sem ramificação peptídica) por um sítio de ligação no regulador transcricional *ampR*. A ligação de variantes MurNAc ramificados a *ampR* leva a uma mudança de conformação no regulador, que por sua vez ativa a expressão da betalactamase codificada por *ampC*. Tal sistema é negativamente regulado por uma MurNAc-L-alanina amidase codificada pelo gene *ampD*. A mutação em *ampD* é a causa mais comum da superexpressão de AmpC (Normark e Normark, 2002; Jacoby, 2009; Strateva e Yordanov, 2009). Enzimas AmpC fazem parte do grupo 1 da classificação de Bush e Jacoby (2010), o que significa que hidrolisam cefalosporinas e sua atividade não é inibida por ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam.

Entre as enzimas citadas no grupo 2c de Bush e Jacoby (2010), são relatadas quatro encontradas especificamente em *Pseudomonas* (*Pseudomonas Specific Enzyme*, PSE): PSE-4 (CARB-1), PSE-1 (CARB-2), CARB-3 e CARB-4. Tais betalactamases hidrolisam carboxipenicilinas, ureidopenicilinas e cefsulodina. PSE-4, PSE-1 e CARB-3 são estruturalmente muito semelhantes, com pouca variação de aminoácidos, enquanto CARB-4

apresenta alguma homologia com estas, mas parece que seu gene, *bla*_{CARB-4}, foi adquirido de outras espécies. Microrganismos que produzem essas enzimas geralmente apresentam suscetibilidade variável a 4^aGC's e aztreonam e suscetibilidade total a ceftazidima e carbapenemas. Enzimas CARB são inibidas por ácido clavulânico (Strateva e Yordanov, 2009; Bush e Jacoby, 2010).

Metalobetalactamases, pertencentes ao grupo 3 de Bush e Jacoby (2010), também foram descritas em *P. aeruginosa*. Estas enzimas conferem resistência a todos os betalactâmicos exceto aztreonam. Sua atividade hidrolítica pode ser inibida por EDTA. Foram relatados nesta espécie metalobetalactamases dos tipos IMP, VIM, SPM, GIM, FIM e NDM. Seus genes podem ser encontrados em cromossomo associados a sequências móveis ou mobilizáveis, ou em plasmídeos, o que aumenta seu potencial de disseminação. Os genes *bla*_{FIM-1} e *bla*_{SPM-1} estão associados a sequências de inserção, enquanto *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{GIM-1} estão associados a integrons (Strateva e Yordanov, 2009; Hong *et al.*, 2015). O ambiente genético de *bla*_{NDM} relatado em *Pseudomonas*, por sua vez, envolve a associação com sequências de inserção próximas a integrons no interior de diferentes plasmídeos (Janvier *et al.*, 2013)

Por fim, *Pseudomonas* também podem carrear penicilinasas e cefalosporinasas do tipo TEM e SHV, bem como suas variantes ESBL, além de ESBL de outras classes moleculares como GES, PER, VEB e algumas variantes OXA (pertencentes aos grupos 2be e 2de de Bush e Jacoby, 2010). Enzimas das famílias SHV, TEM e OXA foram abordadas no tópico 1.2.1 deste presente trabalho.

PER-1 foi descrita pela primeira vez em 1991 em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* isolada de um paciente turco por um grupo de pesquisa francês. Essa ESBL está disseminada em alguns países europeus, sendo identificada com maior frequência na Turquia (Mesaros *et al.*, 2007), enquanto que PER-2, uma variante de PER-1, está mais disseminada na América do Sul (Bradford, 2001). O gene *bla*_{PER-1} foi primeiramente identificado em cromossomo, sendo mais tarde encontrado também em plasmídeos (Bradford, 2001; Strateva e Yordanov, 2009).

VEB-1 foi primeiramente detectada no ano de 1998 em uma amostra clínica de *E. coli* de um paciente vietnamita e logo em seguida em amostra clínica de *P. aeruginosa* de uma paciente tailandesa (Naas *et al.*, 1999). Após ter sido relatada pela primeira vez, a presença dessa enzima passou a ser percebida com maior frequência em amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima (Bradford, 2001; Weldhagen, Poirel e Nordmann, 2003). Enzimas do tipo VEB têm seus genes associados a integrons (Poirel, Naas e Nordmann, 2008). Assim como PER, VEB possui perfil hidrolítico típico de ESBL.

Por outro lado, enzimas do tipo GES podem ou não ser ESBL (Poirel, Naas e Nordmann, 2008). GES-1 foi identificada pela primeira vez a partir de uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de paciente proveniente da Guiana Francesa, no final da década de 1990 (Dubois *et al.*, 2002). Esta enzima possui perfil hidrolítico semelhante a outras ESBL, incluindo atividade contra penicilinas e cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, com maior atividade sobre ceftazidima do que sobre cefotaxima, não apresentando atividade sobre cefamicinas e carbapenemas, e sendo inibida por ácido clavulânico, tazobactam e imipenem. No entanto, diferente da maioria das ESBL, GES-1 não hidroliza monobactâmicos. Pequenas variações na sequência de aminoácidos desta enzima, porém, tem impacto importante no seu espectro de ação. Por exemplo GES-2, com apenas a substituição Gly170Asn apresenta pequena atividade hidrolítica sobre carbapenemas, e GES-4, GES-5 e GES-6 com substituição Gly170Ser, são capazes de hidrolisar carbapenemas e cefamicinas. Mutações em outros sítios, identificadas nas variantes GES-9 e GES-11, por exemplo, levaram ainda à extensão da capacidade hidrolítica para monobactâmicos (Bonnin *et al.*, 2011).

Embora seja uma situação menos comum, ESBL do tipo CTX-M, muito disseminadas entre enterobactérias, também já foram identificadas no gênero *Pseudomonas*. Foram descritas amostras clínicas de *P. aeruginosa* produtoras de CTX-M-1 nos Países Baixos (al Naiemi, Duim e Bart, 2006), CTX-M-2 e CTX-M-43 na Bolívia (Celenza *et al.*, 2006) e CTX-M-2 no Brasil (Picão *et al.*, 2009), entre outras.

1.4 Disseminação de ESBL em ambiente e alimentos

A disseminação de ESBL é bem documentada na literatura científica. Estudos mostram que estas enzimas podem ser encontradas em diferentes ambientes e reservatórios como: amostras clínicas humanas (Abdallah *et al.*, 2017; Manyahi *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2017); animais selvagens (Bachiri *et al.*, 2017; Cristóvão *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017); animais domésticos (Yousfi *et al.*, 2016; Karkaba *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017); animais destinados para consumo humano (Chen *et al.*, 2017; Elhariri *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017) e seus derivados (Rasheed *et al.*, 2014); em sistemas de irrigação (Njage e Buys, 2015); solo (Knapp *et al.*, 2010); e alimentos consumidos sem fervura (Blaak *et al.*, 2014; Rasheed *et al.*, 2014; Yaici *et al.*, 2017).

Tal disseminação é também documentada no Brasil. Por exemplo, um estudo feito com carcaças de frango identificou a ocorrência de betalactamases do tipo CTX-M em *E. coli* isoladas de 13 entre 16 carcaças analisadas de quatro diferentes marcas produzidas no Brasil,

além de uma *E. coli* carregando *bla*_{SHV-2a} ou 12 concomitante à *bla*_{CTX-M-8} (Botelho *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015; Koga *et al.*, 2015). A ocorrência de genes *bla*_{CTX-M} também foi observada diretamente em granjas de aves no estado de São Paulo, em amostras de *E. coli* patogênicas e não patogênicas (Ferreira *et al.*, 2014a; 2014b; da Silva *et al.*, 2017) e em aves de rapina no Rio de Janeiro (Batalha-Jesus *et al.*, 2015).

No Brasil, há relatos também sobre a disseminação de ESBL por rios e efluentes. As ESBL dos tipos SHV e CTX-M foram identificadas entre enterobactérias isoladas de esgoto hospitalar no Rio Grande do Sul (de Oliveira *et al.*, 2017) e de estação de tratamento de água em São Paulo (Dropa *et al.*, 2016). Em um estudo mais abrangente, no Paraná, foram analisadas amostras de água de várias fontes, sendo detectadas, predominantemente, ESBL do tipo CTX-M nas amostras de águas residuais (de efluentes sanitários e hospitalares), de águas de superfície e de estação de tratamento de águas residuais (Conte *et al.*, 2017). Os genes codificadores de ESBL *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} também foram detectados entre amostras de *P. aeruginosa* isoladas de estação de tratamento de água hospitalar no Rio de Janeiro (Chagas *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2015). Ainda no Rio de Janeiro, a presença de carbapenemases foi relatada em rios, canais impactados pela falta de saneamento (de Araujo *et al.*, 2016) e em águas do mar (Montezzi *et al.*, 2015; Campana *et al.*, 2017). Nestes estudos com foco em águas costeiras, a ocorrência de variantes de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e/ou *bla*_{GES} foi identificada associada ao *bla*_{KPC} em diferentes gêneros bacterianos (*Aeromonas*, *Kluyvera*, *Klebsiella* e *Enterobacter*) (Montezzi *et al.*, 2015) e ao *bla*_{NDM} em *K. pneumoniae* (Campana *et al.*, 2017).

No entanto, considerando especificamente vegetais, o número de estudos que descreve a ocorrência de enzimas do tipo ESBL é mais restrito, mesmo considerando dados de outros países. Nos Estados Unidos, foram identificadas sequências de *bla*_{CTX-M} em cepas de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas teessidea* isoladas de espinafres adquiridos no varejo de Berkeley. Neste mesmo estudo, sequências de DNA de *Rahnella aquatilis* e *Serratia fonticola* possuíam, respectivamente, 99% e 98% de identidade ao gene *bla*_{RAHN-2}, uma ESBL previamente descrita em vegetais (Raphael, Wong e Riley, 2011). A partir das mesmas amostras, mas usando uma abordagem baseada em biblioteca genômica, o mesmo grupo de pesquisa descreveu um gene codificador de betalactamase com 71% de identidade ao gene que codifica a ESBL ERP-1, isolada de *Erwinia persicin* (Berman e Riley, 2013). Em Portugal, um estudo feito com saladas prontas para consumo detectou a presença do gene *bla*_{SHV-2} em duas amostras de *Raoutella terrigena* (Campos *et al.*, 2013). Mais recentemente, em um trabalho desenvolvido em Michigan, 86% das amostras bacterianas obtidas de alface eram resistentes a cefotaxima, porém apenas três amostras, de um total de 138, eram produtoras de ESBL. Foi

detectada a presença dos genes codificadores de CTX-M-1 em *S. marcescens*, de TEM em uma amostra de *K. pneumoniae*, e de SHV em outra amostra de *K. pneumoniae* (Bhutani *et al.*, 2015). Não há relatos na literatura científica quanto à ocorrência de bactérias carreadoras de genes codificadores de ESBL em vegetais no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Enzimas do tipo ESBL estão amplamente disseminadas no Brasil, na maioria das vezes associadas a elementos genéticos móveis que circulam entre enterobactérias. De fato, bactérias carreando ESBL têm sido isoladas de pacientes, ambientes hospitalares, animais de companhia, animais de criação, alimentos de origem animal, efluentes, rios e águas costeiras, entre outras fontes amostrais. No entanto, não há até o momento relatos da descrição de genes codificadores destas enzimas em bactérias isoladas de alimentos de origem vegetal no Brasil.

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa que visava investigar a ocorrência de enterobactérias carreadoras de ESBL em amostras de alface, foram isoladas 246 amostras de *Pseudomonas* sp.. Este foi, com ampla vantagem, o principal gênero bacteriano recuperado utilizando como pressão seletiva ágar MacConkey suplementado com 2 µg/mL de cefepime, droga escolhida por não ser substrato para enzimas do tipo AmpC expressas em níveis basais. No entanto, para o gênero *Pseudomonas*, a associação entre a capacidade de crescer em 2 µg/mL de cefepime e a expressão de ESBL não é tão provável como no caso das enterobactérias. A CMI de *P. aeruginosa* é sensivelmente mais alta que a de enterobactérias para diversos betalactâmicos provavelmente em virtude de diferentes características de sua superfície celular. Além disso, o sistema AmpC intrínseco do gênero pode ser desreprimido, o que aumenta o espectro de ação da enzima.

Mesmo diante da particularidade do gênero de ser intrinsecamente tolerante a concentrações relativamente altas de penicilinas (16 µg/mL), cefalosporinas (8 µg/mL) e carbapenemas (2 µg/mL), é relevante investigar a ocorrência de ESBL entre estas amostras. *Pseudomonas* são bactérias bem adaptadas tanto a hospedeiros humanos e animais quanto ao meio ambiente. Tal pesquisa pode evidenciar seu papel como um possível, e dificilmente detectado, elo intermediário na cadeia de disseminação de genes codificadores de betalactamases no pouco explorado contexto dos alimentos de origem vegetal consumidos crus.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar a ocorrência de genes codificadores de ESBL dos tipos TEM, SHV, GES, CTX-M, PER, VEB e OXA em amostras de *Pseudomonas* sp. isoladas de alfaces cultivadas em regimes orgânico e não orgânico provenientes de três mercados da cidade do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Definir a coleção de amostras de *Pseudomonas* sp. com suscetibilidade reduzida a cefepime, utilizando como ponto de corte a concentração estabelecida pelo CLSI (2017) para resistência intermediária em *P. aeruginosa*;
- Caracterizar fenotipicamente a ocorrência de ESBL nestas amostras;
- Investigar os genes de ESBL associados ao fenótipo observado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e características das amostras

Foram avaliadas 246 amostras de *Pseudomonas* sp. isoladas de alfaces em um estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório, realizado por Gabriela Bergiante Kraychete (dados não publicados). Neste, alfaces cultivadas em regime orgânico (n=6) e não orgânico (n=6) foram obtidas de três grandes redes de supermercados localizados na cidade do Rio de Janeiro, coletadas em 2 períodos diferentes no ano de 2015 (Tabela 1). Cada alface foi homogeneizada com água peptonada a 0,1% e, a partir daí, foram feitas diluições em solução salina (NaCl 0,9%). As diluições foram plaqueadas em meios com MacConkey ágar suplementados com cefepime com concentração de 2 µg/mL. Essas culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, as que apresentaram de 10 a 50 unidades formadoras de colônia (UFC), foram repicadas em meio *Trypticase soy agar* (TSA) (Sigma-Aldrich), sendo posteriormente identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF através do aparelho Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Corporation). Todas as amostras foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, mas nenhuma delas como *P. aeruginosa*. As colônias foram dissolvidas em leite esterilizado (10% de glicerol) e armazenadas a -20°C. Para a realização dos experimentos do presente trabalho, as amostras foram ativadas em meio TSA.

Tabela 1 - Número total de amostras do gênero *Pseudomonas* isoladas a partir da pressão seletiva de MC suplementado de 2 µg/mL de cefepime, segundo cultivo de alface, mercado e coleta

Cultivo (alface)	Mercado/alface de origem					
	A.I	A.II	B.I	B.II	C.I	C.II
Orgânico	44	36	21	2	16	32
Não Orgânico	26	14	16	7	13	19

Mercados: A, B, C. Coletas: I, II

4.2 Definição da coleção de estudo: avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) de cefepime

É importante destacar que para *P. aeruginosa* o ponto de corte para identificar resistência intermediária a cefepime é 16 µg/mL, muito acima dos 2 µg/mL que caracterizam o mesmo nível de resistência em *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2017). Relatos na literatura de *P. aeruginosa* carreando diferentes genes codificadores de ESBL apontaram concentrações mínimas inibitórias variando de 16 µg/mL a >256 µg/mL (Peña *et al.*, 2009; Picão *et al.*, 2009).

Portanto, é provável que muitas amostras de *Pseudomonas* sensíveis tenham crescido na pressão seletiva utilizada no projeto que resultou na obtenção das amostras. Isso tornou necessária uma nova etapa de seleção para a definição da coleção de estudo, que foi realizada através da determinação da CMI de cefepime para as 246 amostras.

O inóculo foi preparado conforme o procedimento padrão para realização de CMI em placa; ou seja, a partir do crescimento em placa após incubação por 18-24 h a 35-37°C, células foram dissolvidas em solução salina a uma concentração correspondente a 0,5 do padrão McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (CLSI, 2017). Estas suspensões foram então diluídas 1:10 em solução salina estéril e 200 µL foram adicionados a um replicador de Steers com capacidade para 30 amostras e diâmetro de pino de 3 mm. Os pinos foram utilizados para aplicação da suspensão, respectivamente, em: uma placa de ágar Mueller Hinton BD Difco (BD Company) sem adição de antimicrobianos; placas de ágar Mueller Hinton adicionadas de cefepime nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/mL; e uma placa de ágar Mueller Hinton, ao final da série, também sem pressão seletiva. A leitura dos resultados foi feita após incubação das placas por 18-24 h a 35-37°C. Foram selecionadas para compor a coleção de estudos as amostras que apresentaram CMI igual ou maior que 16 µg/mL.

4.3 Teste fenotípico por disco difusão

Amostras com CMI de cefepime ≥ 16 µg/mL foram submetidas a teste fenotípico para triagem para investigação da produção de ESBL.

Para observação do fenótipo produzido por ESBL, foram utilizados discos de: piperacilina (100 µg) (Sigma-Aldrich), que é uma penicilina com atividade antipseudomonas; piperacilina com tazobactam (100/10 µg) (Oxoid), que combina a penicilina com um inibidor de betalactamases; e ceftazidima (30 µg) (Laborclin), uma cefalosporina que possui boa ação contra *Pseudomonas*. Como não está disponível no mercado brasileiro para compra, o disco de piperacilina teve de ser preparado. Para tanto, 10 µL de uma solução de piperacilina (Sigma-Aldrich) a 10000 µg/mL foram adicionados sobre discos de papel filtro estéreis.

Quanto à disposição na placa, os discos de piperacilina e ceftazidima foram colocados, de centro a centro, a uma distância de 20 mm e 15 mm, respectivamente, do disco de piperacilina com tazobactam. Estas distâncias foram determinadas com a finalidade de facilitar a visualização de distorção de halos provocada pela influência do tazobactam, o que caracteriza o fenótipo típico da produção de ESBL.

O preparo do meio de cultura e do inóculo foi realizado conforme as recomendações do CLSI (CLSI, 2012). A suscetibilidade a piperacilina e ceftazidima foi determinada utilizando os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2017).

Foram utilizadas como cepas controle: *P. aeruginosa* ATCC 27853, não produtora de ESBL; *P. aeruginosa* carreadora de *bla*_{TEM-5} e *P. aeruginosa* carreadora de *bla*_{TEM-12} (números 22 e 23 na coleção de controles do laboratório, respectivamente).

4.4 Extração de DNA e detecção do gene 16S

As amostras que apresentaram o fenótipo de ESBL foram submetidas ao protocolo de extração de DNA baseada no método SDS/lisozima (Sambrook e Russell, 2006), com proteinase K, clorofórmio e álcool isoamílico. Ao final da extração, foram feitas diluições do DNA de 1:10 e 1:50.

Para a confirmar a integridade do DNA das amostras, o mesmo foi submetido a PCR para detecção do gene 16S. Os primers utilizados para amplificação foram 16S-8F (sequência oligonucleotídica 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 16S-1493R (sequência oligonucleotídica 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C em 10 minutos; 35 ciclos de 95°C para desnaturação em 30 segundos, 52°C para anelamento no tempo de 30 segundos e 72°C para extensão em 45 segundos; e extensão final a 72°C em 10 minutos (Mendes *et al.*, 2007). O resultado (produto de 1499 pb) foi observado através de corrida de eletroforese com gel de agarose a 1,5%, sendo utilizado brometo de etídeo como corante e revelado por luz ultravioleta com o fotodocumentador ImageQuant LAS 400 (GE Healthcare Life Sciences).

4.5 Detecção dos genes de ESBL por PCR

Após a confirmação da integridade, o DNA obtido foi submetido a cinco reações de amplificação para pesquisa de genes codificadores de ESBL.

A primeira reação foi uma PCR multiplex que visava detectar genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{GES}, gerando produtos no tamanho de 650 pb, 200 pb e 750 pb, respectivamente (Quadro 1). Para tanto, foi utilizado o protocolo descrito por Campana (2013): 95°C em 10 minutos para desnaturação inicial; 30 ciclos de 95°C para desnaturação em 30 segundos, 54°C para anelamento no tempo de 30 segundos e 72°C para extensão em 45 segundos; e 72°C para extensão final em 10 minutos. Foram utilizadas como controles positivos nas reações de PCR

as seguintes amostras: *P. aeruginosa* (bla_{TEM-5} ; coleção de controles do laboratório), *E. coli* F556 (bla_{SHV-2} ou -12 ; Botelho, 2016), e *Enterobacter asburiae* (bla_{GES-5} ; coleção de controles do laboratório).

Quadro 1 - Sequência de Iniciadores para amplificação dos genes codificadores de ESBL

Alvo	Reação	Nome do primer	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho dos produtos (pb)	Referência utilizada	
<i>bla_{SHV}</i>	1 multiplex	mSHV-F	CTTGACCGCTGGGAAACGG	200	Campana, 2013	
		mSHV-R	AGCACGGAGCGGATCAACGG			
<i>bla_{TEM}</i>		mTEM-F	CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG	650	Campana, 2013	
		mTEM-R	AACCAGCCAGCCWGAAGG			
<i>bla_{GES}</i>		mGES-F	AGCAGCTCAGATCGGTGTTG	750	Campana, 2013	
		mGES-R	CCGTGCTCAGGATGAGTTG			
<i>bla_{CTX-M-1/2}</i>		2 multiplex	mCTX-1/2-F	ATGTGCAGYACCAGTAA	512	Campana, 2013
			mCTX-1/2-R	CGCTGCCGGTTTTATCSCCC		
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	mCTX-8-F		AACRCRCAGACGCTCTAC	333	Campana, 2013	
	mCTX-8-R		TCGAGCCGGAASGTGYAT			
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	mCTX-14-F		GGTGACAAAGAGARTGCAACGGAT	876	Campana, 2013	
	mCTX-14-R		TTACAGCCCTTCGGCGATGA			
<i>bla_{OXA-1}</i>	3 multiplex		OXA-1 F	AGCAAAGTGTGCAACGCAAATGGC	311	LIMM (UFRJ)
			OXA-1 R	ACCCCAAGTTTCTGTAAAGTGCGGA		
<i>bla_{OXA-2}</i>		OXA-2 F	GCTTTGCAGGCCACAATCAAGAC	587	LIMM (UFRJ)	
		OXA-2 R	TCCAGTTGCGACCGGCTTCCA			
<i>bla_{OXA-10}</i>		OXA-10r F	TGCCGAAGCCGTC AATGGTGT	197	LIMM (UFRJ)	
		OXA-10r R	TGGCTCTTGGCTTTCCGTCCCA			
<i>bla_{OXA-18-45}</i>		OXA-18-45 F	CCGCGCTGGGAYTACAAGCCGGA	109	LIMM (UFRJ)	
		OXA-18-45 R	RYTSTGCGAATACCAGACGAT			
<i>bla_{PER}</i>	4 simplex	PER-F	CGTTTCTGCTCTGCTGAT	500	Campana, 2013	
		PER-R	GGCAGCTTCTTTAACGCC			
<i>bla_{VEB}</i>	5 simplex	MultiVEB_for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	648	Sampaio, 2011	
		MultiVEB_rev	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG			

A segunda reação consistiu em uma PCR multiplex que detecta os genes de CTX-M. Os produtos possuíam tamanhos de 512 pb para ambos, *bla_{CTX-M-grupo1}* e *bla_{CTX-M-grupo2}*; 333 pb para *bla_{CTX-M-grupo8}*; e 876 pb para *bla_{CTX-M-grupo9}* (Quadro 1). Foram utilizadas as condições de termociclagem conforme descrito por Campana (2013): 95°C em 10 minutos para desnaturação inicial; seguida de 30 ciclos de 95°C para desnaturação em 30 segundos, 54°C para anelamento no tempo de 30 segundos e 72°C para extensão em 45 segundos; e 72°C para extensão final em 10 minutos. *K. pneumoniae* FB13 (*bla_{CTX-M-15}*; Botelho, 2016), *E. coli* Y15317 (*bla_{CTX-M-2}*; Botelho, 2016), *E. cloacae* RJ159835 (*bla_{CTX-M-8}*, coleção de controles do laboratório) e *E. coli*

Z2742 (*bla*_{CTX-M-9}, coleção de controles do laboratório) foram utilizadas como controles positivos para os genes.

Genes ESBL *bla*_{OXA} foram pesquisados através de PCR multiplex para detecção de quatro grupos de variantes *bla*_{OXA-grupo1}, 587 pb; *bla*_{OXA-grupo2}, 311 pb; *bla*_{OXA-grupo10}, 197 pb e *bla*_{OXA-grupo18-45}, 109 pb (Quadro 1). Foram utilizadas como condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos; 35 ciclos com desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 52° C por 30 segundos e extensão por 72° C por um minuto; e extensão final a 72° C por 10 minutos.

Devido ao surgimento de bandas inespecíficas nas reações multiplex para a detecção de genes de SHV, TEM, GES, CTX-M e OXA, foi necessário realizar testes, posteriormente, aumentando a temperatura de anelamento, a fim de melhorar a especificidade das reações. É importante destacar que tais protocolos foram elaborados para pesquisa destes genes em *P. aeruginosa*, o que pode ser uma razão para o grande número de bandas inespecíficas obtidas quando aplicados a outras espécies do gênero.

A quarta reação visava detectar o gene *bla*_{PER}, com a geração de produtos com 500 pb: desnaturação inicial em 94° C por 10 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 53° C por um minuto e extensão por 72° C por um minuto; e extensão final a 72° C por 10 minutos (Campana, 2013; Quadro 1).

Para a detecção do gene *bla*_{VEB}, a reação foi submetida às seguintes condições: desnaturação inicial em 94° C por 10 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 40 segundos, anelamento a 57° C por 40 segundos e extensão por 72° C por um minuto; e extensão final a 72° C por 7 minutos (Sampaio, 2011). O tamanho esperado dos produtos da PCR gerados era de 648 pb (Quadro 1).

Todos os produtos obtidos da PCR foram submetidos à corrida de eletroforese, com gel de agarose a 1,5%, utilizando o brometo de etídeo como corante e revelação à luz ultravioleta utilizando o foto-documentador ImageQuant LAS 400 (GE Healthcare Life Sciences).

5. RESULTADOS

5.1 Concentração mínima inibitória (CMI) de Cefepime

Entre as 246 amostras, 18 apresentaram CMI de 1 $\mu\text{g/mL}$ de cefepime, 13 CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$, 86 CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$ e 84 CMI de 8 $\mu\text{g/mL}$, sendo consideradas sensíveis ao antimicrobiano. Entre as demais, 28 apresentaram CMI de 16 $\mu\text{g/mL}$, ponto de corte assumido como típico de resistência intermediária a cefepime; e 17 CMI igual ou maior a 32 $\mu\text{g/mL}$, sendo consideradas resistentes. Estes dados podem ser observados na Figura 4, demonstrando como as CMI $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ estão na extremidade superior da curva normal formada pela distribuição das CMI para cefepime medida neste conjunto de amostras.

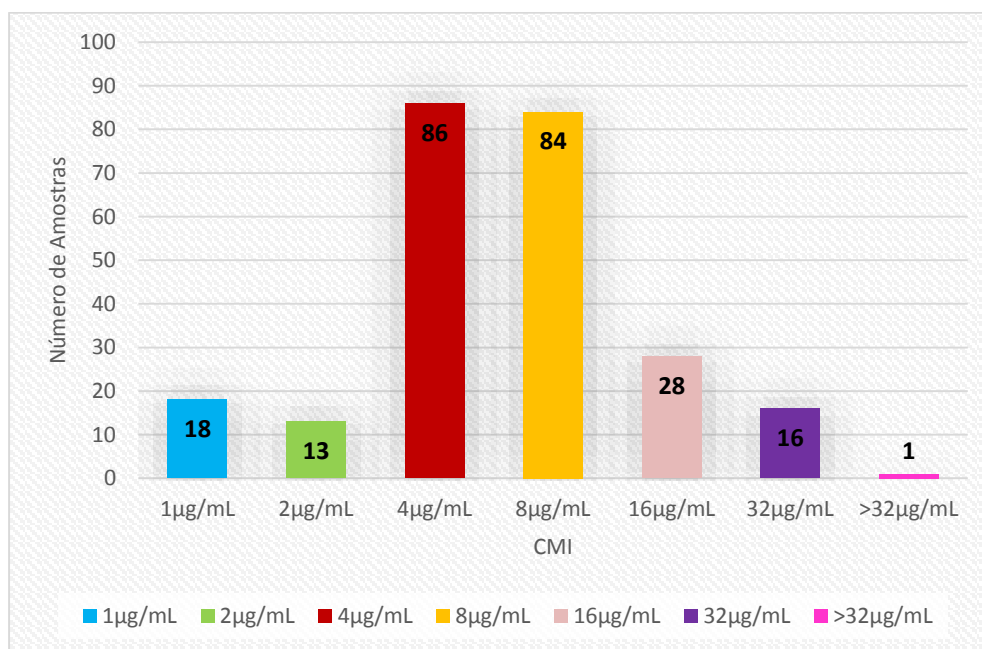


Figura 4 - Distribuição das amostras de *Pseudomonas* sp. incluídas neste estudo conforme a CMI para cefepime.

Foram selecionadas para compor a coleção de estudo as amostras com CMI para cefepime igual ou maior a 16 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 45$, 19%). Entre estas, 24 (53%) foram provenientes de alfaces cultivadas em regime orgânico, e 21 (47%) de alfaces produzidas por regime não orgânico. A maior parte das amostras esteve relacionada às unidades de alface obtidas na primeira coleta no mercado A (A.I), conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de amostras de *Pseudomonas* com CMI para cefepime igual ou maior a 16 µg/mL, conforme seu cultivo de alface, mercado e coleta

Cultivo (alface)	Mercado/alface de origem					
	A.I	A.II	B.I	B.II	C.I	C.II
Orgânico	19	2	3	0	0	0
Não Orgânico	16	0	1	3	0	1

Mercados: A, B, C. Coletas: I, II

5.2 Fenótipo ESBL

Durante a realização do teste fenotípico, 9 das 45 amostras apresentaram subpopulações próximas aos discos de betalactâmicos, indicando nestas colônias uma menor suscetibilidade aos antimicrobianos. Uma vez que suas amostras de origem se mostraram suscetíveis e sem distorção de halo perceptível, estas subpopulações foram isoladas, identificadas por MALDI-TOF e, quando o gênero foi confirmado como *Pseudomonas*, foram também submetidas ao teste, substituindo a amostra original.

Dentre as 45 amostras submetidas ao teste fenotípico, 24 apresentaram alguma distorção do halo de ceftazidima e/ou piperacilina influenciado pelo tazobactam; 15 apresentaram apenas resistência (ou resistência intermediária) à ceftazidima; 8 apresentaram resistência (ou resistência intermediária) à ceftazidima e à piperacilina; e uma amostra foi sensível a ambos discos. Entre as 24 amostras que tiveram halos distorcidos no teste de disco aproximação, 7 foram subpopulações isoladas das amostras originais.

Além disso, uma amostra subpopulacional, apesar de não apresentar distorção de halo, mostrou-se resistente tanto à piperacilina, quanto à ceftazidima, e foi selecionada para a continuação do estudo, totalizando 25 amostras para análise genotípica através de reações de amplificação dos genes de interesse. É digno de nota que nenhuma amostra apresentou distorção de halo, ou diferença no halo medido para os discos de piperacilina e piperacilina com tazobactam, tão claras quanto as amostras controle (Figura 5).

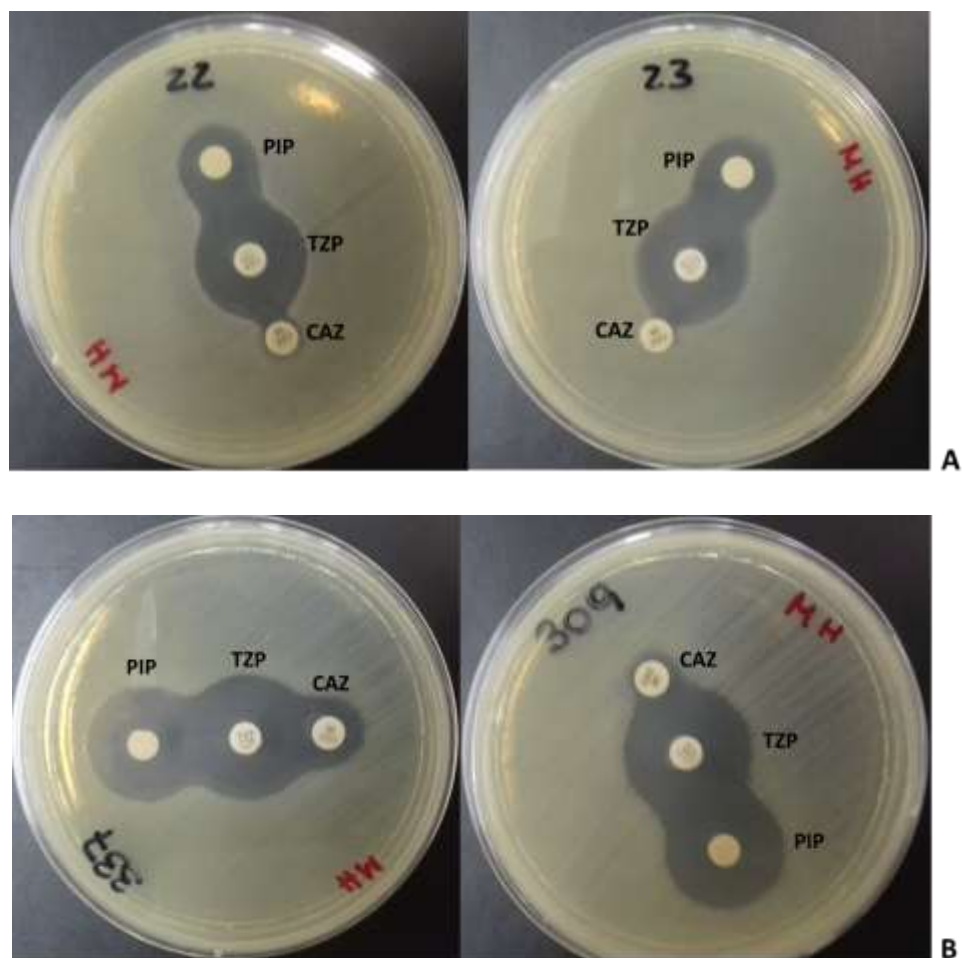


Figura 5 - Fenótipos observados no teste de disco aproximação para as amostras controle e duas amostras da coleção. Discos de ceftazidima (CAZ) e piperacilina (PIP) dispostos próximos a um disco central de piperacilina com tazobactam (TZP). **A:** cepas controle de *P. aeruginosa* produtoras de *bla*_{TEM-5} (22) e *bla*_{TEM-12} (23). **B:** amostras do estudo com fenótipo levemente sugestivo de ESBL (337, 309).

5.3 PCR

Para a realização das PCRs, o DNA das 25 amostras foi extraído e a integridade do material genético foi confirmado pela reação de amplificação do gene 16S. A detecção do gene 16S foi positiva em todas as amostras (Figura 6).

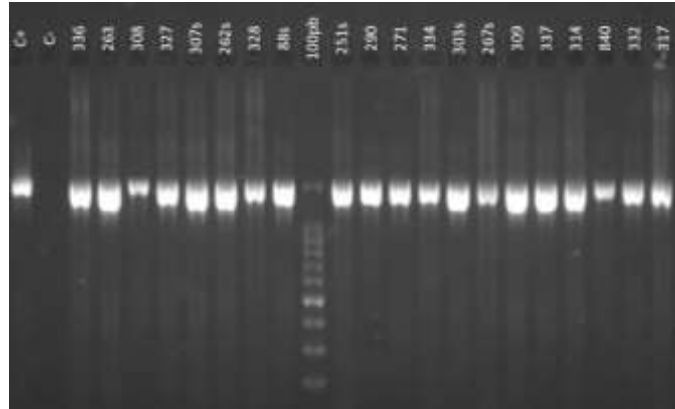


Figura 6 - Gel representativo demonstrando a amplificação de gene que codifica rRNA 16S para 20 das 25 amostras testadas. Controle positivo da reação (C+), controle negativo da reação (C-). Produtos da PCR de 16S com tamanho de 1499 pb.

Após a confirmação da qualidade do DNA pela amplificação do gene 16S, as amostras foram submetidas à reação de amplificação para detecção dos genes codificadores de ESBL *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{GES}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{PER}* e *bla_{VEB}*.

Resultados preliminares para a pesquisa de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}* estão apresentados na Figura 7. Utilizando o protocolo descrito por Campana (2013), foram observadas bandas na altura de *bla_{TEM}* (650 pb) em 2 amostras (317, 337), o que sugeria a presença deste gene nessas amostras. No entanto, foram também formadas muitas bandas inespecíficas, em algumas amostras inclusive mais intensas do que as possivelmente relacionadas ao gene pesquisado.

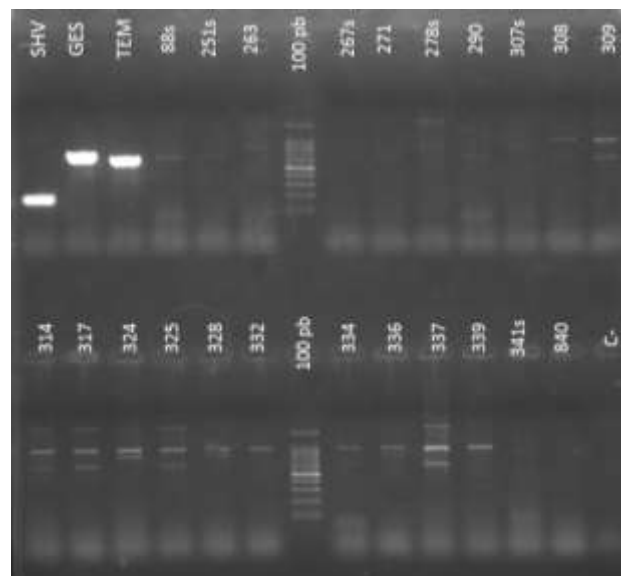


Figura 7 - Resultado da PCR para detecção de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}*, utilizando temperatura de anelamento 54° C (Campana, 2013). Controles positivos de *bla_{SHV}* (SHV) com 200 pb, *bla_{GES}* (GES) com 750 pb e *bla_{TEM}* (TEM) com 650 pb. Controle negativo da reação (C-).

Para tentar resolver esta questão, foi aplicada a estratégia de aumento da temperatura da reação de amplificação, a fim de aumentar sua especificidade. Foram testadas temperaturas variando de 56°C a 60°C (Figura 8). Na maior temperatura testada foi possível observar a amplificação dos respectivos genes a partir do DNA de cepas controle e a redução da visualização de bandas inespecíficas nas amostras selecionadas para esta padronização.

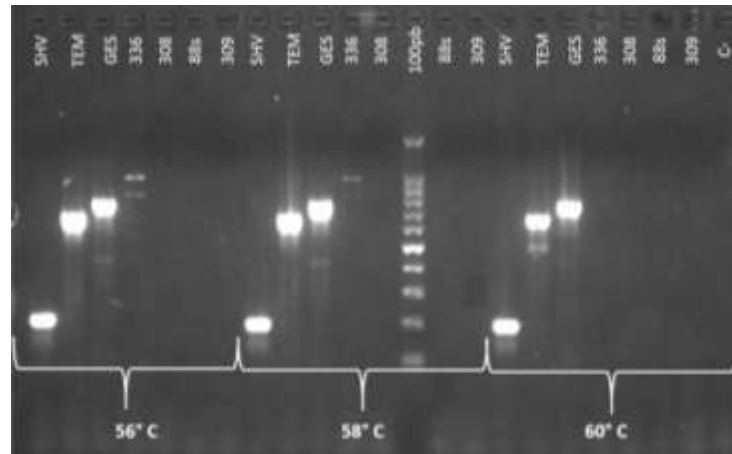


Figura 8 - Resultado da PCR teste com aumento de temperatura de anelamento para detecção de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}*. Controles positivos de *bla_{SHV}* (SHV) com 200 pb, *bla_{TEM}* (TEM) com 650 pb e *bla_{GES}* (GES) com 750 pb. Controle negativo da reação (C-). Temperaturas testadas: 56°C, 58°C e 60°C.

A seguir, esta condição foi aplicada a toda a coleção para a pesquisa dos respectivos genes. Apesar de não ser observado na Figura 7, na Figura 9 visualiza-se uma banda fraca na altura de *bla_{SHV}* (200 pb) na amostra 840, além de bandas com tamanhos diferentes aos controles em outras seis amostras (263, 308, 309, 314 e 337).

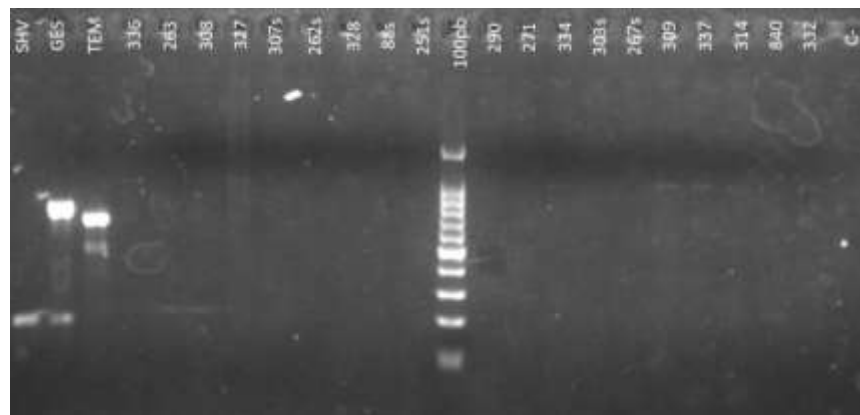


Figura 9 - Resultado da PCR para detecção de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}*, utilizando como temperatura de anelamento 60°C. Controles positivos de *bla_{SHV}* (SHV) com 200 pb, *bla_{GES}* (GES) com 750 pb e *bla_{TEM}* (TEM) com 650 pb. Controle negativo da reação (C-).

Uma vez que duas amostras (317, 337) apresentaram bandas na altura de *bla*_{TEM} na temperatura 54°C (Figura 7) e uma amostra apresentou banda na altura de *bla*_{SHV} na temperatura 60°C (Figura 9), foram realizadas PCR simplex para confirmar a amplificação destes genes. Essas reações foram realizadas utilizando duas temperaturas de anelamento: 54°C (segundo o protocolo de Campana, 2013) e 60°C (testes deste estudo).

Na reação para detecção de *bla*_{SHV}, o controle positivo foi detectado utilizando as duas temperaturas de anelamento testadas (Figura 10, à esquerda). No entanto, não foi visualizada banda equivalente à altura do gene na amostra 840. Com isso, é possível afirmar que o gene *bla*_{SHV} não se encontra presente em nenhuma das amostras do estudo. Já na reação para detecção de *bla*_{TEM}, além do controle positivo, foi possível observar bandas equivalentes à altura do gene nas duas amostras, na temperatura de 54°C (Figura 10, à direita). No entanto, na temperatura de 60°C, a banda de *bla*_{TEM} no controle positivo ainda é intensa, mas nas amostras as mesmas são quase imperceptíveis. O resultado obtido a 54°C indica a possível ocorrência de *bla*_{TEM} nestas amostras, mas a identidade do gene, assim como seu caráter ESBL, só poderiam ser confirmadas por sequenciamento dos produtos obtidos da PCR.

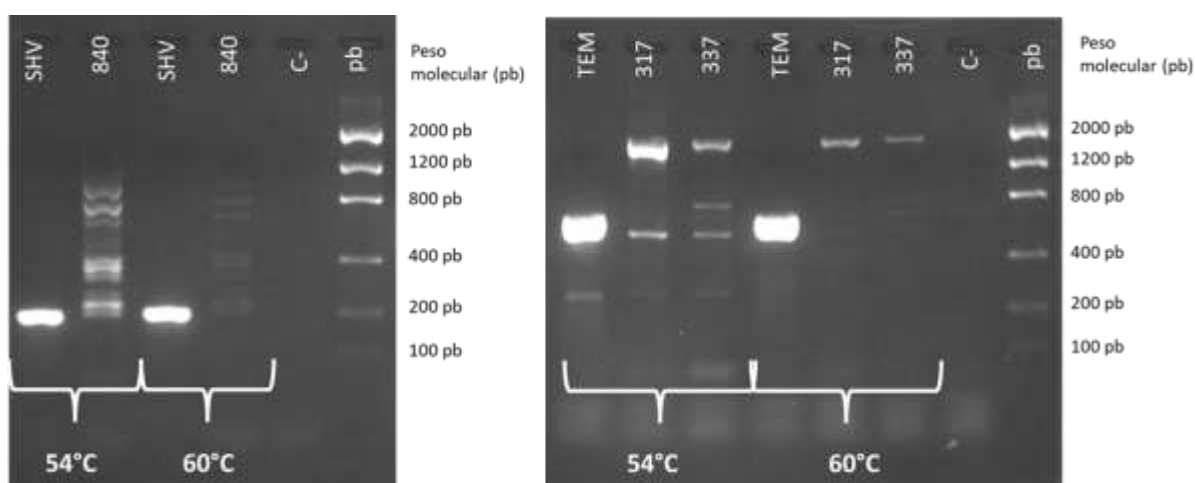


Figura 10 - Resultado das PCR simplex para pesquisa de *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} em amostras que apresentaram bandas dentro do tamanho esperado nas reações multiplex realizadas para os mesmos genes. À esquerda: reação para detecção de *bla*_{SHV} (200 pb). À direita: reação para detecção de *bla*_{TEM} (650 pb). Controle negativo da reação (C-)

A ocorrência de muitas bandas inespecíficas também foi observada na PCR realizada para pesquisa de genes *bla*_{CTX-M}. Apesar disso, visualizam-se fracas bandas na altura de *bla*_{CTX-M-grupo8} em duas amostras (263 e 341s) e na altura de *bla*_{CTX-M-grupo9} em outras amostras (324, 336), indicando nelas a possível presença desses genes. Bandas bem próximas à altura de *bla*_{CTX-M-8} (amostra 278s) e *bla*_{CTX-M-9} (amostras 278s, 328) foram também identificadas (Figura 11).

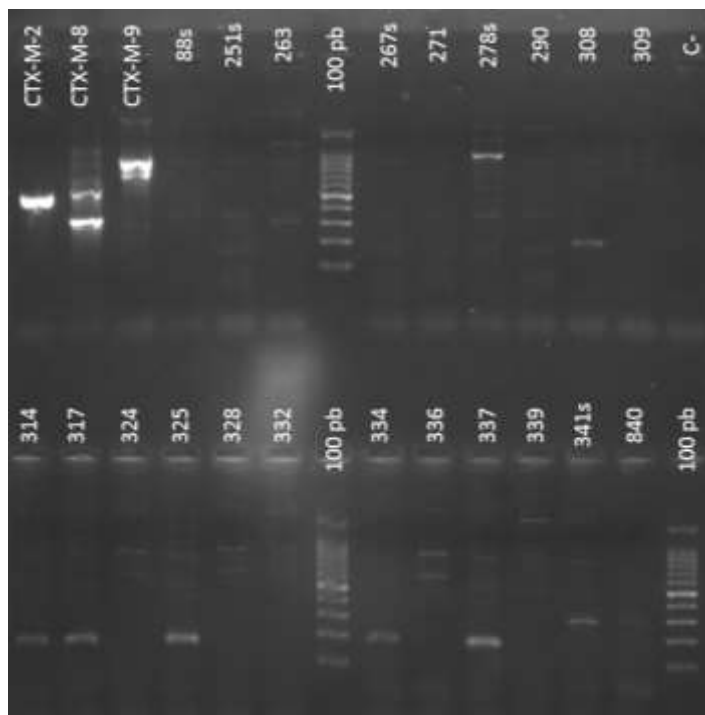


Figura 11 - Resultado da PCR para detecção de *bla*_{CTX-M-grupo1} e grupo2, *bla*_{CTX-M-grupo8} e *bla*_{CTX-M-grupo9}, utilizando temperatura de anelamento 54° C (Campana, 2013). Controles positivos de *bla*_{CTX-M-grupo2} (CTX-M-2) com 512 pb, *bla*_{CTX-M-grupo8} (CTX-M-8) com 333 pb e *bla*_{CTX-M-grupo9} (CTX-M-9) com 876 pb. Controle negativo da reação (C-).

Neste caso, assim como no teste para detecção de *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{GES}, foram realizadas reações de amplificação em temperaturas crescentes de anelamento a fim de melhorar sua especificidade. O resultado demonstrou a amplificação dos genes nas cepas controles mesmo à temperatura de 58° C; no entanto, tanto as bandas inespecíficas quanto as bandas com o tamanho esperado para o produto gerado pela amplificação deixaram de ser detectadas nesta condição (Figura 12). Utilizando a temperatura de 58° C, foi realizada novamente a reação multiplex de CTX-M, não sendo identificados genes *bla*_{CTX-M} em todas as amostras da coleção (Figura 13).

Uma vez que no teste com aumento de temperatura (Figura 12) e na reação a 58° C (Figura 13) não são visualizadas bandas suspeitas nem inespecíficas, as amostras que apresentaram bandas na altura dos genes na Figura 11 foram submetidas às reações simplex para amplificação de *bla*_{CTX-M-grupo8} e *bla*_{CTX-M-grupo9} (Figura 14). Em ambas as reações foram utilizadas as temperaturas de anelamento 54° C (Campana, 2013) e 58° C (testes deste estudo). Os genes *bla*_{CTX-M-grupo8} e *bla*_{CTX-M-grupo9} não foram detectados nas amostras suspeitas, o que indica que as amostras da coleção não são produtoras de ESBP do tipo CTX-M (Figura 14).

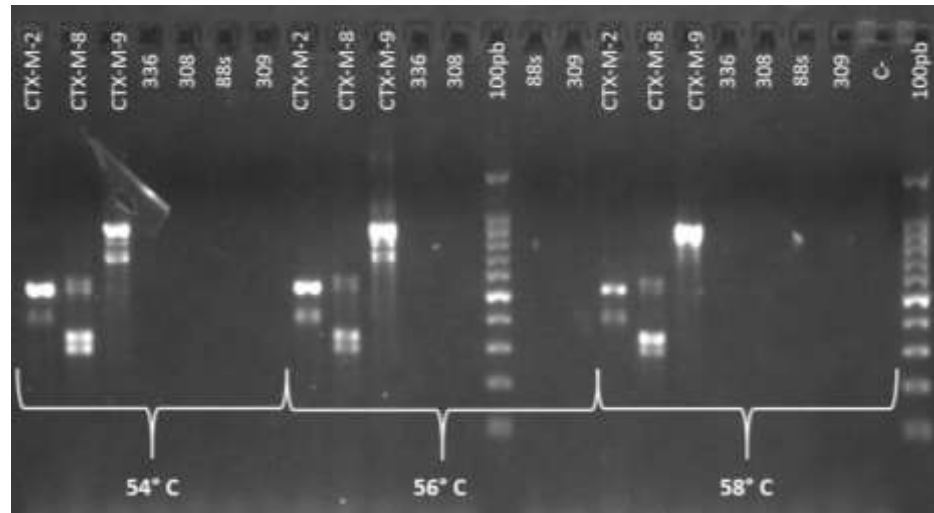


Figura 12 - Resultado das PCR teste com aumento de temperatura de anelamento para detecção de *bla*_{CTX-M-grupo1} e grupo2, *bla*_{CTX-M-grupo8} e *bla*_{CTX-M-grupo9}. Controles positivos de *bla*_{CTX-M-grupo2} (CTX-M-2) com 512 pb, *bla*_{CTX-M-grupo8} (CTX-M-8) com 333 pb e *bla*_{CTX-M-grupo9} (CTX-M-9) com 876 pb. Controle negativo da reação (C-). Temperaturas testadas: 54°C, 56°C e 58°C.

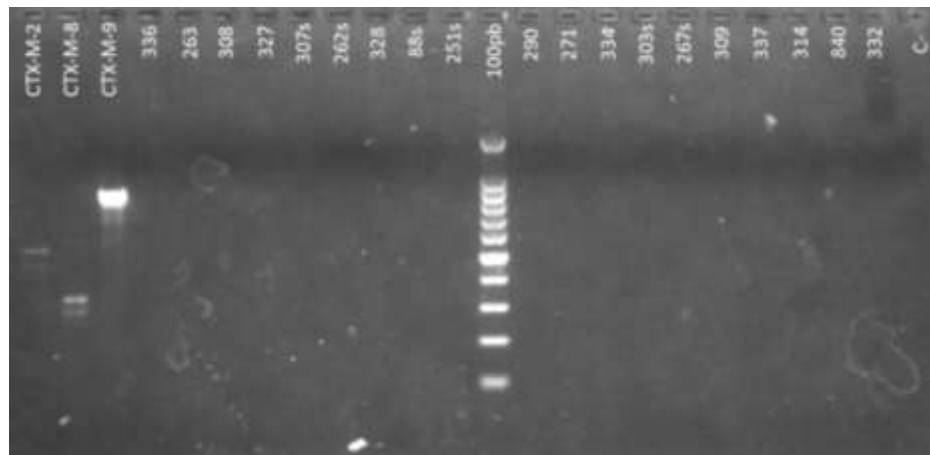


Figura 13 - Resultado da PCR para detecção de *bla*_{CTX-M-grupo1} e grupo2, *bla*_{CTX-M-grupo8} e *bla*_{CTX-M-grupo9}, utilizando como temperatura de anelamento 58°C. Controles positivos de *bla*_{CTX-M-grupo2} (CTX-M-2) com 512 pb, *bla*_{CTX-M-grupo8} (CTX-M-8) com 333 pb e *bla*_{CTX-M-grupo9} (CTX-M-9) com 876 pb. Controle negativo da reação (C-).

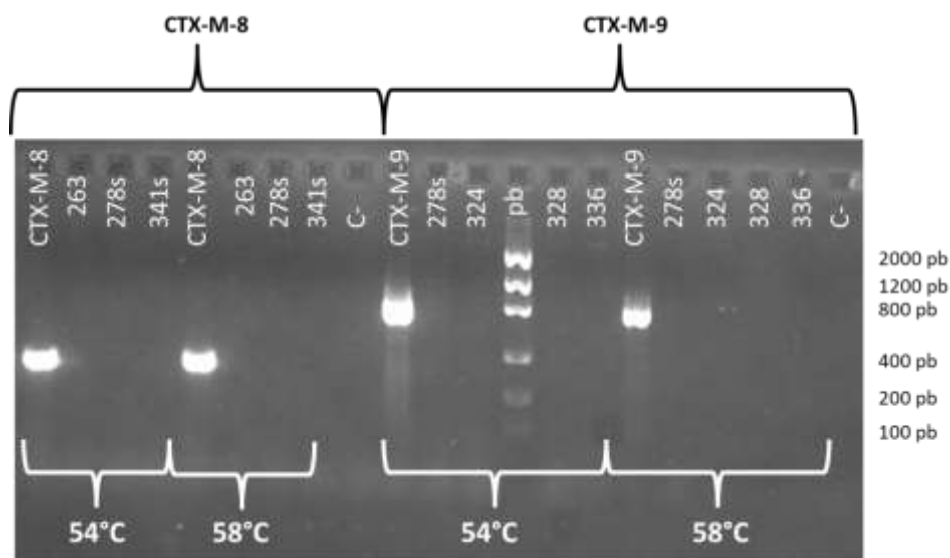


Figura 14 - Resultado das PCR simplex realizadas para pesquisa de genes *bla*_{CTX-M-grupo8} e *bla*_{CTX-M-grupo9} em amostras onde bandas de tamanho esperado foram previamente identificadas por reações multiplex. À esquerda: reação para detecção de *bla*_{CTX-M-grupo8} (333 pb). À direita: reação para detecção de *bla*_{CTX-M-grupo9} (876 pb). Controle negativo da reação (C-).

A reação para detecção de genes *bla*_{OXA} nestas amostras de *Pseudomonas* sp. também gerou um grande número de bandas inespecíficas. Dez amostras (263, 307s, 262s, 88s, 251s, 290, 271 303s, 267s, 840) apresentavam bandas intensas de tamanho molecular diferente do esperado para os produtos da reação (Quadro 1). Destas, seis amostras apresentaram também bandas leves em tamanhos esperados, sendo quatro (88s, 251s, 271, 290) na altura de *bla*_{OXA-grupo2} (587 pb) e duas (307s, 262s) na altura de *bla*_{OXA-grupo10} (197 pb). Além delas, uma amostra (332) apresentou apenas uma leve banda na altura de *bla*_{OXA-grupo1} (311 pb) e outra amostra (325) apresentou banda intensa na altura de *bla*_{OXA-grupo2} (587 pb), o que sugere a presença desses genes nas respectivas amostras (Figura 15). Nenhuma amostra foi positiva para *bla*_{OXA-grupo18-45}.

O protocolo de reação multiplex para detecção de genes *bla*_{OXA} foi elaborado por nosso grupo de trabalho e ainda não está plenamente padronizado. Logo, para confirmar se as bandas apresentadas na Figura 15 são referentes aos respectivos genes *bla*_{OXA}, foram realizadas três reações simplex para detecção de *bla*_{OXA-grupo1}, *bla*_{OXA-grupo2} e *bla*_{OXA-grupo10} nas amostras que apresentaram bandas nas alturas destes genes. Para isso, foram utilizadas como temperaturas de anelamento: 52°C (original do Protocolo do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM)) e 56°C (aumento de 4°C utilizada neste trabalho como estratégia para reduzir a ocorrência de bandas inespecíficas no processo de amplificação) (Figura 16).

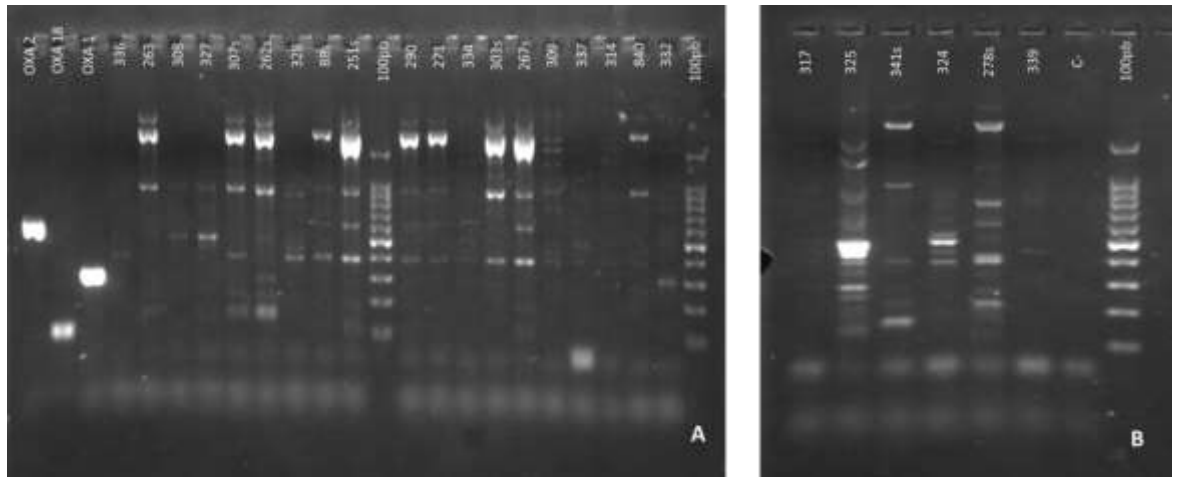


Figura 15 - Reação multiplex para detecção de *bla*_{OXA-grupo1}, *bla*_{OXA-grupo2}, *bla*_{OXA-grupo10} e *bla*_{OXA-grupo18-45}. Lado A: Controles positivos de *bla*_{OXA-grupo2} (OXA 2) com 587 pb, *bla*_{OXA-grupo18-45} (OXA 18) com 109 pb e *bla*_{OXA-grupo1} (OXA 1) com 311 pb. Lado B: Continuação reação multiplex OXA. Controle negativo da reação (C-).

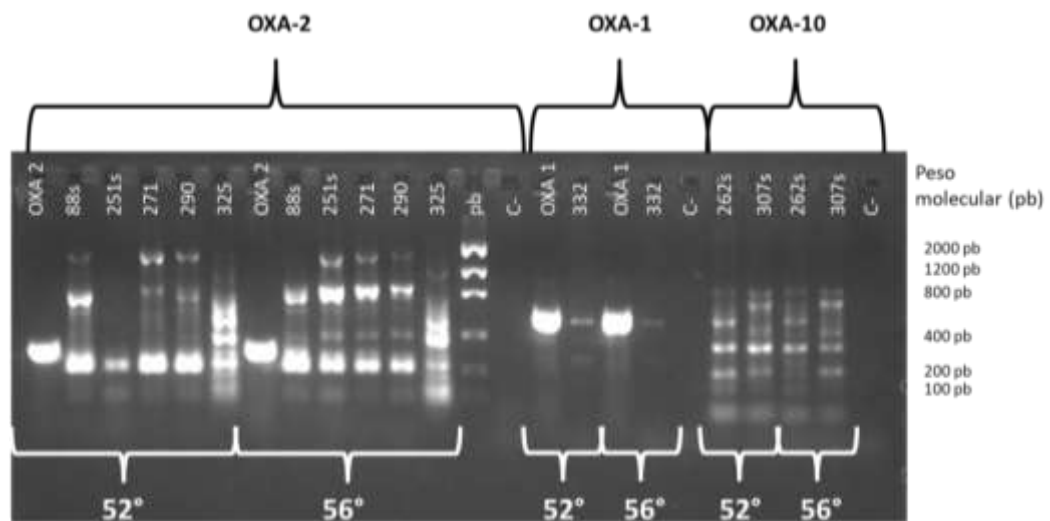


Figura 16 - Resultado das PCR simplex para pesquisa de genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} e *bla*_{OXA-10} nas amostras que apresentaram bandas na altura esperada utilizando reação multiplex. À esquerda: reação para detecção de *bla*_{OXA-grupo2} (587 pb). Ao centro: reação para detecção de *bla*_{OXA-grupo1} (311 pb). À direita: reação para detecção de *bla*_{OXA-grupo10} (197 pb). Controle negativo da reação (C-).

Na reação para detecção de *bla*_{OXA-grupo1}, foi observado que tanto o controle positivo quanto a amostra 332 apresentaram banda na altura do gene (Figura 16, ao centro), em ambas temperaturas. O gene *bla*_{OXA-grupo2} foi apenas detectado nas cepas controles em ambas temperaturas. Apesar das bandas fortes nas amostras, nenhuma apresentou banda na altura de 587 pb, referente a OXA-grupo2 (Figura 16, à esquerda). Por fim, as amostras testadas para *bla*_{OXA-grupo10} aparentemente a amostra 307S tem uma banda em tamanho compatível com o esperado para a amplificação do gene (Figura 16, à direita). Esta avaliação é dificultada pela

ausência de um controle positivo para a reação, mas poderia ser confirmada, assim como no caso do produto compatível com o esperado para *bla*_{OXA-grupo1}, por sequenciamento dos mesmos.

Os genes *bla*_{PER} e *bla*_{VEB} não foram detectados em suas respectivas reações, não tendo sido observada nenhuma banda no gel de agarose.

Desta forma, entre as amostras de *Pseudomonas* sp. caracterizadas genotipicamente como produtoras de alguma das betalactamases pesquisadas, foram identificadas duas amostras possivelmente produtoras de betalactamases do tipo TEM (317 e 337), uma amostra possivelmente produtora de OXA Grupo 1 (332) e uma amostra possivelmente produtora de OXA Grupo 10 (307S). A Tabela 3 traz, compiladas, características destas amostras quanto à sua origem, identificação provável de gênero por MALDI-TOF (score com valores entre 1,70 a 1,99) e perfil fenotípico de resistência aos betalactâmicos utilizados neste trabalho.

Tabela 3 - Características das amostras de *Pseudomonas* possivelmente produtoras de ESBL segundo resultados genotípicos quanto à sua origem, identificação e perfil fenotípico de resistência a betalactâmicos selecionados

Amostra	Identificação (Score MaldiTof Biotyper)*	Mercado. Coleta	Tipo de cultivo	Gene	Perfil Fenotípico de Resistência			
					CMI (µg/mL)		Disco difusão (mm/Categoria)	
					CPM	PIP	TZP	CAZ
307S	<i>P. brassicacearum</i> (1,79)	A.I	Não orgânico	<i>bla</i> _{OXA-10}	16	17/I	21/S	9/R
317	<i>Pseudomonas</i> sp. (1,80)	A.I	Não orgânico	<i>bla</i> _{TEM}	32	30/S	31/S	16/I
332	<i>P. alcaligenes</i> (1,80)	A.I	Não orgânico	<i>bla</i> _{OXA-1}	16	24/S	24/S	16/I
337	<i>Pseudomonas</i> sp. (1,83)	A.I	Não orgânico	<i>bla</i> _{TEM}	32	22/S	24/S	13/R

* Score de 0 a 1,69: identificação não possível; de 1,70 a 1,99: identificação provável de gênero; de 2,00 a 2,29: identificação segura de gênero e provável de espécie; de 2,30 a 3,00: identificação mais provável de espécies. CPM: cefepime; PIP: piperacilina; TZP: piperacilina:tazobactam; CAZ: ceftazidima

6. DISCUSSÃO

Bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência aos betalactâmicos. Entre os intrínsecos, encontram-se diferentes sistemas de efluxo (Normark e Normark, 2002; Mesaros *et al.*, 2007; Strateva e Yordanov, 2009), perda de porinas (Yoneyama e Nakae, 1993), e a produção de betalactamases do tipo AmpC, as quais hidrolisam cefalosporinas e não são inibidas por ácido clavulânico (Normark e Normark, 2002; Jacoby, 2009; Strateva e Yordanov, 2009). Dentre os mecanismos adquiridos, *Pseudomonas* podem produzir ESBL, enzimas CARB (Bush e Jacoby, 2010) e metalobetalactamases (Strateva e Yordanov, 2009; Janvier *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2015). Já foram descritas em *Pseudomonas* ESBL das classes SHV, TEM, GES, OXA, CTX-M, PER e VEB, sendo estas últimas relatadas apenas em amostras clínicas (Bradford, 2001; Mesaros *et al.*, 2007; Picão *et al.*, 2009; Strateva e Yordanov, 2009).

As ESBL são um mecanismo de resistência com disseminação ampla e bem descrita na literatura, podendo ser encontradas em diferentes ambientes e reservatórios como amostras clínicas humanas (Abdallah *et al.*, 2017; Manyahi *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2017), animais de produção (Chen *et al.*, 2017; Elhariri *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017), águas residuais (Dropa *et al.*, 2016; Conte *et al.*, 2017) e águas costeiras (Montezzi *et al.*, 2015; Campana *et al.*, 2017). No entanto, quando se trata de disseminação de ESBL em vegetais, o número de relatos é limitado a alguns trabalhos desenvolvidos fora do Brasil (Raphael *et al.*, 2011; Berman e Riley, 2013; Campos *et al.*, 2013; Bhutani *et al.*, 2015).

O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de genes codificadores de ESBL em amostras do gênero *Pseudomonas* isoladas de alfaces comercializadas no Rio de Janeiro. Quarenta e cinco amostras apresentando resistência ou resistência intermediária a cefepime foram identificadas, mas somente 25 apresentaram fenótipo levemente sugestivo de ESBL (n=24) ou resistência a ceftazidima e piperacilina (n=1). A identificação de amostras resistentes a cefepime sem que haja produção de ESBL pode ser explicada pela expressão de bombas de efluxo, redução no número de porinas, além da possível ocorrência de betalactamases com perfis hidrolíticos atípicos (Yoneyama e Nakae, 1993; Strateva e Yordanov, 2009; Bush e Jacoby, 2010). No entanto, é importante destacar que, das 25 amostras, 8 foram subpopulações selecionadas no interior dos halos obtidos no teste fenotípico para detecção de ESBL. MacDougall afirma, em uma revisão publicada em 2011, que a desrepressão contínua da AmpC cromossomal de *Pseudomonas* pode levar à resistência ou resistência intermediária a cefepime. Segundo o autor, este cenário pode ser alcançado por mutações que

afetam a expressão de AmpD, o que leva a um acúmulo de precursores de parede celular no citosol e contínua expressão de AmpC (MacDougall, 2011). Mutações neste sistema podem ter influenciado as CMI para cefepime apresentadas pelas amostras neste projeto. A seleção de subpopulações menos sensíveis nos testes de disco difusão que realizamos também pode ser decorrência disso.

Das 45 amostras que apresentaram $CMI \geq 16 \mu\text{g/mL}$ para cefepime, 35 (77,8%) foram isoladas de alfaces adquiridas numa mesma data e de um mesmo mercado, tendo sido isoladas tanto de alface cultivada em regime orgânico (n=19) quanto não orgânico (n=16). Este resultado sugere uma contaminação ocasional nestes lotes de alfaces, e não uma ampla disseminação de bactérias resistentes a betalactâmicos nas alfaces disponíveis no mercado no Rio de Janeiro. Curiosamente, não foi observado o mesmo nível de contaminação na segunda rodada de amostras do mesmo mercado (com marcas dos mesmos produtores) coletada algumas semanas depois (Tabela 2).

No que diz respeito à caracterização dos genes de ESBL possivelmente associados aos fenótipos observados, as reações multiplex utilizadas apresentaram muitas bandas inespecíficas. Esta dificuldade pode ter sido consequência da necessidade de utilizar protocolos originalmente projetados para *P. aeruginosa* de origem clínica, e evidenciou o desafio de se trabalhar com amostras de origem ambiental não extensamente caracterizadas. Para tentar superar o problema, utilizamos a estratégia de aumentar a temperatura das reações até o limite de detecção dos genes nas cepas controle, o que em alguns casos eliminou todas as bandas originalmente detectadas nas amostras (como no caso de *bla_{CTX-M}*), e em outros continuou gerando bandas indesejadas (como no caso de *bla_{OXA}*). Diante disso, amostras que geraram bandas de tamanhos compatíveis com os respectivos genes de interesse em qualquer uma das estratégias de PCR foram selecionadas para a pesquisa dos mesmos por reação simplex. De fato, a tentativa de aumentar a especificidade das PCR multiplex com base no aumento da temperatura foi uma interessante experiência, mas não gerou a otimização esperada.

A avaliação genotípica mostrou que as amostras submetidas às reações de amplificação não apresentavam genes codificadores de ESBL dos tipos PER e VEB. Este é um resultado de certa forma esperado, uma vez que, até onde foi possível apurar, estas ESBL só foram, até o momento, identificadas em *Pseudomonas* de origem clínica (Bradford, 2001; Weldhagen, Poirel e Nordmann, 2003; Mesaros *et al.*, 2007; Strateva e Yordanov, 2009). Também não foram detectadas em nossa coleção amostras produtoras de *bla_{SHV}*, *bla_{GES}* e *bla_{CTX-M}*, ainda que alguns estudos desenvolvidos fora do Brasil já tenham descrito estes genes em bactérias isoladas de alface (Raphael, Wong e Riley, 2011; Campos *et al.*, 2013; Bhutani *et al.*, 2015).

Considerando as bandas observadas nas PCR simplex, 4 amostras possivelmente produtoras de ESBL dos tipos TEM, OXA grupo 1 ou OXA grupo 10 foram identificadas neste trabalho. Entre as enzimas codificadas pelos genes detectados, betalactamases do tipo TEM podem ou não ser ESBL com base na sua sequência de aminoácidos. Em contraste, entre os vários perfis fenotípicos atribuídos a enzimas OXA, as pertencentes aos grupos 1 e 10 são consideradas ESBL (Bradford, 2001). No entanto, quando avaliado o perfil fenotípico de suscetibilidade destas amostras, os halos obtidos com os discos de piperacilina e piperacilina com tazobactam não sugerem fortemente a expressão de ESBL. De fato, a resistência ou resistência intermediária identificada a cefepime ou ceftazidima nestas amostras pode ser, como citado anteriormente, decorrente da hidrólise por altas concentrações de AmpC, associada ou não ao efeito de bombas de efluxo ou perda de porinas. Assim, nossos resultados são sugestivos da possível ocorrência de genes *bla*_{TEM} e *bla*_{OXA} nas amostras pesquisadas, que poderia ser confirmada por sequenciamento dos produtos de PCR e testes bioquímicos baseados em hidrólise.

Assim, vistos em conjunto, os resultados deste estudo indicam que *Pseudomonas* isoladas de vegetais aparentemente não são importantes veículos de disseminação de genes carreadores de ESBL, ainda que, intrinsecamente sejam capazes de resistir a vários antimicrobianos que seriam hidrolizados por estas enzimas.

7. CONCLUSÃO

Entre 246 amostras de *Pseudomonas* isoladas de alface, 45 (19%) apresentaram resistência ou resistência intermediária a cefepime, segundo os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2017).

Submetidas ao teste fenotípico para detecção de ESBL, 24 das 45 amostras apresentaram alguma distorção no halo pela influência inibitória do tazobactam e uma amostra foi resistente a piperacilina e ceftazidima, tendo sido selecionadas para os testes genotípicos

A detecção de genes codificadores de ESBL foi dificultada pela pouca especificidade das PCR utilizadas. Foram identificadas 4 amostras possivelmente produtoras de *bla*_{TEM}, *bla*_{OXAgrupo1} ou *bla*_{OXAgrupo10}. A confirmação da ocorrência e identidade destes genes depende de testes adicionais.

Pseudomonas sp. isoladas de alfaces comercializadas no Rio de Janeiro não parecem ser importantes agentes disseminadores de genes codificadores de ESBL.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, H. M., Alnaiemi, N., Reuland, E. A., Wintermans, B. B., Koek, A., Abdelwahab, A. M., Samy, A., Abdelsalam, K. W., e Vandebroucke-Grauls, C. M. J. E. (2017) Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Egyptian patients with community-onset gastrointestinal complaints: a hospital -based cross-sectional study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6, 62. doi:10.1186/s13756-017-0219-7
- ACS. (2017) Discovery and Development of Penicillin. *American Chemical Society International Historic Chemical Landmarks*. Obtido de <http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html> [Acessado dia 06/04/2017, às 13 horas]
- al Naiemi, N., Duim, B., e Bart, A. (2006) A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 11), 1607–1608. doi:10.1099/jmm.0.46704-0
- Ambler, R. P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331.
- Aronoff, S. C., Jacobs, M. R., Johanning, S., e Yamabe, S. (1984) Comparative activities of the beta-lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(4), 580–582.
- Asbel, L. E., e Levison, M. E. (2000) Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(2), 435–447, ix.
- Bachiri, T., Bakour, S., Ladjouzi, R., Thongpan, L., Rolain, J. M., e Touati, A. (2017) High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 35–40. doi:10.1016/j.jgar.2016.10.005
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C., e Astilean, A. (2013) New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12, 22. doi:10.1186/1476-0711-12-22
- Batalha-Jesus, A. A., Martins, N., De Freitas, A. A. R., Souza, J. C., Pires, J. R., Neves, D. M., Teixeira, L. M., e Moreira, B. M. (2015) Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in wild birds newly-admitted to triage centers in Rio de Janeiro state, Brazil. Apresentado em ICAAC - Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- Batchelor, F. R., Doyle, F. P., Nayler, J. H., e Rolinson, G. N. (1959) Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature*, 183(4656), 257–258.
- Bellido, F., Veuthey, C., Blaser, J., Bauernfeind, A., e Pechère, J. C. (1990) Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25(1), 57–68.
- Berman, H. F., e Riley, L. W. (2013) Identification of novel antimicrobial resistance genes from microbiota on retail spinach. *BMC microbiology*, 13, 272. doi:10.1186/1471-2180-13-272
- Bhutani, N., Muraleedharan, C., Talreja, D., Rana, S. W., Walia, S., Kumar, A., e Walia, S. K. (2015) Occurrence of Multidrug Resistant Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria on Iceberg Lettuce Retailed for Human Consumption. *BioMed Research International*, 2015, 547547. doi:10.1155/2015/547547
- Blaak, H., van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., Docters van Leeuwen, A. E., Lynch, G., van Overbeek, W. M., e de Roda Husman, A. M. (2014) Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*, 168–169, 8–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006
- Bonnin, R. A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J.-R., e Poirel, L. (2011) Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 349–354. doi:10.1128/AAC.00773-10
- Botelho, L. A. B. (2016) *Elementos Genéticos Móveis Associados à Presença e Disseminação de β -Lactamases em Bactérias do Gênero Escherichia Isoladas de Carne de Frango*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., Costa e Silva, J. L., Regis, D. V. V., Picão, R. C., Moreira, B. M., e Bonelli, R. R. (2015) Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 249–254. doi:10.1590/0074-02760140389
- Bradford, P. A. (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951, table of contents. doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., e Mietzner, T. A. (2014) Capítulo 16: *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e bactérias gram-negativas incomuns. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. (26^o ed). AMGH.
- Bush, K., e Jacoby, G. A. (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09
- Bush, K., Jacoby, G. A., e Medeiros, A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211–1233.
- Campana, E. H., Montezzi, L. F., Paschoal, R. P., e Picão, R. C. (2017) NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 119–121. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.10.006
- Campana, E. H. (2013) *Resistência aos carnapenens e sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa: estudo dos mecanismos de resistência envolvidos*. Universidade Federal de São Paulo, Brasil.
- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., e Antunes, P. (2013) Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 464–470. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005
- Cantón, R., e Coque, T. M. (2006) The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466–475. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011
- Cantón, R., González-Alba, J. M., e Galán, J. C. (2012) CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3, 110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110
- Casella, T., Rodríguez, M. M., Takahashi, J. T., Ghiglione, B., Dropa, M., Assunção, E., Nogueira, M. L., Lincopan, N., Gutkind, G., e Nogueira, M. C. L. (2015) Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 88–91. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.001
- CCIH-Hospital Sírío Libanês. (2014) Protocolo de antibioticoprofilaxia no paciente cirúrgico.
- CCIH-UFRJ. (2012) Antibioticoprofilaxia nos diferentes procedimentos e especialidades cirúrgicas. *CCIH Responde*.
- Celenza, G., Pellegrini, C., Caccamo, M., Segatore, B., Amicosante, G., e Perilli, M. (2006) Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 975–978. doi:10.1093/jac/dk1055
- Chagas, T. P. G., Seki, L. M., Cury, J. C., Oliveira, J. a. L., Dávila, A. M. R., Silva, D. M., e Asensi, M. D. (2011) Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 572–581. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x
- Chen, C.-M., Ke, S.-C., Li, C.-R., Wu, Y.-C., Chen, T.-H., Lai, C.-H., Wu, X.-X., e Wu, L.-T. (2017) High Diversity of Antimicrobial Resistance Genes, Class 1 Integrons, and Genotypes of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Beef Carcasses. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*. doi:10.1089/mdr.2016.0223
- CLSI, C. and L. S. I. (2012) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, M02, Eleventh Edition.
- CLSI, C. and L. S. I. (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 27 ed.
- Conte, D., Palmeiro, J. K., da Silva Nogueira, K., de Lima, T. M. R., Cardoso, M. A., Pontarolo, R., Degaut Pontes, F. L., e Dalla-Costa, L. M. (2017) Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 62–69. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.031

- Cristóvão, F., Alonso, C. A., Igrejas, G., Sousa, M., Silva, V., Pereira, J. E., Lozano, C., Cortés-Cortés, G., Torres, C., e Poeta, P. (2017) Clonal diversity of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of wild animals. *FEMS microbiology letters*, 364(5). doi:10.1093/femsle/fnx039
- da Silva, K. C., Cunha, M. P. V., Cerdeira, L., de Oliveira, M. G. X., de Oliveira, M. C. V., Gomes, C. R., Lincopan, N., Knöbl, T., e Moreno, A. M. (2017) High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(1), 64–67. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.001
- Dalhoff, A., Janjic, N., e Echols, R. (2006) Redefining penems. *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 1085–1095. doi:10.1016/j.bcp.2005.12.003
- de Araujo, C. F. M., Silva, D. M., Carneiro, M. T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., Asensi, M. D., Zahner, V., e Carvalho-Assef, A. P. D. (2016) Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4380–4383. doi:10.1128/AAC.02753-15
- de Oliveira, D. V., Nunes, L. S., Barth, A. L., e Van Der Sand, S. T. (2017) Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-017-0970-6
- Drawz, S. M., e Bonomo, R. A. (2010) Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09
- Dropa, M., Lincopan, N., Balsalobre, L. C., Oliveira, D. E., Moura, R. A., Fernandes, M. R., da Silva, Q. M., Matté, G. R., Sato, M. I. Z., e Matté, M. H. (2016) Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(5), 4953–4958. doi:10.1007/s11356-016-6079-5
- Dubois, V., Poirel, L., Marie, C., Arpin, C., Nordmann, P., e Quentin, C. (2002) Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), 638–645.
- Ducret, V., Gonzalez, M. R., Scignari, T., e Perron, K. (2016) OprD Repression upon Metal Treatment Requires the RNA Chaperone Hfq in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genes*, 7(10). doi:10.3390/genes7100082
- Elhariri, M., Hamza, D., Elhelw, R., e Dorgham, S. M. (2017) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in camel in Egypt: potential human hazard. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 21. doi:10.1186/s12941-017-0197-x
- Essack, S. Y. (2001) The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharmaceutical Research*, 18(10), 1391–1399.
- Ferreira, J. C., Penha Filho, R. a. C., Andrade, L. N., Berchieri, A., e Darini, A. L. C. (2014a) Detection of chromosomal bla(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(10), O623-626. doi:10.1111/1469-0691.12531
- Ferreira, Joseane Cristina, Penha Filho, R. A. C., Andrade, L. N., Berchieri, A., e Darini, A. L. C. (2014b) Inc11/ST113 and Inc11/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(4), 304–306. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.012
- Fu, K. P., e Neu, H. C. (1978) Piperacillin, a new penicillin active against many bacteria resistant to other penicillins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(3), 358–367.
- Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B., e Mobashery, S. (2004) The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40802–40806. doi:10.1074/jbc.M403589200
- Ghamrawi, R. J., Neuner, E., e Rehm, S. J. (2015) Ceftaroline fosamil: A super-cephalosporin? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 82(7), 437–444. doi:10.3949/ccjm.82a.14105
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I.-H., Jeong, S. H., Kang, H.-K., e Lee, K. (2015) Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*, 47(2), 81–97. doi:10.3947/ic.2015.47.2.81
- Jacoby, G. A. (2009) AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00036-08

- Janvier, F., Jeannot, K., Tessé, S., Robert-Nicoud, M., Delacour, H., Rapp, C., e Mérens, A. (2013) Molecular characterization of blaNDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3408–3411. doi:10.1128/AAC.02334-12
- Karkaba, A., Grinberg, A., Benschop, J., e Pleydell, E. (2017) Characterisation of extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from companion animals in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 65(2), 105–112. doi:10.1080/00480169.2016.1271730
- Kisgen, J., e Whitney, D. (2008) Ceftobiprole, a Broad-Spectrum Cephalosporin With Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 33(11), 631–641.
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. I., e Graham, D. W. (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, 44(2), 580–587. doi:10.1021/es901221x
- Koga, V. L., Rodrigues, G. R., Scandorieiro, S., Vespero, E. C., Oba, A., de Brito, B. G., de Brito, K. C. T., Nakazato, G., e Kobayashi, R. K. T. (2015) Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6), 479–485. doi:10.1089/fpd.2014.1888
- Li, S., Liu, J., Zhou, Y., e Miao, Z. (2017) Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* recovered from companion dogs in Tai'an, China. *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(3), 282–286.
- MacDougall, C. (2011) Beyond Susceptible and Resistant, Part I: Treatment of Infections Due to Gram-Negative Organisms With Inducible β -Lactamases. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics : JPPT*, 16(1), 23–30.
- Madigan, M., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., e Clark, D. P. (2010) Crescimento Microbiano. *Microbiologia de Brock* (12^o ed). Madigan, M.T. Martinko, J. M., Dunlap, P.V.
- Mandell, G. (1985) Cephalosporins. In: eds. 2th ed. *Principles and practice of infectious diseases*. (2^o ed). Mandell, G.L., Douglas, R.G.Jr, Bennett, J.E.
- Manyahi, J., Moyo, S. J., Tellevik, M. G., Ndugulile, F., Urassa, W., Blomberg, B., e Langeland, N. (2017) Detection of CTX-M-15 beta-lactamases in Enterobacteriaceae causing hospital- and community-acquired urinary tract infections as early as 2004, in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC infectious diseases*, 17(1), 282. doi:10.1186/s12879-017-2395-8
- Mendes, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C. C., e Tufik, S. (2007) Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 544–547. doi:10.1128/JCM.01728-06
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P. M., e Van Bambeke, F. (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(6), 560–578. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x
- Miranda, C. C., de Filippis, I., Pinto, L. H., Coelho-Souza, T., Bianco, K., Cacci, L. C., Picão, R. C., e Clementino, M. M. (2015) Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 118(6), 1276–1286. doi:10.1111/jam.12792
- Montezzi, L. F., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Justo, L. H., Paschoal, R. P., da Silva, I. L. V. D., Souza, M. do C. M., Drolshagen, M., e Picão, R. C. (2015) Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(2), 174–177. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., e Pfaller, M. A. (2014) Agentes antibacterianos. *Microbiologia Médica* (7^o ed).
- Naas, T., Poirel, L., Karim, A., e Nordmann, P. (1999) Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 176(2), 411–419.
- Nathwani, D., e Wood, M. J. (1993) Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, 45(6), 866–894. doi:10.2165/00003495-199345060-00002

- Neu, H. C. (1985a) Penicillins. *Principles and practice of infectious diseases* (2^o ed). Mandell, G.L., Douglas, R.G.Jr, Bennett, J.E.
- Neu, H. C. (1985b) Other Beta-Lactam Antibiotics. *Principles and practice of infectious diseases* (2^o ed). Mandell, G.L., Douglas, R.G.Jr, Bennett, J.E.
- Njage, P. M. K., e Buys, E. M. (2015) Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 462–473. doi:10.1111/1751-7915.12234
- Normark, B. H., e Normark, S. (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91–106.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., e Bonomo, R. A. (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. doi:10.1128/AAC.00296-11
- Park, J.-H., Kim, H.-S., Yim, J.-H., Kim, Y.-J., Kim, D.-H., Chon, J.-W., Kim, H., Om, A.-S., e Seo, K.-H. (2017) Comparison of the isolation rates and characteristics of *Salmonella* isolated from antibiotic-free and conventional chicken meat samples. *Poultry Science*. doi:10.3382/ps/pex055
- Peña, C., Suarez, C., Tubau, F., Juan, C., Moya, B., Dominguez, M. A., Oliver, A., Pujol, M., e Ariza, J. (2009) Nosocomial Outbreak of a Non-Cefepime-Susceptible Ceftazidime-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain Overexpressing MexXY-OprM and Producing an Integron-Borne PSE-1 β -Lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), 2381–2387. doi:10.1128/JCM.00094-09
- Picão, R. C., Poirel, L., Gales, A. C., e Nordmann, P. (2009) Further Identification of CTX-M-2 Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 2225–2226. doi:10.1128/AAC.01602-08
- Pitart, C., Marco, F., Keating, T. A., Nichols, W. W., e Vila, J. (2015) Activity of ceftazidime-avibactam against fluoroquinolone-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3059–3065. doi:10.1128/AAC.05136-14
- Poirel, L., Naas, T., e Nordmann, P. (2008) Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 75–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01865.x
- Poole, K. (2004) Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(17), 2200–2223. doi:10.1007/s00018-004-4060-9
- Raphael, E., Wong, L. K., e Riley, L. W. (2011) Extended-spectrum Beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1601–1607. doi:10.1128/AEM.02506-10
- Rasheed, M. U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., e Jamil, K. (2014) Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 56(4), 341–346.
- Reeves, D. S., Bywater, M. J., e Holt, H. A. (1978) Antibacterial synergism between beta-lactam antibiotics: results using clavulanic acid (BRL14151) with amoxicillin, carbenecillin or cephaloridine. *Infection*, 6, 9–16.
- Rodriguez, V., Inagaki, J., e Bodey, G. P. (1973) Clinical pharmacology of ticarcillin (alpha-carboxyl-3-thienylmethyl penicillin, BRL-2288). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(1), 31–36.
- Rolinson, G. N., e Sutherland, R. (1967) Carbenicillin, a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7, 609–613.
- Sabath, L. D. (1989) Reappraisal of the antistaphylococcal activities of first-generation (narrow-spectrum) and second-generation (expanded-spectrum) cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(4), 407–411.
- Sader, H. S., e Jones, R. N. (1992) Historical overview of the cephalosporin spectrum: four generations of structural evolution. *ANMLDO*, 8(12), 75–84.
- Sambrook, J., e Russell, D. W. (2006) Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb.prot4455. doi:10.1101/pdb.prot4455

- Sampaio, J. L. M. (2011) *Caracterização de betalactamases de espectro ampliado e KPC em Enterobacter cloacae e Enterobacter aerogenes isoladas de casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde em pacientes atendidos em hospitais da cidade de São Paulo*. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., e Kamal, M. A. (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002
- Shen, J., Pan, Y., e Fang, Y. (2015) Role of the Outer Membrane Protein OprD2 in Carbapenem-Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 10(10), e0139995. doi:10.1371/journal.pone.0139995
- Strateva, T., e Yordanov, D. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 9), 1133–1148. doi:10.1099/jmm.0.009142-0
- Suárez, C., e Gudiol, F. (2009) [Beta-lactam antibiotics]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001
- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Shimada, K., e Kirikae, T. (2014) Biochemical analysis of metallo- β -lactamase NDM-3 from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6), 3538–3540. doi:10.1128/AAC.02793-13
- Tartaglione, T. A., e Polk, R. E. (1985) Review of the new second-generation cephalosporins: cefonicid, ceforanide, and cefuroxime. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy*, 19(3), 188–198.
- Tavares, W. (2000) [Problems with gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs]. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 33(3), 281–301.
- Tipper, D. J. (1985) Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics*, 27(1), 1–35.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., e Case, C. L. (2010) *Capther 11: The Prokaryotes: Domain Bacteria and Archaea. Microbiology: An Introduction* (10^o ed). Pearson Education, Inc.
- Trabulsi, L. R., e Alterthum, F. (2008) *Capitulo 49: Pseudomonas aeruginosa. Microbiologia* (5^o ed). Atheneu.
- Ullah, W., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S., Rehman, Z. U., Ali, N., e Muhammad, N. (2017) CTX-M-15 and OXA-10 beta lactamases in multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: First report from Pakistan. *Microbial Pathogenesis*, 105, 240–244. doi:10.1016/j.micpath.2017.02.039
- Wang, J., Ma, Z.-B., Zeng, Z.-L., Yang, X.-W., Huang, Y., e Liu, J.-H. (2017) The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoological Research*, 38(2), 55–80. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., e Nordmann, P. (2003) Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2385–2392.
- Wright, G. D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470. doi:10.1016/j.addr.2005.04.002
- Yaici, L., Haenni, M., Métayer, V., Saras, E., Mesbah Zekar, F., Ayad, M., Touati, A., e Madec, J.-Y. (2017) Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 66–72. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.011
- Yoneyama, H., e Nakae, T. (1993) Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(11), 2385–2390.
- Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T., e De Champs, C. (2016) Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 22(7), 431–435. doi:10.1016/j.jiac.2016.03.005
- Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagacé-Wiens, P. R. S., Denisuik, A., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J., Lynch, J. P., e Karlowisky, J. A. (2013) Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. *Drugs*, 73(2), 159–177. doi:10.1007/s40265-013-0013-7