



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Victor Del Peloso

**Análise fenotípica e molecular da resistência aos antimicrobianos em  
*Pseudomonas aeruginosa* provenientes de espécimes clínicos de hospitais  
privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo.**

Rio de Janeiro

2024

Victor Del Peloso

**Análise fenotípica e molecular da resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de espécimes clínicos de hospitais privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

P392 Peloso, Victor

Análise fenotípica e molecular da resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de espécimes clínicos de hospitais privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo / Victor Del Peloso. – 2024.

55 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques.

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Resistência Microbiana a Medicamentos. 2. Infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Infecção Hospitalar. 4. Hospitais Privados. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Leão, Robson de Souza. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 615.015.8:579.841.1

Bibliotecário: Hugo da Costa Maia Bernardo - CRB-7/7426

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Victor Del Peloso

**Análise fenotípica e molecular da resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de espécimes clínicos de hospitais privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 3 de outubro de 2024.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Claudia de Paula Rosa  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef  
Instituto Oswaldo Cruz

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Mario Doi  
Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein

Rio de Janeiro

2024

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha família que é a minha base de sustentação diária e é formada pelas pessoas mais importantes pra mim nessa vida (Pedro, Denise e Luiza), a minha namorada Ulli que é minha parceira de vida e com quem eu quero estar para sempre ao lado e em especial aos meus avós, Alair, Sônia e Izaura (*in memoriam*) que também me criaram e são para mim o verdadeiro sentido de amor, carinho e afeto.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as principais pessoas que contribuíram para a realização e conclusão dessa dissertação, em especial a minha família que me apoia diariamente em todas as minhas lutas, sonhos e objetivos, a minha namorada que está ao meu lado em todos os momentos dessa vida e é quem me faz diariamente me tornar uma pessoa melhor, aos meus amigos fiéis que por minha sorte, não são poucos, e também a todas/todos os meus colegas de equipe (Copa Star e Richet) que me ensinam todos os dias o verdadeiro sentido de dedicação, empenho, responsabilidade e sobre parceria dentro de um laboratório de microbiologia, entregando um trabalho de muita qualidade e me dando muito prazer e orgulho de poder liderá-los diariamente.

Agradeço a minha orientadora Dra. Elizabeth Marques por toda dedicação, conhecimento, paciência e pela oportunidade que me deu de fazer parte de um grupo tão especial e seletivo como o do LabMIFC da UERJ. Agradeço também meu coorientador Dr. Robson Leão por todo suporte, orientações e paciência no apoio durante a realização dessa dissertação.

Agradeço também aos meus colegas do LabMIFC que sempre estiveram dispostos a ajudar nos momentos em que precisei dentro do laboratório.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós Graduação de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por toda estrutura, apoio, organização e por promover um programa de altíssima qualidade durante todos esses anos.

Vencedores não são aqueles que nunca falham mas os que nunca desistem.

*Edwin Louis Cole*

## RESUMO

PELOSO, Victor. **Análise fenotípica e molecular da resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de espécimes clínicos de hospitais privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo.** 2024. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose, frequentemente relacionado a infecções associadas à assistência à saúde. Devido à produção de múltiplos fatores de virulência e mecanismos multifacetados de resistência, as infecções por essa bactéria apresentam alta morbidade e mortalidade, constituindo um problema de saúde pública global. O presente estudo teve como objetivo determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de primeira linha e a novos antimicrobianos usados na prática clínica; a ocorrência de *P. aeruginosa* multirresistente (MDR), a frequência de resistência a carbapenêmicos e caracterizar os genes codificadores de carbapenemases em amostras de pacientes assistidos em hospitais privados nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. O perfil de sensibilidade foi avaliado por disco-difusão e a detecção de genes de carbapenemases, por PCR em tempo real comercial. Entre os 130 isolados testados, os antimicrobianos com maiores taxas de resistência foram levofloxacina (40%), imipenem (36%) e meropenem (34%), além disso, 14 (11%) foram classificados como MDR e 20 (15%) com resistência extensiva (XDR). Esses isolados foram testados frente a novos antimicrobianos e a polimixina, sendo 44% resistentes à ceftazidima/avibactam e 19% resistentes à polimixina. A investigação dos genes de carbapenemases em 14 isolados MDR revelou dois positivos para o gene *bla*-KPC e um para o gene *bla*-VIM. Além disso, o gene *bla*-CTX-M, associado a betalactamases de espectro estendido (ESBL), foi detectado em um isolado. Esses resultados indicam que perfis MDR e XDR em alguns hospitais estudados estão associados à resistência aos carbapenêmicos, reduzindo as opções terapêuticas em infecções graves. Dos 14 isolados resistentes a carbapenêmicos, apenas três apresentaram genes de carbapenemases, sugerindo a presença de outros mecanismos de resistência ou outras carbapenemases não pesquisadas. Além disso, a taxa de resistência de 44% à ceftazidima/avibactam sugere a emergência de mecanismos de resistência a esse antimicrobiano recentemente introduzido na prática clínica, o que reforça a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a sua natureza e funcionamento.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; multirresistência; infecções relacionadas a assistência à saúde; carbapenemases.

## ABSTRACT

PELOSO, Victor. **Phenotypic and molecular analysis of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from clinical specimens in private hospitals in the states of Rio de Janeiro and São Paulo.** 2024. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative, non-glucose fermenting bacillus that is frequently associated with healthcare-associated infections. Due to the production of multiple virulence factors and multifaceted resistance mechanisms, infections with this bacterium have a high morbidity and mortality rates, constituting a global public health problem. The aim of this study was to determine the susceptibility profile to first-line antimicrobials and new antimicrobials used in clinical practice; assess the occurrence of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa*; analyse the frequency of carbapenem resistance and characterize carbapenemase-encoding genes in samples from patients treated in private hospitals in Rio de Janeiro and São Paulo. The susceptibility profile was assessed by disk diffusion and carbapenemase gene detections was performed by commercial real-time PCR. Among 130 isolates, the antimicrobials with the highest resistance rates were levofloxacin (40%), imipenem (36%) and meropenem (34%). Additionally, 14 (11%) isolates were classified as MDR and 20 (15%) as extensively drug-resistant (XDR). These isolates were further tested against new antimicrobials and polymyxins, with 44% being resistant to ceftazidime/avibactam and 19% resistant to polymyxin. Carbapenemase genes were investigated in 14 isolates, revealing two positive for the *bla*-KPC gene and one for the *bla*-VIM gene. Moreover, the *bla*-CTX-M gene, associated with extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), was detected in one isolate. These results indicate that MDR and XDR profiles in some hospitals are associated with resistance to carbapenems, reducing therapeutic options for serious infections. Among the 14 carbapenem-resistant isolates, only three exhibited carbapenemase genes, suggesting the presence of other resistance mechanisms or unstudied carbapenemases. Furthermore, the 44% resistance rate to ceftazidime/avibactam suggests the emergence of resistance mechanisms to this recently antimicrobial introduced into clinical practice, highlighting the need for more in-depth studies on its nature and function.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; multidrug resistance; healthcare-related infections; carbapenemases.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfis das unidades hospitalares estudadas .....	30
Tabela 2 – Distribuição temporal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em hospitais da rede privada .....	33
Tabela 3 – Distribuição dos espécimes clínicos com isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> entre os hospitais de origem .....	34
Tabela 4 – Fenótipos encontrados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos em 130 isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	36
Tabela 5 – Perfis de resistência aos antimicrobianos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	37
Tabela 6 – Percentuais de sensibilidade das novas drogas em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em isolados multidroga-resistentes e extensivo droga-resistentes .....	38
Tabela 7 – Perfil de sensibilidade a novas drogas em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com perfis multidroga-resistentes e extensivo droga-resistentes .....	39
Tabela 8 – Perfil molecular de isolados positivos para betalactamases de espectro estendido e carbapenemases em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AK	Amicacina
AMR	Resistência aos antimicrobianos
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CAZ	Ceftazidima
CAZ/AVI	Ceftazidima/Avibactam
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CTX-M	Cefotaximase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient ágar</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMA	Enzima modificadora de Aminoglicosídeos
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
FC	Fibrose Cística
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas / Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FEP	Cefepime
GES	<i>Guiana Extended-Spectrum</i>
GTDP	<i>Genome Taxonomy Database</i>
IMP	Imipenemase
IMI	Imipenem
IRAS	Infecções relacionadas a assistência à saúde
ITU	Infecção de trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LabMIFC	Laboratório de Microbiologia da Fibrose Cística
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LBA	Lavado Bronco-alveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
LEV	Levofloxacina

MALDI-	
TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MER	Meropenem
MBL	Metalo- $\beta$ -lactamases
NDM	New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinas
PAV	Pneumonia associada a ventilação mecânica
PBP's	<i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PER	<i>Pseudomonas extended resistance</i>
P/T	Piperacilina/tazobactam
rRNA	RNA ribosomal
SHV	<i>Sulphydryl variable</i>
SPM	São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase
ST	<i>Sequence type</i>
TOB	Tobramicina
UTI	Unidades de terapia intensiva
VIM	<i>Verona Integron-encoded Metallo-Beta-Lactamase</i>
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
β	Beta
mL	Mililitros
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius
mg	Miligramas
mm	Milímetros

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
1.1	<b>Geral</b> .....	24
1.2	<b>Específicos</b> .....	24
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
2.1	<b>Amostragem</b> .....	25
2.2	<b>Identificações das amostras bacterianas</b> .....	25
2.2.1	<u>Análise dos resultados da espectrometria de massas</u> .....	26
2.3	<b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos</b> .....	26
2.4	<b>Categorizações dos perfis de resistência</b> .....	28
2.5	<b>Detecção molecular de genes responsáveis pela produção de carbapenemases e de betalactamases de espectro estendido (ESBL)</b> .....	28
3	<b>RESULTADOS</b> .....	30
3.1	<b>Amostragem</b> .....	30
3.2	<b>Espécimes clínicos</b> .....	34
3.3	<b>Identificação dos isolados por MALDITOF</b> .....	35
3.4	<b>Teste de sensibilidade aos antimicrobianos</b> .....	35
3.5	<b>Perfis dos isolados de acordo com a resistência aos antimicrobianos</b> .....	36
3.6	<b>Perfis de sensibilidade das novas drogas e de Polimixina</b> .....	38
3.7	<b>Perfis de resistência dos isolados MDR e XDR</b> .....	38
3.8	<b>Perfil molecular dos isolados positivos para ESBL e Carbapenemases</b> ....	40
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
	<b>ANEXO A – Perfis de sensibilidade dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de espécimes clínicos de hospitais privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo</b> .....	54

## INTRODUÇÃO

### O gênero *Pseudomonas*

Em 1882 um farmacêutico francês chamado Carle Gessard publicou no artigo “On the blue and green coloration of bandages” o primeiro isolamento bem sucedido de um microrganismo que aparentemente chamava mais atenção e despertava mais curiosidade no objetivo de isolamento por tornar os curativos de feridas de pacientes com sinais infecciosos averdeados ou azulados, nomeando essa bactéria como *Bacillus pyocyaneus*, que futuramente foi classificada e nomeada como *P. aeruginosa* (Gessard, 1882). Com o advento de técnicas moleculares cada vez mais avançadas e precisas o gênero *Pseudomonas* que foi descrito anos depois por Migula (1984) e segue sendo constantemente atualizado com novas espécies e representa o bacilo gram negativo com maior número de espécies descritas.

Segundo o *Genome Taxonomy Database* (GTDB), dentro da família Pseudomonadaceae, existem nove gêneros classificados atualmente *Atopomonas*, *Azomonas*, *Azobacter*, *Entomonas*, *Halopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Stutzerimonas*, *Thiopseudomonas* e *Ventosimonas* (<https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f Pseudomonadaceae> acessado em 15 de julho de 2024). Dentro do gênero *Pseudomonas*, de acordo com o *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN), atualmente existem 342 espécies validadas, excluindo subespécies e sinônimos (<https://lpsn.dsmz.de/genus/Pseudomonas>, acessado em 26/08/2024). Dentre as principais espécies relacionadas a infecções humanas, *P. aeruginosa* é a mais frequentemente encontrada principalmente em infecções nosocomiais, além das espécies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas paucimobilis* e *Pseudomonas acidovorans* que com menos frequência também causam infecções em humanos (Bush e Pertejo, 2024, <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-negative-bacilli/pseudomonas-and-related-infections>, acessado em 10/08/2024).

### ***Pseudomonas aeruginosa*: Características biológicas e epidemiológicas.**

*P. aeruginosa* é um bacilo gram negativo móvel, não fermentador de glicose, pertencente à família *Pseudomonadaceae* e é amplamente encontrado em ambientes naturais como solo, superfícies e ambientes com água. Possui uma grande diversidade genética e consegue crescer em diferentes ambientes; possui diversos fatores de virulência, além de

produzir variados mecanismos de resistência a maioria dos antibióticos disponíveis atualmente (Sathe *et al.*, 2023).

Clinicamente possui grande importância por ser um dos principais patógenos de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS) como pneumonias hospitalares (HAP) e pneumonias associadas à ventilação mecânica (VAP), infecções do trato urinário (ITU), infecções de corrente sanguínea, infecções de pele e partes moles e infecções ósseas e de articulações (Sanya *et al.*, 2023). Também é o patógeno de maior ocorrência nas infecções pulmonares em indivíduos com fibrose cística (FC).

A FC é uma doença genética autossômica recessiva basicamente caracterizada por ausência ou função reduzida da proteína *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR) que é responsável pelo transporte de íons e está localizada na membrana apical de células do epitélio de múltiplos órgãos como pulmão, trato gastrointestinal, fígado e pâncreas (Ong; Ramsey, 2023). A ausência ou deficiência desse gene leva a manifestações clínicas relacionadas a obstrução das glândulas exócrinas levando a insuficiência pancreática com má nutrição, a cirrose biliar, a infecções bacterianas endobrônquicas crônicas, entre outras comorbidades (Ong; Ramsey, 2023).

O microbioma pulmonar de indivíduos com FC varia ao longo dos anos e infecções iniciais em pacientes ainda crianças tem como principais patógenos bacterianos *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Com o passar dos anos, *P. aeruginosa* é um dos principais agentes isolados nessas infecções sendo um grande desafio a erradicação desse microrganismo, levando a infecções crônicas e de repetição que causam grandes danos aos tecidos pulmonares e com alta mortalidade (Reyne *et al.*, 2023).

### ***Pseudomonas aeruginosa*: Aspectos relacionados a virulência**

A virulência de *P. aeruginosa* é multifacetada e regulada por uma combinação complexa de fatores, incluindo sistemas de secreção, biofilmes, toxinas e resistência a antibióticos. Dentre os principais fatores de virulência relacionados a sistemas de secreção de toxinas, o complexo sistema T3SS secreta toxinas importantes como ExoS, ExoT, ExoU e ExoY que causam diferentes danos a células hospedeiras (Liao, *et al.*, 2022). Além desse sistema, também se destacam a exotoxina A, responsável pela inibição de síntese de proteínas; a exoenzima S que causa diferentes danos a células do hospedeiro levando a morte celular; o alginato, um polissacarídeo viscoso importante na manutenção de biofilme e responsável pelo fenótipo mucóide de determinados isolados de *P. aeruginosa*, principalmente em clones encontrados em

indivíduos com FC; as fosfolipases C que causam danos a proteínas surfactantes do pulmão; a produção de pigmento como piocianina que leva a lesão de tecido através da indução de produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose, além da produção de hemolisina que lisa diferentes células e facilita a disseminação da infecção (Edward, *et al.*, 2023). Em relação a presença de lipopolissacarídeos (LPS) envolvidos na virulência de *P. aeruginosa*, estão presentes na membrana externa e possuem diferentes funções como fixação e invasão de tecidos de hospedeiros e também na formação de biofilmes (Qin, *et al.*, 2022).

### **Métodos de identificação**

Em relação a identificação de *P. aeruginosa* diferentes metodologias podem ser utilizadas e vão depender dos recursos disponíveis e das características da instituição. Existem metodologias que são mais básicas, de baixo custo e que geralmente demandam mais tempo para a realização, assim como metodologias mais avançadas que possuem um custo e investimento maior e que geralmente identificam em um tempo menor.

Utilizando provas bioquímicas básicas, as principais características de *P. aeruginosa* são oxidase positiva, nitrato positivo, hemolisina positiva, citrato positivo, arginina positivo, indol negativo, lisina negativo, crescimento a 42° e fermentação de lactose negativa (Oplustil *et al.*, 2020).

Em relação a identificação de *P. aeruginosa* através de metodologias moleculares, as principais metodologias empregadas são a identificação por espectrometria de massas através da técnica *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) que analisa proteínas ribossomais bacterianas para chegar nas identificações com espectros gerados e analisados pelo equipamento (Tsuchida e Nakayama, 2022) e o sequenciamento de nova geração (NGS) que geralmente é utilizado para confirmações de identificações previamente realizadas por outras metodologias ou para identificações de microrganismos direto de amostras clínicas através da metagenômica, sendo baseado na análise das sequências de nucleotídeos do rRNA bacteriano (Nafea, *et al.*, 2024).

Em relação a identificações de isolados de *P. aeruginosa* realizadas por MALDI-TOF não costumam existir dificuldades ou grandes limitações para bons resultados em nível de espécie. Segundo, Wang, *et al.*, (2014) 35 isolados de *P. aeruginosa* foram identificados corretamente pelo equipamento MALDI-TOF VITEK MS, enquanto Tang, *et al.*, (2017) também relataram um bom desempenho na identificação de cinco clones (ST111, ST175, ST235, ST253 e ST395) de alto risco de *P. aeruginosa*.

Além da identificação de *P. aeruginosa* por meio da técnica MALDI-TOF utilizando o protocolo direto de colônias bacterianas, também é possível realizar a sua identificação diretamente a partir de amostras de sangue provenientes de frascos de hemoculturas positivos. Esse método permite a antecipação de resultados parciais em até 24 horas, uma vez que dispensa o período de incubação das placas antes da identificação direta das colônias bacterianas (Barth et al., 2022).

### **Resistência antimicrobiana: Mecanismos de resistência e impacto clínico**

A resistência a antimicrobianos (AMR) é considerada um problema de saúde pública mundial e já causa centenas de milhares de mortes a cada ano em diferentes países. Considerado um dos dez principais desafios de saúde pública global pela organização mundial da saúde (OMS), microrganismos resistentes aos antimicrobianos são a principal causa das altas taxas de morbidade e mortalidade nos hospitais, principalmente em unidades de terapia intensiva, prolongando o tempo de internação dos pacientes e consequentemente os custos relacionados à assistência a saúde (Agyeman, et al., 2022).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial de Saúde publicou pela primeira vez uma lista de patógenos prioritários resistentes a antibióticos que abrangia doze famílias de bactérias que deveriam ser rastreadas e estudadas com o objetivo de promover maiores investimentos em novos tratamentos para infecções causadas por microrganismos multirresistentes e combater o avanço da resistência antimicrobiana globalmente (WHO, 2017). Dessas doze famílias, os patógenos considerados como prioridade crítica são: *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.

Mais recentemente em 2024, uma nova publicação foi realizada pela organização mundial de saúde que reclassificou microrganismos resistentes aos antimicrobianos e *Pseudomonas aeruginosa* foi reclassificado como um patógeno de alta prioridade (WHO, 2024). Microrganismos Gram negativos que apresentam resistência a carbapenêmicos, uma classe de antibióticos de amplo espectro utilizada para tratamento de diversos tipos de infecções graves, na maioria das vezes apresentam também resistência a outras opções terapêuticas o que dificulta muito o manejo de infecções causadas por essas bactérias (Mohamed, et al., 2021).

Os mecanismos de resistência que determinam os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos em bactérias multirresistentes são variados e podem estar presentes em

diferentes famílias de microrganismos. As bactérias podem sofrer mudanças em seus perfis de sensibilidade por mutações espontâneas que podem aparecer mesmo sem contato com antimicrobianos, sendo este um mecanismo de resistência cromossomal não transmitido para outras espécies (Salam *et al.*, 2023.). Também podem adquirir ou produzir diferentes mecanismos de resistência que envolvem diversos mecanismos de ação, como remoção ativa dos antimicrobianos da célula bacteriana, modificações enzimáticas dos antibióticos, produção de enzimas que inativam antimicrobianos, mudanças na permeabilidade de membrana das células bacterianas dificultando a entrada das drogas, produção de vias metabólicas alternativas que são alvo dos antibióticos, entre outros (Chmiel *et al.* 2022). A transferência horizontal de genes é o processo mais eficiente na aquisição e na disseminação de mecanismos de resistência bacteriana e pode ser realizada por três principais vias: transformação com DNA bacteriano livre, transdução através de bacteriófagos e conjugação envolvendo plasmídeos e elementos integrativos e conjugativos como transposons (Liu; Thomsen; Olsen, 2022).

Mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* de maneira geral costumam ser complexos e multifatoriais, dividindo-se basicamente em mecanismos intrínsecos e adquiridos, gerando resistência a diferentes classes de antimicrobianos utilizados na prática clínica (Langedonk *et al.*, 2021). Em relação a mecanismos intrínsecos, a baixa permeabilidade da membrana externa dessa bactéria gera resistência a diferentes classes de antimicrobianos que precisam atravessar essa barreira para chegar ao espaço intracelular e ter atividade, bombas de efluxo que expulsam ativamente antimicrobianos para fora da célula bacteriana também geram resistência e a produção de enzimas que inativam antibióticos como a enzima ampC, é mais um exemplo de resistência intrínseca presente em *P. aeruginosa* (Xiao *et al.*, 2022).

*P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos podem possuir diferentes mecanismos que geram resistência a essa classe de antimicrobianos, principalmente mecanismos não enzimáticos como bombas de efluxo e inativação de porinas importantes para a entrada desses antimicrobianos na célula bacteriana (Langendonk *et al.*, 2021). Dentre as diferentes bombas de efluxo encontradas em *P. aeruginosa*, a hiperexpressão de MexAB-OprM, que foi a primeira a ser reportada na literatura, é uma das que pode gerar resistência a carbapenêmicos (Lorusso, 2022). Além de mecanismos não enzimáticos, a incidência de carbapenemases tem sido cada vez mais frequente em *P. aeruginosa* e esse fenótipo é considerado crítico pois não confere resistência apenas a classe dos carbapenêmicos, mas também, as principais drogas anti-pseudomonas da classe dos beta-lactâmicos, incluindo novos antimicrobianos com novos inibidores de beta-lactamases (Reyes *et al.*, 2023).

A epidemiologia de carbapenemases em *P. aeruginosa* vem sendo cada vez mais estudada e varia de região para região. Segundo Reyes *et al.* (2023) o gene *blaKPC-2*, uma serino carbapenemase de classe A, foi o gene com maior prevalência global em estudo com isolados de 10 países distintos, presente em 39% de *Pseudomonas aeruginosa* com resistência a carbapenêmicos produtoras de carbapenemases, seguido do gene *blaVIM-2*, uma metallo carbapenemase de classe B, que foi encontrado em 25% desses mesmos isolados. Além dessas principais carbapenemases, também foram encontrados em menor prevalência genes como *blaNDM-1* (7%) e *blaGES-5* (12,6%).

Em estudo realizado na América Latina, de 492 isolados de *P. aeruginosa* estudados 49 eram positivos para alguma carbapenemase, sendo oito (1,62%) positivos para *bla-KPC*, 31 (6,3%) positivos para *bla-VIM*, sete (1,4%) positivos para *bla-KPC + bla-NDM*, três positivos para *bla-IMP* (0,6%) e um isolado era positivo para *bla-SPM*, justamente esse o único isolado dentre os 39 provenientes do Brasil que apresentou resistência a ceftazidima/avibactam e produção de carbapenemase (Mojica, *et al.*, 2023).

Em relação a dados epidemiológicos brasileiros, um artigo publicado sobre resistência a carbapenêmicos mostrou em *P. aeruginosa* maior prevalência do gene *bla-KPC* (13,2%) e do gene *bla-VIM* (13,4%). Além disso, outros genes em menor ocorrência foram encontrados, como *bla-NDM* (6,9%), *bla-IMP* (5,1%) e *bla-SPM* (4,0%) (Kiffer *et al.*, 2023).

Além das carbapenemases, outra betalactamase de importância clínica que também pode ser encontrada em *P. aeruginosa* é a betalactamase de espectro estendido (ESBL), que gera resistência principalmente a cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, monobactâmicos e penicilina (Husna *et al.*, 2023). Os genes de produção de ESBL que costumam ser mais encontrados em *P. aeruginosa* são: *bla-PER*, *bla-GES*, *bla-VEB*, *bla-CTX-M* e *bla-SHV* (Castanheira *et.al.*, 2021). Em recente estudo realizado em um hospital pediátrico na China, dentre 126 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* testados, 40 (32%) foram positivos para *bla-CTX-M-15*, 34 (27%) para *blaSHV-1*, 18 (4%) para *bla-TEM-1*, 14 (11%) para *bla-CTX-M-14*, 11 (8%) para *bla-CTX-M-27* e *bla-GES-2* e oito (6%) para *bla-CTX-M-9* (Patil, *et al.*, 2023). Em outro estudo abordando a prevalência de ESBL em *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital especializado em cirurgias plásticas no Iraque, foi encontrado dentre 71 isolados, 32 (59%) positivos para *bla-OXA-10*, 24 (44%) positivos para *bla-PER-1* e seis (1%) positivos para *bla-SHV* (Polse, *et al.*, 2023).

Os principais antimicrobianos utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* que são considerados como opções terapêuticas de primeira linha, são os betalactâmicos com inibidores de betalactamase (piperacilina/tazobactam

e ticarcilina/clavulanato); cefalosporinas com atividade antipseudomonas, como ceftazidima, cefepime, cefoperazone, além das quinolonas ciprofloxacina e levofloxacina (Zakhour, *et al.*, 2022).

Em relação a drogas consideradas como segunda linha os carbapenêmicos vem como opção mais frequentemente utilizada, com os antimicrobianos meropenem, imipenem e doripenem, além dos aminoglicosídeos, representados pela amicacina, gentamicina e tobramicina. Em casos de *P. aeruginosa* com perfis multirresistentes (MDR) ou extensivo droga-resistentes (XDR), novas drogas são consideradas opções terapêuticas de última linha, como ceftazidima/avibactam, ceftolozane/tazobactam, imipenem/relebactam e cefiderocol, essa ultima ainda não disponível no Brasil (Zakhour, *et al.*, 2022). Além dessas novas drogas, em isolados de *P. aeruginosa* MDR e XDR que possuem resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos utilizados na prática clinica, a polimixina voltou a ser uma opção terapêutica apesar da alta complexidade de seu uso por conta de seus graves efeitos adversos nos pacientes, principalmente pela dificuldade de determinadas instituições a terem acesso a novos antimicrobianos que possuem alto custo e demandam alto recurso financeiro para compra (Garcia, *et al.*, 2023).

Embora os novos antimicrobianos utilizados como opções terapêuticas de última linha tenham sido recentemente aprovados e introduzidos na prática clínica, já existem evidências na literatura de resistência a esses antimicrobianos em *P. aeruginosa*. No caso da ceftazidima/avibactam, uma combinação de uma cefalosporina de terceira geração (ceftazidima) e um inibidor de betalactamase não beta-lactâmico (avibactam), observa-se um bom desempenho contra isolados com mecanismos de resistência como perda de porinas específicas, hiperexpressão de bombas de efluxo, produção de beta-lactamases de classe A, C, algumas variantes de classe D e contra isolados resistentes aos carbapenêmicos não produtores de metallo-betalactamases.

Apesar das taxas de resistência a ceftazidima/avibactam em *P. aeruginosa* ainda serem consideradas baixas, a literatura já reporta taxas de 18% distribuídos em amostras de infecções de trato urinário, infecções de corrente sanguínea e pneumonias hospitalares/pneumonias associadas a ventilação mecânica de pacientes internados em unidade de terapia intensiva, sendo 72% dessa resistência causada por produção de metallo-betalactamases (MBL) (Valzano *et al.*, 2024). Em outros casos, uma taxa de resistência de até 40% pode ser encontrada em estudo com isolados provenientes de infecções de corrente sanguínea e pneumonia hospitalar ou pneumonia associada a ventilação mecânica (Shah *et al.*, 2024). Além disso, outro estudo avaliando amostras clínicas com isolados de *P. aeruginosa* provenientes de cinco países da

América Latina encontrou uma taxa geral entre esses países de 22% de resistência à ceftazidima/avibactam (Mojica et al., 2023).

Ceftolozane/tazobactam é uma combinação de uma cefalosporina de quinta geração (ceftolozane) com um inibidor betalactâmico (tazobactam). Apesar de não possuir atividade frente a isolados produtores de carbapenemases, esta combinação é estável a alguns mecanismos de resistência comuns em *P. aeruginosa*, como a hiperexpressão de bombas de efluxo, modificações em porinas (oprD), hiperexpressão de ampC, além do tazobactam inibir betalactamases de classe A, como as ESBL. Assim como ocorre com ceftazidima/avibactam, apesar de ceftolozane/tazobactam ser considerada uma excelente opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, existem relatos na literatura de resistência a este antimicrobiano. Estudos indicam uma taxa de resistência de 10% (Shah et al., 2024) e até 20% em outros (Valzano et al., 2024).

### **Métodos de análise da resistência a antimicrobianos por testes fenotípicos e moleculares**

Para a determinação dos fenótipos de resistência aos antimicrobianos, podem ser utilizadas metodologias qualitativas, como a difusão em disco - Kirby Bauer e quantitativas, como microdiluição em caldo, eluição em caldo, diluição em ágar e testes epsilométricos ou fitas gradientes, que determinam a concentração inibitória mínima (CIM) (Wenzler et al., 2023). A partir dos resultados encontrados nos testes fenotípicos para a caracterização de resistência aos antimicrobianos podemos classificar os perfis em três grandes grupos: Microrganismos multirresistentes (MDR); microrganismos extensivo-droga resistentes (XDR) e microrganismos PAN-droga resistentes. Bactérias consideradas MDR são resistentes a um ou mais agentes em três categorias de antimicrobianos testadas, já as classificadas como XDR são resistentes a um ou mais agentes em todas as categorias de antimicrobianos testados, mas mantêm sensibilidade a pelo menos uma ou duas categorias. Isolados considerados PAN-resistentes não apresentam sensibilidade em todas as categorias testadas (Magiorakos, *et al.*, 2012).

Além dessas classificações, uma nova categorização foi proposta em 2018 por Kadri e colaboradores em relação aos fenótipos de resistência em bacilos Gram-negativos, categorizada como resistência de difícil tratamento (DTR). Essa classificação considera a resistência a todas as principais classes de antimicrobianos de primeira linha, que geralmente possuem baixa toxicidade e menor complexidade de uso, como um fator principal para determinar uma bactéria como de difícil tratamento. A não suscetibilidade desses isolados a essas principais classes de

antimicrobianos leva ao uso de drogas menos eficazes e com maiores efeitos tóxicos adversos, que são consideradas as únicas opções terapêuticas disponíveis. Isso gera dificuldades para a desospitalização dos pacientes e para a obtenção de um desfecho clínico favorável. *P. aeruginosa* com resistência simultânea a piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, meropenem, imipenem, ciprofloxacina e levofloxacina são incluídas nessa categorização (Kadri *et al.*, 2018).

Em relação a detecção dos genótipos de resistência em *P. aeruginosa* metodologias como a PCR (reação em cadeia da polimerase), PCR em tempo real multiplex e sequenciamento de nova geração (NGS) são técnicas amplamente utilizadas visando a detecção dos genes de resistência desses isolados. Em estudo realizados por Polse e colaboradores, (2023) os genes codificadores de ESBL *bla*-OXA-10, *bla*-PER-1 e *bla*-SHV foram investigados utilizando primers complementares específicos com realização de PCR em gel de agarose e dentre as amostras positivas foi confirmada a presença do gene *bla*-OXA-10 em 32 (59,26%) isolados e a presença do gene *bla*-PER-1 em 24 (44,44%) isolados. O gene de menor prevalência foi o *bla*-SHV com apenas 6 (11,11%) isolados.

Em trabalho realizado por Patil e colaboradores em 2023, os genes *bla*-CTX-M e *bla*-SHV responsáveis pela produção de ESBL também foram investigados pela técnica de PCR sendo 32% (40/126) positivo para o gene *bla*-CTX-M-15, 27% (34/126) para o gene *bla*-SHV-11, 14% (18/126) para o gene *bla*-TEM-1, 11% positivo para o gene *bla*-CTX-M-14, 8% (11/126) positivo para os genes *bla*-CTX-M-27 e *bla*-GES-2 e 6% (8/126) positivo para o gene *bla*-CTX-M-9.

Em outro estudo avaliado, foi realizado uma PCR em tempo real (qPCR) para genes que codificam as principais carbapenemases presentes em *P. aeruginosa*, sendo 83 (39%) dos isolados produtores de carbapenemases positivos para o gene *bla*-KPC-2, 52 (25%) dos isolados produtores de carbapenemases positivos para o gene *bla*-VIM-2, 14 (7%) positivos para o gene *bla*-NDM-1 e 12 (6%) positivos para *bla*-GES-5 (Reyes, *et al.*, 2023).

## **Justificativa**

A resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* representa um grave problema de saúde pública global, devido ao aumento das taxas de mortalidade e morbidade em infecções relacionadas a saúde, além de elevar custos e tempo de internação. O estudo contínuo desse patógeno é crucial para reduzir seu impacto na saúde pública, orientar terapias eficazes e compreender os mecanismos de resistência associados aos principais fenótipos. A detecção

precisa de fenótipos e genótipos de resistência é vital para o manejo adequado das infecções e a vigilância epidemiológica de clones multirresistentes. Esta dissertação visa fornecer dados sobre a resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* em instituições hospitalares, investigando perfis de sensibilidade e genes de resistência para orientar possíveis escolhas terapêuticas.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de *P. aeruginosa* multidroga resistente e caracterizar os genes codificadores de carbapenemases em amostras recuperadas de pacientes assistidos em hospitais do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar isolados sugestivos de *P. aeruginosa* oriundos de diversos espécimes clínicos;
- b) Determinar os perfis sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na prática clínica;
- c) Determinar a ocorrência de perfis multidroga-resistentes e extensivo-droga resistentes e sua distribuição nos hospitais selecionados;
- d) Avaliar a ocorrência de resistência aos carbapenêmicos;
- e) Investigar os genes responsáveis pela produção de carbapenemases e CTX-M.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As amostras bacterianas utilizadas no estudo foram provenientes de 19 hospitais da rede privada e coletadas prospectivamente no período de seis meses, sendo do início de abril de 2022 a março de 2023. Foram selecionadas amostras isoladas de espécimes clínicos que sugerem infecção, como, urina, hemoculturas, secreções gerais de sítios estéreis e também algumas amostras de sítios não estéreis como secreção traqueal. Considerando a demanda espontânea desses hospitais, o total de amostras de *P.aeruginosa* recuperadas nesse período foi de 130 isolados.

A semeadura primária desses isolados foi realizada inicialmente nos laboratórios locais de cada hospital. As amostras de urina foram semeadas em ágar cystine lactose eletrolyte deficient - CLED (Plastlabor ind e comercio de equipamentos hosp. e laboratório LTDA); as amostras de sangue foram semeadas em ágar sangue e agar chocolate (Plastlabor ind e comercio de equipamentos hosp. e laboratório LTDA) e os demais espécimes foram semeados em ágar sangue, ágar chocolate e ágar macconkey provenientes do mesmo fornecedor. Com exceção do ágar chocolate que foi incubado em estufa bacteriológica em microaerofilia a 35+-1°C, todos os outros meios de cultura foram incubados em estufas bacteriológicas aeróbicas a 35+-1°C. Todas as sementeiras e procedimentos foram realizados de acordo o documento normativo interno. (POP-MIC-007 Richet 2023). Posteriormente as placas foram acondicionadas, em temperatura ambiente, em maletas térmicas próprias para transporte de amostras clínicas e transportadas até a microbiologia central de um laboratório privado que recebe as amostras semeadas nos meios primários de isolamento e realiza os todos os procedimentos analíticos até a liberação dos resultados das culturas.

### 2.2 Identificações das amostras bacterianas

A identificação de todos isolados recuperados foi realizada pela metodologia de espectrometria de massas pelo sistema VITEK® MS MALDI-TOF (bioMérieux – France-Versão 3) e foram realizadas no protocolo de identificação direto da colônia com aproximadamente 24 horas de incubação em aerobiose a 35°+-1. Todos os *spots* realizados das colônias bacterianas foram feitos com a caneta “Pick Me (Biomérieux), sendo o processo

realizado com uma espécie de “ponta” de caneta descartável e estéril que encaixa na caneta de plástico “Pick Me” (Biomérieux) e possibilita o toque de uma colônia para posterior realização de um esfregaço na posição específica a ser lida pelo equipamento que é identificada em um “slide”, objeto metalizado com 48 posições disponíveis em pequenos círculos onde são feitos os esfregaços das colônias a serem identificadas. Posteriormente a confecção desses esfregaços, 1µL de uma matriz orgânica ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid; bioMérieux) foi adicionada em cada esfregaço de colônia e após secagem a temperatura ambiente, o “Slide” foi introduzido dentro do equipamento para a realização da leitura e identificação. Para a determinação dos picos através da espectrometria de massas, o slide foi inserido no equipamento VITEK® MS MALDI-TOF (bioMérieux – France- Versão 3)

### 2.2.1 Análise dos resultados da espectrometria de massas

Os picos detectados pela leitura do equipamento foram interpretados pelo sistema que opera com um laser linear positivo com frequência de 50Hz e um intervalo de massas entre 2.000 e 20.000 Daltons. Os picos foram gerados e processados utilizando o programa Vitek MS Acquisition 1.6.0 e posteriormente disponibilizados na aplicação Myla 4.7.1 Os resultados foram comparados ao banco de dados de referência do VITEK® MS MALDI-TOF (bioMérieux – France- Versão 3) e a partir da qualidade da leitura e do pico encontrado foi liberado um *score* de identificação que possuíam um valor máximo de 99.9% atingido pelo equipamento que conseqüentemente confirma os isolados em nível de espécie.

## 2.3 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Os Testes de sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) seguiram as diretrizes do comitê brasileiro de teste de susceptibilidade *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST* (2023). No final de 2019, a Portaria nº 64/2018 do Ministério da Saúde passou a vigorar, determinando que todos os laboratórios no país adotassem as normas do BrCAST para a interpretação dos TSA.

A determinação dos perfis de sensibilidade foi realizada por método de disco difusão (Kirby-Bauer) para nove antimicrobianos: Levofloxacina (5µg), Amicacina (30µg), Tobramicina (10µg), Imipenem (10µg), Meropenem (10µg), Ceftazidima (10µg), Cefepima

(30µg), Piperacilina/Tazobactam (30/6µg) e Ciprofloxacina (5µg) (Oxoid Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Além disso, para os isolados considerados MDR/XDR, as drogas ceftazidima/avibactam (10/4µg) e Ceftolozane/Tazobactam (30/10µg) também foram testadas pela mesma metodologia. Todos os resultados foram interpretados de acordo com as recomendações do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) 2023. A cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foi utilizada como controle.

O método da disco difusão foi realizado seguindo as orientações e recomendações estabelecidas pelo documento “Método da disco-difusão BrCAST” e interpretado seguindo os critérios e pontos de corte estabelecidos pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST* (2023). Antes da realização do procedimento, os discos de antimicrobianos foram retirados do freezer por pelo menos 15 minutos ou até atingir temperatura ambiente para posteriormente serem utilizados e aplicados sobre o meio de cultura. A partir de culturas puras, com colônias isoladas e utilizando um *swab* seco de algodão, uma suspensão bacteriana foi realizada em salina estéril até atingir por meio de turvação a escala 0,5 de McFarland, que foi verificada e medida com o equipamento Densichek (Biomérieux). Um novo *swab* seco de algodão foi imerso na suspensão bacteriana e o excesso de líquido absorvido foi retirado através de uma leve pressão no canto superior do tubo. Logo em seguida, esse *swab* foi semeado em meio de cultura Mueller Hinton agar 150mm (PLASTLABOR, Rio de Janeiro, Brasil) com inoculação em pelo menos três direções diferentes e por toda a área da placa. Dentro de 15 minutos, os discos de antimicrobianos, já em temperatura ambiente, foram aplicados na placa e em seguida incubados em estufa bacteriológica em aerobiose a 35±1 por 18 a 24 horas de incubação (BrCAST 2023).

Após o período de incubação as placas foram retiradas da estufa e a medição do tamanho dos halos de cada disco de antimicrobiano foi realizada com auxílio de régua e pela região posterior ou fundo da placa. Para interpretação da sensibilidade de cada antimicrobiano em sensível, intermediário (sensível aumentando a exposição) e resistente os valores encontrados na medição de cada halo foram interpretados pelo documento do BrCAST (2023).

A testagem para polimixina foi realizada a partir do meio de cultura ágar superpoli (Nordmann e Poirel 2016), metodologia que consiste em uma diluição em ágar com uma concentração fixa de 3,50mg de polimixina no ágar base Eosina Azul de metileno (EMB) (*Plastlabor ind e comercio de equipamentos hosp. e laboratório LTDA*), contendo sempre um controle positivo em placa com a cepa ATCC *Proteus mirabilis* 25933, um controle negativo com a cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 e a amostra clínica testada em questão. O

procedimento do teste consistiu em realizar uma suspensão bacteriana de 0,5 da escala de macfarland das cepas controle e das amostras do estudo e a partir desse inóculo realizar uma diluição seriada de 1:10. Após esse procedimento, com auxílio de alça bacteriológica de 10µL, em uma área da placa a amostra clínica foi semeada. Em outra área da placa uma cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 (Microbiologics) foi semeada como controle negativo e em uma terceira área da mesma placa foi semeada a cepa ATCC *Proteus mirabilis* 25933 como controle positivo (Microbiologics, St Cloud MN - Biotechnology Company). Havendo crescimento na área da placa semeada com a amostra clínica, inibição da cepa ATCC sensível a polimixina e crescimento da cepa com resistência intrínseca a polimixina utilizada como controle positivo, a amostra em questão é considerada resistente a polimixina.

#### **2.4 Categorizações dos perfis de resistência**

A classificação das amostras de acordo com fenótipos de resistência em multidroga-resistentes (MDR) e extensivo-droga resistentes (XDR) foi baseada nos critérios estabelecidos por Magiorakos *et al.* (2012): MDR, amostra não sensível a um ou mais agentes, em três ou mais categorias de antimicrobianos testados e XDR, amostra não sensível a um ou mais antimicrobianos em todas as categorias testadas, porém, mantendo sensibilidade a pelo menos duas ou uma categoria. Além das drogas testadas de rotina para *P.aeruginosa*, nos casos de alguns isolados MDR e alguns isolados XDR, foi testado o antibiótico Ceftolozane/tazobactam. Além disso, para todos os isolados MDR e XDR foram testados também os antimicrobianos de últimas gerações terapêuticas ceftazidima/avibactam e polimixina.

#### **2.5 Detecção molecular de genes responsáveis pela produção de carbapenemases e de betalactamases de espectro estendido (ESBL)**

A detecção molecular de genes produtores de carbapenemases e de betalactamases de espectro estendido (ESBL) foi realizada através da metodologia de PCR em tempo real multiplex com o kit Allplex™ Entero-DR Assay (Seegene). Os alvos foram os genes *bla*-KPC, *bla*-NDM, *bla*-OXA 48, *bla*-VIM, *bla*-IMP e *bla*-CTX-M.

A partir de cultura bacteriana recente (24 horas de incubação) a extração do DNA bacteriano foi realizada em sistema automatizado a partir de uma alçada bacteriana diluída em tubo estéril DNA free (microtubo Pcr 200ul Em Tiras Kasvi) com 1mL de salina estéril. Após

serem submetidos ao vórtex para homogeneização, os microtubos foram levados ao equipamento para a realização da extração do DNA.

Após esta etapa, a preparação da reação de PCR (mastermix) com os reagentes do *kit* também foi realizada no mesmo sistema automatizado, sendo adicionados em tubo estéril 5µl de reagente ENTERO-DR MOM, 5µl de EM4 e 5µl de EM4 BUFFER para cada amostra, e distribuído 15µl da mastermix em cada poço da placa. Após esse procedimento, foi adicionado 5µl de ácido nucleico extraído totalizando um volume total de 20µl por reação.

Fora do equipamento, já dentro da Workstation de DNA, foi pipetado manualmente 5µl do controle positivo ENTERO-DR PC e 5µl de água RNase-free no poço correspondente ao controle negativo da reação. Ambos os controles contidos no Kit de PCR. De imediato, a placa foi selada, centrifugada, e seguiu para a realização da PCR em tempo real no equipamento automatizado (CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6 - Biorad).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Amostragem

Foram selecionadas 130 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos provenientes de 19 hospitais ( nomeados por letras ) sendo a maior parte deles do estado do Rio de Janeiro e uma parte do estado de São Paulo. Em relação ao perfil das unidades hospitalares estudadas o hospital com o maior número de leitos é o H3, com 340 leitos totais, incluindo UTI, unidades semi-intensiva e pediatria. Já o hospital com o maior número de leitos de UTI é o H2, que possui 92 leitos de UTI entre seus 175 leitos totais. Em relação a complexidade, o hospital H12 é destaque por ter perfil exclusivamente pediátrico e especialidade oncológica, além do hospital H13 que tem como característica cirurgias de alta complexidade. Dentre as unidades com salas de centro cirúrgico, destacam-se a H2, H5, H13 e H14 com 5, 10, 9 e 12 salas respectivamente.

Tabela 1: Perfis das unidades hospitalares estudadas (continua)

<b>Hospitais</b>	<b>Leitos totais</b>	<b>Leitos de UTI</b>	<b>Outros Leitos</b>	<b>Particularidades</b>
H1	220	80	140	Emergência Adulto e pediátrica.
H2	175	92	83	5 Salas de Centro cirurgico
H3	340	Não informado	Não informado	Internação, Semi-intensiva, pediatria e hemodinâmica.
H4	158	81	77	UTI adulto e pediátrica e unidade semi intensiva
H5	246	66	174	Unidade oncológica e cardiológica, 10 salas de C.C.
H6	114	53	61	UTI adulto e pediátrica
H7	122	41	81	UTI, Semi-intensiva e internação
H9	230	Não informado	Não informado	UTI, pediatria, emergência adulto e pediátrica.
H11	Não informado	11	Não informado	Não informado.

Tabela 1: Perfis das unidades hospitalares estudadas (conclusão)

H12	91	25	8	Hospital Pediátrico com especialidade oncológica
H13	150	45	105	Cirurgias de alta complexidade
H14	Não informado	90	Não informado	12 Salas de cirurgia hemodinâmicas
H16	Não informado	54	Não informado	UTI pediátrica, adulto e neonatal.
H8, H10, H15, H17, H18, H19	Não informado	Não informado	Não informado	Dados não obtidos

Legenda: UTI – Unidade de terapia intensiva; C.C – Centro cirúrgico.

Fonte: O autor, 2024.

Os isolados foram coletados a partir de demanda espontânea desde abril de 2021 a março de 2022, sendo 86% das amostras provenientes desse ano e 14% provenientes do ano de 2022. A partir do isolamento em placa, a identificação diretamente das colônias das 130 amostras foi realizada através da técnica de MALDI-TOF utilizando o equipamento VITEK® MS – BioMérieux. Todas as amostras tiveram a identificação confirmada em nível de gênero e espécie com score de 99.9%, confirmando as identificações de todos os isolados como *P. aeruginosa*. Parte majoritária das amostras foi proveniente de Unidades de Terapia Intensiva (UTI), (54%), e outras provenientes de unidades hospitalares como emergência (24%) e unidades de internação (22%).

Na tabela 2 é possível observar que Abril de 2021 foi o mês com a maior quantidade de isolamentos de *P. aeruginosa* com total de 31 amostras. Esses isolados foram provenientes de diferentes hospitais, sendo o H4 a instituição com o maior número de amostras (n=5) nesse mês. Os hospitais com o segundo maior número de isolamentos nesse mesmo mês foram o H14 e o H3, com quatro isolamentos cada. O mês que possuiu o menor número de isolamentos foi o de setembro de 2021 com apenas três isolados no total, distribuídos nos hospitais H3, H12 e H15. Em relação aos isolamentos por hospital, durante todo o período de estudo, o hospital que teve maior número de *P. aeruginosa* foi o hospital H3, com o total de 18 amostras. Esses isolados foram distribuídos entre os meses de estudo sendo Maio o mês com o maior número de isolamentos nesse hospital (n=6) e Junho e Novembro de 2021, Janeiro e Março de 2022, sendo os meses em que não tiveram nenhum isolamento de *P. aeruginosa* no hospital H3.

Os hospitais que tiveram o menor número de amostras com *P. aeruginosa* durante o estudo foram os hospitais H6, H18 e H19, com apenas um isolado em cada. O hospital H9 foi a segunda instituição com maior número de isolados no período de estudo, sendo 14 amostras no total. O mês que teve maior número de isolamentos nesse hospital também foi o mês de maio, com cinco isolados, o mesmo mês que foi encontrado maior número de isolamentos no hospital H3.

Tabela 2: Distribuição temporal de *Pseudomonas aeruginosa* em hospitais da rede privada

Hospital / estado	N	2021									2022	2022	2022
		ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR
H1/RJ	10	2	0	1	1	2	0	0	0	1	0	3	0
H2/RJ	13	3	1	1	1	0	0	3	0	2	0	2	0
H3/RJ	18	4	6	0	1	1	1	1	0	2	0	2	0
H4/RJ	13	5	0	2	0	1	0	1	0	1	2	0	1
H5/RJ	10	3	0	2	0	0	0	0	2	0	3	0	0
H6/SP	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H7/RJ	8	2	1	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0
H8/SP	5	0	0	1	0	2	0	0	1	0	1	0	0
H9/RJ	14	2	5	1	0	0	0	2	0	0	1	1	2
H10/RJ	3	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
H11/RJ	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
H12/RJ	4	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
H13/RJ	9	3	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
H14/RJ	6	4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
H15/SP	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
H16/RJ	4	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
H17/RJ	4	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
H18/RJ	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H19/SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TOTAL	130	31	19	9	5	11	3	13	4	10	9	12	4

Fonte: O autor, 2024.

### 3.2 Espécimes clínicos

Os isolados selecionados foram oriundos de diferentes amostras clínicas, sendo elas: Urina (39/31%), Lavado Broncoalveolar (LBA) (29/23%), Sangue (23/17%), Líquidos Biológicos/Secreções (23/17%) e Fragmentos ósseos/Partes moles (16/12%). O hospital H3 foi o hospital com mais isolamentos em amostra de urina, com oito isolados de *P. aeruginosa*, enquanto o hospital H13 foi o que possuiu mais amostras de LBA com *P. aeruginosa* (n= 6). Em relação as amostras de Sangue, o hospital que teve o maior número de isolados foi o H4 com sete casos de *P. aeruginosa*. No caso de outros espécimes clínicos (Líquidos biológicos/Secreções e Fragmentos ósseos e partes moles) o hospital que possuiu o maior número de isolados foi o H1 com sete amostras com *P. aeruginosa*, seguido dos hospitais H2 e H3 com seis isolados cada. Os hospitais H4, H7, H9 e H14 foram os que tiveram isolados em todos os espécimes clínicos estudados e em contrapartida, os hospitais H18 e H19 foram os que só tiveram *P. aeruginosa* isoladas em apenas um dos espécimes clínicos estudados com isolado em urina no H18 e um em outros espécimes no H19. O hospital que possui mais amostras com *P. aeruginosa* contando todos os espécimes clínicos foi o H3, totalizando 18 amostras. Os que possuem menos isolados no total entre todos os espécimes clínicos durante todo o período de estudo foram os hospitais H6, H18 e H19.

Tabela 3: Distribuição dos espécimes clínicos com isolamento de *Pseudomonas.aeruginosa* entre os hospitais de origem (continua)

Hospital / estado	Espécime clínico				Total
	Urina	LBA	Sangue	Outros	
H1/RJ	1	2	0	7	10
H2/RJ	4	0	3	6	13
H3/RJ	8	1	3	6	18
H4/RJ	1	2	7	3	13
H5/RJ	3	5	0	2	10
H6/SP	0	0	1	0	1
H7/RJ	4	1	1	2	8
H8/SP	2	0	1	2	5
H9/RJ	5	4	2	3	14
H10/RJ	1	1	1	0	3
H11/RJ	0	2	1	0	3
H12/RJ	1	0	0	3	4
H13/RJ	2	6	1	0	9
H14/RJ	1	3	1	1	6
H15/SP	0	0	1	2	3
H16/RJ	2	2	0	0	4
H17/RJ	3	0	0	1	3

Tabela 3: Distribuição dos espécimes clínicos com isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* entre os hospitais de origem (Conclusão)

H18/RJ	1	0	0	0	1
H19/SP	0	0	0	1	1
Total (n)	39	29	23	39	130

Legenda: LBA – Lavado Broncoalveolar; Outros - Líquidos biológicos/Secreções e Fragmentos ósseos e partes moles

Fonte: O autor, 2024.

### 3.3 Identificação dos isolados por MALDITOF

Todos os 130 isolados de *P. aeruginosa* foram identificados a nível de espécie com *score* de 99.9% pelo equipamento VITEK® MS MALDI-TOF (bioMérieux – France - Versão 3)

### 3.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A partir dos testes de sensibilidade realizados, é possível observar fenótipos variados nos isolados de *P. aeruginosa*. Fazendo uma análise por classes de antimicrobianos, os aminoglicosídeos são os representantes com melhor desempenho, apresentando sensibilidade na grande maioria dos isolados testados (85% de amostras sensíveis a amicacina e tobramicina). Já as quinolonas e os betalactâmicos apresentaram sensibilidade variável, com maior grau de resistência quando comparados aos aminoglicosídeos, porém, ainda mantendo um desempenho considerável. A ciprofloxacina demonstrou estar intermediário (Sensível aumentando a exposição) em 71% dos isolados e resistente para 29%, embora a levofloxacina, outra quinolona, tenha apresentado um perfil de intermediário (Sensível aumentando a exposição) de 60% e resistência em 40% das cepas. Em relação aos betalactâmicos a piperacilina/tazobactam foi o antimicrobiano com melhor desempenho, demonstrando estar intermediário (Sensível aumentando a exposição) em 71% das cepas e resistente a 29%. A ceftazidima foi intermediário (Sensível aumentando a exposição) para 67% dos isolados e resistente para 33%. Já a cefepima se manteve intermediário para 69% das cepas e resistente para 31%. Em relação aos carbapenêmicos, houve uma resistência de 34% ao meropenem e de 36% ao imipenem.

Tabela 4: Fenótipos encontrados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos em 130 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibimicrobianos	Sensível	Intermediário (Sensível aumentando a exposição)	Resistente
Amicacina	110 (85%)	3 (2%)	17 (13%)
Tobramicina	110 (85%)	0	20 (15%)
Ciprofloxacina	0	92 (71%)	38 (29%)
Ceftazidima	0	87 (67%)	43 (33%)
Cefepima	0	87 (69%)	43 (31%)
Piperacilina/tazobactam	0	92 (71%)	38 (29%)
Meropenem	81 (62%)	5 (4%)	44 (34%)
Imipenem	0	81 (64%)	47 (36%)
Levofloxacina	0	78 (60%)	52 (40%)

Fonte: O autor, 2024.

### 3.5 Perfis dos isolados de acordo com a resistência aos antimicrobianos

Na avaliação dos perfis de resistência dos isolados testados foram identificados fenótipos mais resistentes que foram classificados como cepas Multidroga-resistentes (MDR) e Extensivo droga-resistentes (XDR) segundo Magioriakos et al. (2021). Treze cepas foram classificadas como XDR e 21 cepas foram classificadas como MDR. Os perfis foram nomeados por letras. O perfil D foi classificado como um isolado XDR e foi o perfil mais presente no estudo com total de 13 amostras. Esses isolados estiveram distribuídos em 7 hospitais, sendo o hospital H2, o que possuiu mais amostras com esse perfil, totalizando 6 amostras. O segundo perfil de resistência mais presente dentre os hospitais foi o perfil G, que foi classificado como MDR e teve uma totalidade de 6 isolados distribuídos em 5 hospitais. O hospital com mais isolados com perfil G foi o H8, com 2 amostras. Todos os outros tiveram apenas 1 isolamento.

Tabela 5: Perfis de resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa*

Perfil de resistência	Perfil do isolado	Número de isolados	Classificação	Hospitais
AK-TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV	D	13	XDR	H1(1) H2(6) H3(1) H11(1) H13(2) H19(1) H4(1)
AK-CIP-CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV	L1	1	MDR	H17
CIP-CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV	G	6	MDR	H8(2) H17(1) H9(1) H14(1) H2(1)
AK-TOB-CAZ-FEP-P/T-MERO-IMI	I	1	MDR	H2
TOB-CIP-CAZ-FEP-MER-IMI-LEV	X	1	MDR	H3
TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-IMI-LEV	R1	2	MDR	H9(2)
CIP-FEP-P/T-MERO-IMI-LEV	H	2	MDR	H9(2)
CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV	V	2	MDR	H2(2)
AK-CIP-CAZ-FEP-P/T-LEV	U1	1	-	H17
TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-LEV	Y1	2	-	H9 H7
CAZ-P/T-MER-IMI-LEVO	E	1	MDR	H6(1)
CAZ-FEP-P/T-MER-IMI	F1	2	MDR	H9(1) H4(1)
CIP-FEP-MERO-IMI-LEV	J	3	-	H11(1) H(10)
CIP-CAZ-FEP-MER-LEV	H02	1	-	H1
CIP-CAZ-MER-IMI-LEV	N1	1	MDR	H7(1)
CAZ-FEP-MER-IMI-LEV	P1	2	MDR	H13(2)
CIP-CAZ-P/T-LEV	S1	1	-	H10
P/T-MER-IMI-LEV	Y	1	-	H1
CAZ-P/T-MER-IMI	G1	1	-	H16(1)
CIP-MER-LEV	F	1	-	H3
CIP-FEP-LEV	M	1	-	H1
TOB-CIP-LEV	O	2	-	H2 H9
CAZ-FEP-P/T	T	3	-	H8 (1) H3 (1) H1(1)
MER-IMI-LEV	I1	4	-	H14(2) H9(1) H4(1)
TOB-CIP-LEV	X1	2	-	H9 H2
CIP-LEV	B	1	-	H2
MER-IMI	C	5	-	H3(1) H14(1) H7(1) H4(1)H15(1)
CAZ-P/T	K	2	-	H4 H5
CAZ-LEV	N	1	-	H4
TOB-FEP	Q1	1	-	H2
CAZ	M1	1	-	H2
CIP	K1	1	-	H9
IMI	U	3	-	H15(1)H13(1)H(1)
LEV	S	6	-	H9(2) H14(1) H13(1) H5(1)H3(1)

Legenda da Tabela 5: AK-Amicacina; TOB-Tobramicina; CIP-Ciprofloxacina; CAZ-Ceftazidima; FEP-Cefepime; P/t-Piperacilina/tazobactam; MER-Meropenem; IMI-Imipenem; LEV-Levofloxacina.  
Fonte: O autor, 2024.

### 3.6 Perfis de sensibilidade das novas drogas e de Polimixina

Além das drogas clássicas antipseudomonas testadas de rotina, foram testadas para os microrganismos MDR e XDR as novas drogas ceftazidima/avibactam e ceftolozane/tazobactam. O antimicrobiano Caz/avi foi testado para todos os 34 isolados classificados como MDR ou XDR e dentre os 34, 19 foram sensíveis e 15 foram resistentes. O antimicrobiano Ceftolozane/tazobactam foi testado em apenas sete isolados e apresentou sensibilidade a tres e resistência a quatro. Além das novas drogas, a polimixa B foi testada também para todos os isolados MDR ou XDR e apresentou sensibilidade para 29 isolados e resistência a apenas cinco.

Tabela 6: Percentuais de sensibilidade das novas drogas em isolados multidroga-resistentes e extensivo-droga resistentes.

Antibióticos	Sensível	Intermediário (Sensível aumentando e exposição)	Resistente	N testado
Ceftazidima/Avibactam	19 (56%)	0	15 (44%)	34
Ceftolozane/tazobactam	3 (43%)	0	4 (57%)	7
Polimixina	29 (81%)	0	5 (19%)	34

Fonte: O autor, 2024.

### 3.7 Perfis de resistência dos isolados MDR e XDR

Dentre os perfis MDR e XDR o perfil mais presente entre todos os isolados foi o perfil D. Encontrado em 13 amostras distribuídas por 7 hospitais diferentes, esse perfil apresentou sensibilidade a polimixina em todos os isolados e sensibilidade a ceftazidima/avibactam (CZA) em apenas 4 isolados, sendo os outros 9 resistentes. Todas essas amostras com resistência a CZA, apresentaram sensibilidade a polimixina. Em relação ao antimicrobiano Ceftolozane/tazobactam, somente uma amostra foi testada dentre essas 13 que possuem o perfil D e a mesma apresentou resistência tanto ao ceftolozane quanto a CZA, mantendo sensibilidade somente a polimixina. O perfil C1 foi encontrado em dois hospitais, H17 e H8, sendo que a amostra presente no hospital H17 com esse perfil apresentou sensibilidade a CZA e polimixina, porém, o isolado com esse mesmo perfil C1 no hospital H8, apresentou resistência tanto a CZA quanto a polimixina. Em relação a resistência a CZA, ceftolozane/tazobactam e polimixina foi possível observar esse perfil (F1) no hospital H9, representada por uma única amostra. Nenhum

outro isolado apresentou resistência a essas 3 drogas simultaneamente no estudo. Com sensibilidade simultânea as 3 drogas testadas como últimas opções terapêuticas, apenas 2 isolados tiveram esse perfil, ambas do hospital H2 apresentando perfis I e V.

Tabela 7: Perfil de sensibilidade a novas drogas em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* com perfis Multidroga-resistentes e Extensivo droga-resistentes

Perfil	Hospital	Data	Amostras	CZA	C/T	Poli B
D	H2	28/06/21	1552009009	R	-	S
	H13	17/12/21	1775758802	R	-	S
	H2	31/07/21	1608550209	R	-	S
	H3	17/12/21	1775787706	R	-	S
	H2	24/10/21	1740353202	R	-	S
	H13	01/03/22	1828654804	R	R	S
	H2	12/12/21	1771638609	S	-	S
	H2	12/04/21	1477588302	S	-	S
	H1	08/02/22	1811332402	R	-	S
	H11	08/07/21	1570121802	R	-	S
	H2	04/02/22	1808728602	S	-	S
	H4	14/06/21	1535706103	S	-	S
	H19	26/02/22	1824838108	R	-	S
	H02	H1	02/07/21	1559913002	S	-
Y	H1	30/04/21	1496224101	S	-	S
I	H2	14/04/21	1479834207	S	S	S
V	H2	20/05/21	1516027107	S	S	S
T1	H11	08/07/21	1570121802	S	-	R
E	H16	26/04/21	1492317502	S	-	S
G	H14	17/04/21	1482408801	S	-	S
P1	H13	03/05/21	1498426201	R	R	S
V1	H4	27/04/21	1493147602	S	-	S
H	H9	03/10/21	1727808904	S	-	S
J	H11	04/10/21	1728930003	S	-	R
C1	H17	10/12/21	1770740901	S	-	R
	H8	17/08/21	1643546709	R	-	R
A1	H10	24/10/21	1741246714	S	-	S
N1	H7	17/12/21	1775800302	S	-	S
Y1	H7	02/02/22	1807638513	S	-	S
L1	H17	30/01/22	1805754104	S	-	S
E1	H9	10/03/22	1840393803	R	S	S
F1	H9	11/03/22	1842235701	R	R	R
E	H6	26/07/21	1600885608	S	-	S
G	H8	25/26/21	1549026601	S	-	S

Fonte: O autor, 2024.

### 3.8 Perfil molecular dos isolados positivos para ESBL e Carbapenemases

Das 34 amostras classificadas como MDR ou XDR, 14 amostras foram testadas para genes de carbapenemases e de ESBL e apenas 4 tiveram resultados positivos. Dentre essas amostras positivas, 2 tiveram o gene *bla*-KPC detectado, sendo uma delas presente no hospital H2 e a outra presente no hospital H1, ambos hospitais localizados no Rio de Janeiro. Dessas duas amostras KPC positivo, uma foi proveniente de uma amostra de sangue e outra proveniente de uma secreção traqueal. Uma amostra foi positiva para a presença do gene VIM e era proveniente do hospital H19, sendo isolada em uma amostra de escarro e proveniente de um hospital localizado no estado de São Paulo. Em relação a detecção do gene CTX-M para ESBL, somente um isolado apresentou esse perfil e era proveniente do hospital H7.

Nas duas amostras positivas para *bla*-KPC, o perfil de resistência não foi o mesmo. Na amostra positiva para KPC proveniente do hospital H1, o isolado de *P. aeruginosa* apresentou resistência a todas aos antimicrobianos clássicos antipseudomonas além disso ainda apresentou resistência a ceftazidima/avibactam. Já a mostra KPC positiva do hospital H2, apresentou resistência a todos os antimicrobianos clássicos antipseudomonas, porém, manteve sensibilidade a ceftazidima/avibactam. A outra amostra positiva para carbapenemase, e positiva para o gene *bla*-VIM, apresentou o mesmo perfil de resistência do isolado KPC positivo do hospital H1, tendo inclusive resistência a ceftazidima/avibactam.

A amostra positiva para o gene CTX-M de produção de ESBL apresentou um perfil com menor resistência que as amostras positivas para carbapenemases, mantendo sensibilidade a carbapenêmicos e amicacina. Todos os quatro isolados positivos para algum dos genes pesquisados foram de amostras provenientes do ano de 2022 e provenientes do mesmo mês de fevereiro.

Tabela 8: Perfil molecular dos isolados positivos para betalactamases de espectro estendido e carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa*.

Amostra	Data	Hospital/Estado	Perfil de resistência	Espécime	Gene
180872	04/02/22	H2/RJ	AK-TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV	Sangue	<i>bla-KPC</i>
180763	02/02/22	H7/RJ	TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-LEV	Urina	<i>bla-CTX-M</i>
182483	26/02/22	H19/SP	AK-TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV-CZA	Escarro	<i>bla-VIM</i>
181133	08/02/22	H1/RJ	AK-TOB-CIP-CAZ-FEP-P/T-MER-IMI-LEV-CZA	Sec.traqueal	<i>bla-KPC</i>

Legenda: AK-Amicacina; TOB-Tobramicina; CIP-Ciprofloxacina; CAZ-Ceftazidima; FEP-Cefepime; P/T-Piperacilina/Tazobactam; MER-Meropenem; IMI-Imipenem; LEV-Levofloxacina; CZA-Ceftazidima/Avibactam.

Fonte: O autor, 2024.

## 4 DISCUSSÃO

*P. aeruginosa*, um bacilo-gram negativo não fermentador de glicose frequente em diversas infecções nosocomiais, é considerado um patógeno crítico por gerar altas taxas de morbidade e mortalidade em infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS), principalmente por apresentar um conjunto de mecanismos de resistência a antimicrobianos complexo e variado, além de diferentes mecanismos de virulência que facilitam invasão e infecção de células hospedeiras (Costa, *et al.*, 2022).

Dentre os espécimes clínicos estudados, as amostras de urina apresentaram o maior número de isolamentos de *P. aeruginosa*, com 39 cepas recuperadas. Infecções de trato urinário causadas por *P. aeruginosa* são comuns no ambiente hospitalar, principalmente em pacientes que fazem uso de cateteres vesicais de alívio que facilitam a formação de biofilmes. Esses achados estão em concordância com a literatura sobre infecções de trato urinário em ambiente hospitalar (Eladawy, *et al.*, 2023; Khabipova, *et al.*, 2022; Cole, *et al.*, 2014).

Amostras de trato respiratório inferior, coletadas via lavado bronco-alveolar (LBA), representaram o segundo maior grupo clínico com isolamento de *P. aeruginosa*, totalizando 29 (23%) cepas, das quais sete (24%) eram multirresistentes (MDR). *P. aeruginosa* é um patógeno comum em infecções respiratórias nosocomiais, principalmente em pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV). Li e colaboradores (2024) reportaram, em uma meta-análise, uma prevalência global média de 33% de *P. aeruginosa* MDR em PAV, com variação de 12% a 87,5% dependendo da região. No Brasil, Resende e colaboradores (2013) encontraram uma prevalência de 34,4% de PAV causadas por *P. aeruginosa* no Nordeste, com 72,7% dos isolados sendo MDR.

Apesar dos resultados de culturas de amostras de LBA geralmente serem liberadas quantitativamente com base em pontos de corte para diferenciar colonização de infecção, considerando que essas amostras provêm de uma lavagem do trato respiratório inferior e que algumas diretrizes já indicam a ausência de correlação entre culturas quantitativas de LBA e melhores desfechos clínicos (Kalil *et al.*, 2016), na prática clínica, achados de *P. aeruginosa* nesse tipo de amostra são valorizados independentemente da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

Devido aos diferentes mecanismos de resistência a antimicrobianos presentes em isolados de *P. aeruginosa* (Langedonk *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2022), os testes de suscetibilidade podem revelar variados padrões de resistência nesses microrganismos. O teste de suscetibilidade antimicrobiana para *P. aeruginosa* não deve ser realizado por metodologias automatizadas

devido a diversas limitações descritas na literatura. Essas metodologias podem levar a interpretações equivocadas de suscetibilidade, especialmente com determinados antimicrobianos, resultando em taxas significativas de erros muito graves, como a liberação de resultados que indicam falsa sensibilidade (Gagliotti, *et al.*, 2011; Juretschko, *et al.*, 2007; Mazzariol, *et al.*, 2008; Otto-Karg, *et al.*, 2009).

Utilizando o método de disco difusão (Kirby-Bauer) para determinar a sensibilidade dos isolados deste trabalho, foi possível encontrar diferentes padrões de sensibilidade de acordo com a classe de antimicrobiano testada. Dentre as 130 amostras testadas, 34 (26,15%) foram consideradas MDR ou XDR, mostrando que as demais 96 amostras não possuíam um perfil com altas taxas de resistência a antimicrobianos. Os aminoglicosídeos foram os antimicrobianos que tiveram as maiores taxas de sensibilidade, com amicacina e tobramicina demonstrando sensibilidade a 85% das cepas testadas. Ainda que sejam descritos em *P. aeruginosa* mecanismos de resistência a aminoglicosídeos como enzimas modificadoras (EMAs), bombas de efluxo como MexXY-OprM e mutações no rRNA 16s, altas taxas de sensibilidade a esses antimicrobianos também são encontradas em literatura (Atassi, *et al.*, 2023; Shortridge, *et al.*, 2019) Até 2019, a gentamicina tinha padronização e ponto de corte clínico no documento do BrCAST. No entanto, a partir de 2020, seu uso deixou de ser reportado devido a evidências insuficientes relacionadas à distribuição de pontos de corte epidemiológicos. Desde então, a gentamicina não é mais testada rotineiramente para *P. aeruginosa* (BrCAST, 2024).

Em seguida, os antimicrobianos com as maiores taxas de suscetibilidade foram a ciprofloxacina e a piperacilina/tazobactam, ambas com 71% de sensibilidade entre todos os isolados testados. Como pertencem a classes distintas, os principais mecanismos de resistência que poderiam reduzir significativamente a suscetibilidade dessas drogas, exceto pela hiperexpressão da bomba de efluxo MexAB-OprM, seriam diferentes. As mutações nos sítios ativos das quinolonas *gyrA* e *parC* são os principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* (Arabameri *et al.*, 2021; Nouri *et al.*, 2016; Kanafani *et al.*, 2023), enquanto as betalactamases, como a *ampC* cromossômica, carbapenemases de classes A e B e mutações em proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), são os principais mecanismos de resistência à piperacilina/tazobactam (Giovagnorio *et al.*, 2023).

Esses mecanismos possivelmente não estavam presentes na maioria dos isolados deste estudo, que mostraram alta taxa de sensibilidade aos antimicrobianos, preservando assim a eficácia do tratamento. Outra possibilidade para explicar a boa sensibilidade a esses antimicrobianos é a pressão seletiva menor. Embora não tivéssemos acesso a essa informação,

é possível que o uso desses dois antimicrobianos nas instituições de origem dos isolados de *P. aeruginosa* seja menos frequente ou bem regulado.

Além das drogas testadas primariamente para *P. aeruginosa*, nos casos de alguns isolados MDR e XDR, foi testado o antibiótico ceftolozane/tazobactam, e os antimicrobianos de últimas gerações terapêuticas ceftazidima/avibactam e polimixina. Para ceftazidima/avibactam foi encontrada uma taxa de de resistência de 44% dentre os 34 isolados de *P. aeruginosa* MDR e XDR investigados.

Em recente estudo, dentre 120 isolados de *P. aeruginosa* coletados no período de 2022 a 2023 uma taxa de 18% de resistência foi encontrada frente a ceftazidima/avibactam, sendo aproximadamente 72% dessa resistência associada a produção de metallo-betalactamases, principalmente *bla*-VIM-2 (Valzano, *et al.*, 2024). Em nosso estudo a amostra 182483 resistente fenotipicamente a ceftazidima/avibactam foi positiva para o gene *bla*-VIM. Esse achado era esperado, visto que esse antimicrobiano não possui atividade frente a betalactamases de classe B (Zasowski, *et al.*, 2015).

O isolado 181133 foi positivo para o gene *bla*-KPC, que em tese não teria atividade para hidrolisar ceftazidima/avibactam e seria inibida por esse novo inibidor não beta-lactâmico, no entanto, também apresentou resistência ao novo antimicrobiano. Algumas mutações no gene *bla*-KPC já descritas na literatura conferem resistência a ceftazidima/avibactam (Zhang, *et al.*, 2023; Carrara-Marroi, *et al.*, 2015; Silveira, *et al.*, 2023; Wang, *et al.*, 2023) no entanto, na técnica de PCR realizada não foi possível identificar qual variante do gene *bla*-KPC foi detectada, visto que no teste utilizado as variantes não são diferenciadas.

Dentre as outras 6 amostras com resistência a ceftazidima/avibactam, não foram detectados genes de carbapenemases, sugerindo que existam variantes não detectadas pelo método utilizado ou que essa resistência seja proveniente de outros mecanismos que não sejam carbapenemases. Estudos adicionais são necessários para essa confirmação.

Em relação a testagem de ceftolozane/tazobactam foi possível observar uma taxa de resistência de 57%, porém, devido a um *recall* do antimicrobiano suspendendo o uso na prática clínica por problemas relacionados a estabilidade durante a sua produção, no período do estudo, apenas sete isolados foram testados. Assim, o percentual encontrado pode não refletir a taxa real devido ao pequeno número de amostras testadas. Ceftolozane/tazobactam é considerado um antimicrobiano com bom desempenho para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* MDR como sugere a literatura (Leitão, *et al.*, 2023; Mogyoródi, *et al.*, 2022; Mendes, *et al.*, 2024).

Bacilos gram-negativos resistentes a carbapenêmicos têm sido, há algum tempo, um problema de saúde pública global. *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (CRPA), que já foi classificada como um patógeno de prioridade crítica pela Organização Mundial da Saúde, agora é listada como de alta prioridade. Ainda assim, continua a causar grande impacto, com altas taxas de morbidade e mortalidade no cenário mundial da multirresistência bacteriana (WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024). No presente estudo, 34% e 36% das amostras foram resistentes ao meropenem e ao imipenem, respectivamente. Em outros estudos brasileiros, essas taxas de resistência são semelhantes. Um estudo realizado com isolados do estado de Rondônia, por exemplo, demonstrou aproximadamente 30% de resistência a meropenem em 1.065 isolados testados (Santos *et al.*, 2024). Em outro estudo realizado em São Luís, Maranhão, a resistência ao meropenem variou entre 34% e 39%, enquanto ao imipenem foi de 38% a 42% entre 951 amostras testadas. (Mesquita, *et al.*, 2023).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode ser mediada por diferentes mecanismos, principalmente por bombas de efluxo como MexAb-OprM (Lorusso, 2022), por hiperexpressão de betalactamase AmpC cromossomal (Cabot, *et al.*, 2011), pela produção de carbapenemases que cada vez mais vem sendo relatadas e estudadas em *P. aeruginosa* (Kiffer *et al.*, 2023; Reyes, *et al.*, 2023; Mojica, *et al.*, 2023; Gondal, *et al.*, 2024) e por perdas de porinas específicas como OprD (Biggel, *et al.*, 2023). Dentre os isolados com resistência a carbapenêmicos do estudo, apenas oito tiveram perfil sugestivo de perda de porina OprD, pois cinco apresentaram sensibilidade a todas as outras drogas testadas e resistência somente a imipenem e meropenem, e três apresentaram resistência somente a imipenem, fenótipos esses que são característicos desse mecanismo de resistência (Vasquez, *et al.*, 2021; Terzi, *et al.*, 2015; Beig, *et al.*, 2020).

Com o aumento das infecções causadas por bacilos gram negativos resistentes aos carbapenêmicos, a retomada do uso da polimixina fez-se necessária como “último recurso” na ausência de antimicrobianos com atividade frente a microrganismos multirresistentes (Garg, *et al.*, 2017). No presente estudo, entre as 34 amostras MDR e XDR testadas, foi observada uma taxa de sensibilidade de 81% nos isolados de *P. aeruginosa*. Embora a polimixina seja frequentemente testada e utilizada na prática clínica, várias limitações foram descritas em relação aos testes de suscetibilidade a esse antimicrobiano. Essas limitações incluem características da molécula do antimicrobiano, a aderência aos materiais usados nos testes, a falta de reprodutibilidade entre os testes, a baixa difusão em ágar, entre outros fatores que afetam até mesmo a microdiluição em caldo, considerada o padrão ouro para a testagem de polimixina (Ezadi *et al.*, 2019; Poirel *et al.*, 2017; Karvanen *et al.*, 2017; Nang *et al.*, 2021;

Matuschek et al., 2017). Embora a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) não tenha sido realizada nas amostras de *P. aeruginosa* neste estudo, a metodologia do ágar superpoli já mostrou em literatura bom desempenho na detecção de resistência à polimixina quando comparado a microdiluição (Nordmann et al., 2016). Entretanto, estudos adicionais fenotípicos e ou moleculares precisam ser realizados para confirmação desse achado.

Apesar de não ser o principal mecanismo de resistência a carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, diversos estudos relatam a presença de carbapenemases nessas bactérias e, embora muitos genes tenham sido descritos globalmente em *P. aeruginosa*, os genes *blaVIM* e *blaIMP* são os mais prevalentes (Tenover et al, 2022). No Brasil, até recentemente, o gene *blaSPM* era o mais prevalente em isolados de *P. aeruginosa*, tendo sido encontrado pela primeira vez em 1997 em São Paulo (Toleman et al, 2002). Desde então tem sido detectado em quase todas as regiões do país (Gales et al, 2003; Kalluf et al 2017). O pico de detecção de *blaSPM* no Brasil ocorreu entre 2000 e 2012 e foi associado a um único clone, ST277. No entanto, nos últimos 10 anos, foi observado um decréscimo na prevalência de *blaSPM* e uma maior frequência de isolamento de outras carbapenemases, principalmente associada aos genes *blaKPC*, *blaNDM* e *blaVIM*, em alguns hospitais no Brasil (Scavuzzi et al, 2019).

Dentre as 31 amostras MDR e XDR deste estudo, 14 delas foram investigadas para os genes *bla-KPC*, *bla-NDM*, *bla-VIM*, *bla-IMP*, e *bla-OXA-48*, e dentre essas, três amostras foram positivas, sendo duas para o gene *bla-KPC* e uma para o gene *bla-VIM*. Em recente artigo publicado com isolados coletados entre 2015 a 2022, foram analisadas as tendências de detecção de carbapenemases usando a Rede de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (AMR) do Brasil (Kiffer, et al., 2023). Em relação a *P. aeruginosa* a prevalência geral dos genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaVIM* e *blaSPM* foi de 8,4%; 2,5%; 0,2%; 8,4% e 9,5%, respectivamente. Considerando a distribuição temporal ao longo dos anos, é possível observar que os percentuais de positividade variaram de 2,5% (2015) a 14,1% (2021) para o gene *blaKPC*; 0,3% (2015) a 8,8% (2021) para *blaNDM*, 0% (2015) a 12% (2019) para *blaIMP*, 0% (2015) a 13,4% (2022) para *bla VIM* e 22,5% (2015) a 4% (2022) para *blaSPM*. Segundo esse mesmo estudo, no ano de 2022 as carbapenemases mais prevalentes no Brasil em *P. aeruginosa* foram KPC (13,2%) e VIM (13,4%), justamente as enzimas detectadas nos três isolados produtores de carbapenemases neste estudo que também foram provenientes de amostras coletadas no ano de 2022.

Além das carbapenemases, as betalactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas também encontradas em *P. aeruginosa* e geralmente reduzem as opções terapêuticas que possuem atividade frente a essa bactéria por promover resistência a beta-lactâmicos anti-

pseudomonas (Husna, *et al.*, 2023). Dentre as variantes de ESBL existentes, no PCR realizado no presente estudo, somente a CTX-M foi investigada e dentre os 14 isolados, somente um apresentou positividade para essa variante de ESBL, apresentando resistência a ceftazidima, cefepime e piperacilina/tazobactam. Dentre as variantes de ESBL encontradas em *P. aeruginosa* na literatura, o gene CTX-M já foi descrito em diferentes estudos, inclusive no Brasil (Polotto, *et al.*, 2021; Hosu, *et al.*, 2021; Ullah, *et al.*, 2017; Shalmashi, *et al.*, 2022; Galetti, *et al.*, 2015), no entanto, outras variantes de beta-lactamase de espectro estendido como *bla*-PSE, *bla*-PER, *bla*-GES, *bla*-OXA-10 e *bla*-VEB também vem sendo relatadas em estudos recentes e corroboram para uma possível maior prevalência em determinadas regiões (Edward, *et al.*, 2024; Polse, *et al.* 2023; Hasanpour, *et al.*, 2023; Rahimzadeh, *et al.*, 2023).

### **Limitações**

Em relação as limitações desse presente estudo, é válido destacar a perda de viabilidade de algumas cepas MDR e XDR para realização da detecção de carbapenemases o que reduziu o número de isolados a serem testados, além do número reduzido de testagem do antimicrobiano ceftolozane/tazobactam devido ao seu *recall* durante a execução do trabalho; a não realização da pesquisa do gene *bla*-SPM e também outros genes ESBL na PCR realizada; embora exista na literatura boa correlação entre a metodologia usada para a determinação da resistência a polimixina, seria recomendável a determinação da concentração inibitória mínima por método de referência; a não realização de um método de tipagem onde pudesse ser explorado a dispersão de clones nas instituições de origem das amostras de *P. aeruginosa* estudadas

## CONCLUSÕES

- a) *P. aeruginosa* foi encontrada em maior número em amostras de urina e lavado broncoaveolar.
- b) Os 130 isolados de *P. aeruginosa* foram identificados corretamente por MALDI-TOF a nível de espécie.
- c) Os aminoglicosídeos foram os antimicrobianos com maior taxa de sensibilidade dentre os testados, sendo amicacina e tobramicina tendo uma taxa de 85% de sensibilidade.
- d) As taxas de resistência aos carbapenêmicos foram semelhantes (34% e 36% para meropenem e Imipenem, respectivamente).
- e) Dentre 130 isolados de *P. aeruginosa*, 34 (26%) foram classificados como MDR ou XDR, sendo todos resistentes aos carbapenêmicos.
- f) Somente três amostras de 14 classificadas como MDR ou XDR que foram pesquisadas para carbapenemases foram positivas, sugerindo presença de outros mecanismos de resistência, outras carbapenemases ou outras variantes de carbapenemases não pesquisadas.
- g) Dentre as três amostras classificadas como XDR e positivas para carbapenemases, duas apresentaram o gene *bla*-KPC e uma para o gene *bla*-VIM, sugerindo que a produção de carbapenemases de classe A e classe B limita significativamente as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por esses isolados.
- h) A polimixina foi o antimicrobiano com maior taxa de sensibilidade dentre os 34 isolados MDR e XDR, porém é necessário a utilização de estudos adicionais por testes fenotípicos e ou moleculares para a confirmação desse achado.
- i) Apesar de sua recente introdução na prática clínica, observou-se uma taxa de resistência de 44% à ceftazidima/avibactam nos isolados de *P. aeruginosa*, indicando a presença de mecanismos de resistência que podem comprometer seu uso terapêutico. Estudos mais aprofundados sobre esses possíveis mecanismos de resistência são necessários para caracterizar a natureza e funcionamento desses mecanismos de resistência.

## REFERÊNCIAS

Arabameri N, Heshmatipour Z, Eftekhari Ardebili S, Jafari Bidhendi Z. The role of Gene Mutations (*gyrA*, *parC*) in Resistance to Ciprofloxacin in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. Iran J Pathol. 2021 Fall;16(4):426-432. doi: 10.30699/IJP.2021.520570.2542. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34567192; PMCID: PMC8463757.

Atassi G, Medernach R, Scheetz M, Nozick S, Rhodes NJ, Murphy Belcaster M, Murphy KR, Alisoltani A, Ozer EA, Hauser AR, 2023. Genomics of Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections at a United States Academic Hospital. Microbiol Spectr 11:e0508722.<https://doi.org/10.1128/spectrum.05087-22>

BrCAST 2023, Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/> Acesso em: 01/06/2023

Biggel M, Johler S, Roloff T, Tschudin Sutter S, Bassetti S, Siegemund M, Egli A, Stephan R, Seth-Smith HMB, 2023. PorinPredict: *In Silico* Identification of OprD Loss from WGS Data for Improved Genotype-Phenotype Predictions of *P. aeruginosa* Carbapenem Resistance. Microbiol Spectr 11:e03588-22.<https://doi.org/10.1128/spectrum.03588-22>

Carle Gessard, On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages, *Reviews of Infectious Diseases*, Volume 6, Issue Supplement\_3, September-October 1984, Pages S775–S776, [https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement\\_3.S775](https://doi.org/10.1093/clinids/6.Supplement_3.S775)

Dos Santos, L.A., Cayô, R., Valiatti, T.B. *et al.* Biodiversity of carbapenem-resistant bacteria in clinical samples from the Southwest Amazon region (Rondonia/Brazil). *Sci Rep* **14**, 9383 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59733-w>

Florister Elaine Carrara-Marroni, Rodrigo Cayô, Ana Paula Streling, Ana Carolina Ramos da Silva, Raquel Lima Palermo, Priscila Romanin, Emerson Venâncio, Márcia Regina Eches Perugini, Marsileni Pelisson, Ana Cristina Gales, Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 3, Issue 4, 2015, Pages 304-306, ISSN 2213-7165, <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.002>.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:699–702.

Kalluf KO, Arend LN, Wuicik TE, et al. Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. *Infect Genet Evol* 2017; 49:130–3

Garcia RCL, Rodrigues RD, Garcia ECL, Rigatto MH. Comparison between Colistin and Polymyxin B in the Treatment of Bloodstream Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus Complex. *Antibiotics*. 2023; 12(8):1317. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081317>

Hosu, M.C., Vasaikar, S.D., Okuthe, G.E. *et al.* Detection of extended spectrum beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in rural Eastern Cape Province, South Africa. *Sci Rep* **11**, 7110 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86570-y>

Li Y, Roberts JA, Walker MM, Aslan AT, Harris PNA, Sime FB. The global epidemiology of ventilator-associated pneumonia caused by multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2024 Feb;139:78-85. doi: 10.1016/j.ijid.2023.11.023. Epub 2023 Nov 26. PMID: 38013153.

Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, et al. Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. *Clin Infect Dis.* 2018;67(12):1803–1814. doi: 10.1093/cid/ciy378.

Liu, G., Thomsen, L.E. and Olsen, J.E. (2022) ‘Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), pp. 556–567. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB450>.

Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R. B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection.* 2012;18(3):268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Mesquita GP, Costa MCC, Silva MA, Araújo LG, Vila Nova BG, Castro ÉJM, Castelo Branco LCM, Silva RCSD, Marques SG, Abreu AG. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pneumonia during the COVID-19 pandemic and pre-pandemic periods in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2023 Jul 21;56:e12726. doi: 10.1590/1414-431X2023e12726. PMID: 37493772; PMCID: PMC10361641.

Mojica MF, De La Cadena E, García-Betancur JC, Porrás J, Novoa-Caicedo I, Páez Zamora L, Pallares C, Appel TM, Radice MA, Castañeda Méndez P, Gales AC, Munita JM, Villegas MV. 2023. Molecular Mechanisms of Resistance to Ceftazidime/Avibactam in Clinical Isolates of *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* in Latin American Hospitals. *mSphere* 8:e00651-22. <https://doi.org/10.1128/msphere.00651-22>

Ong T, Ramsey BW. Cystic Fibrosis: A Review. *JAMA.* 2023;329(21):1859–1871. doi:10.1001/jama.2023.8120.

Oplustil, Carmen Paz et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340 p. ISBN 8573781432

Patil S, Chen X, Dong S, Mai H, Lopes BS, Liu S and Wen F (2023) Resistance genomics and molecular epidemiology of high-risk clones of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* in young children. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13:1168096. doi: 10.3389/fcimb.2023.1168096

Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, Nogueira MC. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect*

Dis. 2012 Aug 3;12:176. doi: 10.1186/1471-2334-12-176. PMID: 22863113; PMCID: PMC3512492.

Polse, R.F., Khalid, H.M. & Mero, W.M.S. Distribution of *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>PER-1</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub> genes in ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Sci Rep* **13**, 18402 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45417-4>

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 199 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>.

Raveendran S, R D, Shimoga Ravi Kumar S, Karthik K. Addressing the Global Threat of Multidrug-Resistant Infections: The Role of Ceftazidime-Avibactam Revisited. *Cureus*. 2024 May 13;16(5):e60235. doi: 10.7759/cureus.60235. PMID: 38872698; PMCID: PMC11169094.

Reyes J, Komarow L, Chen L, Ge L, Hanson BM, Cober E, Herc E, Alenazi T, Kaye KS, Garcia-Diaz J, Li L, Kanj SS, Liu Z, Oñate JM, Salata RA, Marimuthu K, Gao H, Zong Z, Valderrama-Beltrán SL, Yu Y, Tambyah P, Weston G, Salcedo S, Abbo LM, Xie Q, Ordoñez K, Wang M, Stryjewski ME, Munita JM, Paterson DL, Evans S, Hill C, Baum K, Bonomo RA, Kreiswirth BN, Villegas MV, Patel R, Arias CA, Chambers HF, Fowler VG Jr, Doi Y, van Duin D, Satlin MJ; Antibacterial Resistance Leadership Group and Multi-Drug Resistant Organism Network Investigators. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases (POP): a prospective cohort study. *Lancet Microbe*. 2023 Mar;4(3):e159-e170. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00329-9. Epub 2023 Feb 9. PMID: 36774938; PMCID: PMC10016089.

Reyne N, McCarron A, Cmielewski P, Parsons D and Donnelley M (2023), To bead or not to bead: A review of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection models for cystic fibrosis. *Front. Physiol.* 14:1104856. doi: 10.3389/fphys.2023.1104856.

Roghayeh Nouri, Mohammad Ahangarzadeh Rezaee, Alka Hasani, Mohammad Aghazadeh, Mohammad Asgharzadeh, The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran, *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 47, Issue 4, 2016, Pages 925-930, ISSN 1517-8382, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.016>.

Sader HS, Mendes RE, Kimbrough JH, Hubler CM, Castanheira M. Activity of Aztreonam/Avibactam and Recently Approved  $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations against Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* from Intensive Care Unit and Non-Intensive Care Unit Patients. *Antibiotics (Basel)*. 2024 Jun 17;13(6):564. doi: 10.3390/antibiotics13060564. PMID: 38927230; PMCID: PMC11200427.

Sathe, N.; Beech, P.; Croft, L.; Suphioglu, C.; Kapat, A.; Athan, E. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and Novel Approaches to Treatment “Knowing the Enemy” the Threat of *Pseudomonas aeruginosa* and Exploring Novel Approaches to Treatment. *Infect. Med.* **2023**, 2, 178–194.

Sanya D.R.A., Onésime D., Vizzarro G., Jacquier N. Recent advances in therapeutic targets identification and development of treatment strategies towards *Pseudomonas aeruginosa* infections. *BMC Microbiol.* 2023;23:86. doi: 10.1186/s12866-023-02832-x.

Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, et al. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2-harboring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 19:181–2

Shortridge D, Gales AC, Streit JM, Huband MD, Tsakris A, Jones RN. Geographic and Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Over 20 Years From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Mar 15;6(Suppl 1):S63-S68. doi: 10.1093/ofid/ofy343. PMID: 30895216; PMCID: PMC6419917.

Silveira, Melise & Albano, Rodolpho & Rocha-de-Souza, Claudio Marcos & Leão, Robson & Marques, Elizabeth & Picao, Renata & Kraychete, Gabriela & Santos, Ivson & Oliveira, Thamirys & Tavares-Teixeira, Camila & Carvalho-Assef, Ana Paula. (2022). Description of a novel IncP plasmid harboring blaKPC-2 recovered from a SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* from ST277. *Infection, Genetics and Evolution*. 102. 105302. 10.1016/j.meegid.2022.105302.

Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*—an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect* 2022; 11:811–4.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from S36 • CID 2023:77 (Suppl 1) • Kiffer et al the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:673–9.

Valzano F, La

Bella G, Lopizzo T, Curci A, Lupo L, Morelli E, Mosca A, Marangi M, Melfitano R, Rollo T, De Nittis R, Arena F. O. Resistance to ceftazidime–avibactam and other new  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multi-center surveillance study. *Microbiol Spectr* 0:e04266-23.

<https://doi.org/10.1128/spectrum.04266-23>

Urban-Chmiel, R.; Marek, A.; Stępień-Pyśniak, D.; Wieczorek, K.; Dec, M.; Nowaczek, A.; Osek, J. Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics* 2022, 11, 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

Zakhour, J.; Sharara, S.L.; Hindy, J.-R.; Haddad, S.F.; Kanj, S.S. Antimicrobial Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Severe Sepsis. *Antibiotics* 2022, 11, 1432. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101432>.

Zhang P, Wu W, Wang N, Feng H, Wang J, Wang F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Sequence Type 463 Co-Producing KPC-2 and AFM-1 Carbapenemases, China, 2020–2022. *Emerg Infect Dis*. 2023;29(10):2136-2140. <https://doi.org/10.3201/eid2910.230509>

Wang W, Xi H, Huang M, Wang J, Fan M, Chen Y, Shao H, Li X. Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. *J Thorac Dis*. 2014 May;6(5):524-33. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.17. PMID: 24822114; PMCID: PMC4015010.

Wenzler E, Maximos M, Asempa TE, Biehle L, Schuetz AN, Hirsch EB. Antimicrobial susceptibility testing: an updated primer for clinicians in the era of antimicrobial resistance: insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2023; 43: 264-278.

**ANEXO A** – Perfis de sensibilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de espécimes clínicos de hospitais privados do estado do Rio de Janeiro e de São Paulo

Antibióticos	A	T	C	CAZ	FEP	P/T	M	I	L
Perfil									
A	S	S	I	I	I	I	S	I	I
B	S	S	R	I	I	I	S	I	R
C	S	S	I	I	I	I	R	R	I
D	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E	S	S	S	R	I	R	R	R	R
F	S	S	R	I	S	S	R	S	R
G	S	S	R	R	R	R	R	R	R
H	S	S	R	I	R	R	R	R	R
I	R	R	I	R	R	R	R	R	I
J	S	S	R	I	R	I	R	R	R
K	S	S	I	R	I	R	S	I	I
L	S	S	R	R	R	R	R	R	R
M	S	S	R	I	R	I	S	I	R
N	S	S	I	R	I	I	S	I	R
O	S	R	R	I	I	I	S	I	R
P	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Q	S	S	I	R	R	R	S	I	R
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S	S	S	I	I	I	I	S	I	R
T	S	S	I	R	R	R	S	I	I
U	S	S	I	I	I	I	I	R	I
V	S	S	I	R	R	R	R	R	R
X	I	R	R	R	R	I	R	R	R
Y	S	S	I	I	I	R	R	R	R
A1	S	S	I	I	I	I	I	I	I
C1	S	S	R	R	R	R	R	R	R
D1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E1	S	S	R	R	R	R	R	R	R
F1	S	S	I	R	R	R	R	R	I
G1	S	S	I	R	I	R	R	R	I
H02	I	S	R	R	R	R	S	I	R
I1	S	S	I	I	I	I	I	R	R
K1	S	S	R	I	I	I	S	I	I
L1	R	S	R	R	R	R	R	R	R

M1	S	S	I	R	I	I	S	I	I
N1	S	S	R	R	I	I	R	R	R
P1	S	S	I	R	R	I	R	R	R
Q1	S	R	I	I	R	I	S	I	I
R1	S	R	R	R	R	R	R	R	R
S1	S	S	R	R	I	R	S	I	R
T1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
U1	R	S	R	R	R	I	S	I	R
V1	S	S	I	R	R	R	R	R	I
X1	S	R	R	I	I	I	S	I	R
Y1	I	R	R	R	R	R	S	I	R

Legenda: A- Amicacina; T- Tobramicina; C- Ciprofloxacina; Caz- Ceftazidima; FEP- Cefepima; P/T- Piperacilina/tazobactam;  
M- Meropenem; I- Imipenem; L- Levofloxacina

Fonte: O autor, 2024.