

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

**PRESENÇA DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Pseudomonas* sp. ISOLADAS
DE EFLUENTE HOSPITALAR NÃO TRATADO**

Joice Maliuk dos Santos
Biomédica – Universidade Feevale

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL

**PRESENÇA DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Pseudomonas* sp. ISOLADAS
DE EFLUENTE HOSPITALAR NÃO TRATADO**

Joice Maliuk dos Santos
Biomédica – Universidade Feevale

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção de grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof^a Dr^a Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Março, 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Maliuk dos Santos, Joice
Presença de Bombas de Efluxo em *Pseudomonas* sp.
isoladas de efluente hospitalar não tratado. / Joice
Maliuk dos Santos. -- 2016.
62 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Bombas de efluxo. 2. *Pseudomonas* sp. 3. genes
mex. 4. efluente hospitalar. I. Corção, Gertrudes ,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela possibilidade de continuar a fazer simplesmente tudo o que eu quero.

À minha orientadora Prof. Dra. Gertrudes Corção pela oportunidade, acolhimento, dedicação, ensinamentos e, principalmente, pela confiança. Saiba da minha consideração, admiração e respeito por você.

Agradeço as minhas colegas de laboratório, que sempre estiveram disponíveis a ajudar, ensinar e trocar experiências. Obrigada pela compreensão, pelas palavras de apoio e pelo companheirismo.

Agradeço a todos os Professores do Programa de Microbiologia Agrícola e Ambiental por todos os conhecimentos e experiências transmitidas.

Ao meu amor, pela sua companhia nos momentos mais inquietantes e complicados, e por fazer parte da minha vida tornando-a mais divertida e especial. Amo você.

Agradeço a minha família pelo apoio, carinho e confiança depositados em todos os momentos da minha vida. Vocês sempre serão exemplos a serem seguidos.

A todos que diretamente ou indiretamente estiveram envolvidos com o desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigada.

Presença de Bombas de efluxo em *Pseudomonas* sp. isoladas de efluente hospitalar não tratado¹.

Resumo

Autor: Joice Maliuk dos Santos

Orientadora: Prof.^a Dr^a Gertrudes Corção

O descarte de antimicrobianos e bactérias através de efluentes hospitalares tem contribuído para o aumento e disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente natural. Esta resistência pode estar associada à aquisição de genes de resistência, presença de bombas de efluxo ou características intrínsecas das bactérias. O presente trabalho teve como objetivos: caracterizar o perfil de resistência em 60 isolados de *Pseudomonas* para os antimicrobianos Ceftazidima e Imipenem, detecção fenotípica das bombas de efluxo e detecção dos genes *mex B*, *mex D*, *mex Y* e *mex F* de bomba de efluxo da família Resistência-Nodulação-Divisão (RND), associados a fenótipos de resistência neste gênero bacteriano. O perfil de resistência dos isolados foi avaliado através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos Ceftazidima e Imipenem. Para a detecção fenotípica das bombas de efluxo foi comparada a CIM do Imipenem (IMP) e da Ceftazidima (CAZ) na presença e na ausência de *carbonil cianida m-clorofenilhidrazona* (CCCP). A presença dos genes foi verificada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (n=32) mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos testados do que as outras espécies do gênero (n=28). Na avaliação fenotípica das bombas de efluxo 10 isolados reduziram a CIM do IMP e 6 isolados reduziram a CIM da CAZ na presença do CCCP, indicando que bombas de efluxo possivelmente são responsáveis por esta resistência nestes isolados. Dos 60 isolados utilizados no estudo, 95% amplificaram o gene *mex Y*, 88% o gene *mex B*, 88% *mex F*, 48% *mex D*, no entanto, quando os resultados do PCR foram comparados com a análise fenotípica, revelou que nem todos os isolados expressam os genes encontrados, portanto a resistência pode ser associada também a outros mecanismos.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (59p), Março, 2016.

Presence of Efflux Pump in *Pseudomonas* sp. Isolated from Hospital Effluent
Untreated¹.

Abstract

Author: Joice Maliuk dos Santos

Adviser: Dr. Gertrudes Corção

The disposal of antimicrobial and bacteria through hospital effluents has contributed to the increase and spread of antimicrobial resistance in the natural environment. This resistance can be associated to gene acquisition, presence of efflux pumps or intrinsic characteristics of the bacteria. This study aimed to: characterize the resistance profile of 60 *Pseudomonas* isolates for Ceftazidime and Imipenem I, to detect phenotypically efflux pumps systems and detect the genes *mex B*, *mex D*, *mex Y* and *mex F* responsible by the efflux pump family resistance-nodulation-division (RND). The isolates resistance profile was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ceftazidime and imipenem I. For the phenotypic detection of efflux pumps the MIC of imipenem (IMP) and ceftazidime (CAZ) in the presence and absence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was compared. The presence of the genes was verified by Polymerase Chain Reaction (PCR). Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (n=32) were more resistant to antimicrobials tested than other species of the genus (n=28). In the phenotypic evaluation of efflux pumps 10 isolates reduced the MIC of IMP and 6 isolates reduced the CAZ MIC in the presence of CCCP, indicating that an efflux system can be responsible for the resistance of the isolates. Of the 60 isolates used in the study, 95% amplified the *mex Y*, 88% *mex B*, 88% *mex F* and 48% *mex D*, however, when the PCR results were compared with the phenotypic analysis the results revealed that neither all isolates express genes found, therefore the resistance observed might be associated to another mechanism

1 Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (59p), March, 2016.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RELAÇÃO DE TABELAS | ix |
| RELAÇÃO DE FIGURAS | x |
| RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFIA..... | 3 |
| 2.1 <i>Pseudomonas</i> sp. | 3 |
| 2.2 Resistência antimicrobiana em <i>Pseudomonas</i> sp..... | 4 |
| 2.2.1 Resistência a beta-lactâmicos..... | 5 |
| 2.3 Sistemas de Efluxo em Bactérias..... | 6 |
| 2.3.1 Família ABC | 7 |
| 2.3.2 Família MATE | 8 |
| 2.3.3 Família MFS..... | 8 |
| 2.3.4 Família SMR | 9 |
| 2.3.5 Família RDN..... | 10 |
| 2.4 Sistemas de Efluxo em <i>Pseudomonas</i> | 11 |
| 2.5 Inibidores de Sistemas de Efluxo | 13 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 Meios de Cultura e Soluções | 17 |
| 3.2 Isolados Bacterianos..... | 17 |
| 3.3 Recuperação dos Isolados..... | 17 |
| 3.4 Concentração Inibitória Mínima..... | 18 |
| 3.5 Sistema de efluxo dependente da força próton motiva | 19 |
| 3.6 PCR para Detecção dos Genes de Bombas de Efluxo | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.6.1 Extração de DNA | 19 |
| 3.6.2 Amplificação dos genes de Bomba de Efluxo | 19 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 21 |
| 4.1 Perfil de Resistência das Cepas Estudadas a Ceftazidima e ao Imipenem | 21 |
| 4.2- Avaliação Fenotípica das Bombas de Efluxo | 22 |
| 4.3 Avaliação da Presença de Genes de Sistemas de Bomba Efluxo | 25 |
| 5. CONCLUSÕES | 35 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 37 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |
| 8. ANEXOS | 49 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1- Substratos antimicrobianos para diferentes bombas de efluxo presentes em isolados do gênero <i>Pseudomonas</i> | 12 |
| TABELA 2- Oligonucleotídeos Iniciadores utilizados para amplificação dos genes de bomba de efluxo. | 20 |
| TABELA 3- Resistência a Ceftazidima e Imipenem dos isolados de <i>Pseudomonas sp.</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de efluentes hospitalares. | 22 |
| TABELA 4- Concentração Inibitória Mínima de isolados de <i>Pseudomonas sp</i> e <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> na ausência e presença de CCCP. | 23 |
| TABELA 5 - Distribuição Percentual (%) dos genes de bomba de efluxo em 60 isolados de <i>Pseudomonas sp.</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 26 |
| TABELA 6- Comparação entre a presença de genes de efluxo e a CIM na presença e ausência do Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). | 29 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: Modelo representativo dos sistemas de efluxo família RND presentes em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , indicando a posição das proteínas que compõe a bomba. | 11 |
| FIGURA 2: Produtos de PCR obtidos através da amplificação de um fragmento do gene <i>mexF</i> (255pb). | 26 |

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentual
≤ - Menor ou igual
≥ - Maior ou igual
°C - Graus Celsius
β - Beta
μg - Micrograma
μL - Microlitro
ABC - ATP-binding cassette
ATP - Adenosina trifosfato
BHI - Caldo infusão cérebro coração
CAZ - Ceftazidima
CCCP - Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
CIM - Concentração inibitória mínima
CN- Controle Negativo
CP - Controle Positivo
CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético
et al - e colaboradores
g - gramas
g - Unidades de gravidade
ICBS - Instituto de Ciências Básicas de Saúde
IMP - Imipenem
M - Marcador
MATE - *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*
MDR - *Multi-Drug Resistance*
MFS - *Major Facilitator Superfamily*
Mex - *multidrug efflux pump*
mg - Miligrama
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
mL - Mililitro
MLST - Tipificação por sequenciamento de multilocus
mM - Milimolar
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
NaCl - Cloreto de sódio
PaβN - phenylalanine arginyl beta-naphthylamide
pb - Pares de bases
R - Resistente
RND - *Resistance nodulation division family*
S - Sensível
SMR - *Small Multidrug Resistance*
TSA - Ágar Triptona de Soja

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano
U - Unidade
UFC - Unidade Formadora de Colônia
UV - Luz ultra violeta
V - Volt

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudomonas* pode ser encontrado em uma variedade de ambientes devido a sua mínima exigência nutricional, sendo capaz de utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de energia. A habilidade de adquirir resistência à maioria dos antimicrobianos também garante o sucesso deste microrganismo para se estabelecer em diversos nichos ecológicos, principalmente no ambiente hospitalar.

As espécies de *Pseudomonas* são consideradas um grande problema clínico devido a sua resistência múltipla a antimicrobianos e a difícil erradicação da doença. Entre as espécies do gênero que causam infecções oportunistas a *P. aeruginosa* é a mais estudada. Encontrada normalmente como agente nosocomial, esta espécie possui uma longa história de aquisição de multirresistência contra a maioria dos antimicrobianos de última geração. Além de uma resistência natural devido à baixa permeabilidade da membrana externa, presença de beta-lactamases e bombas de efluxo, os membros desta espécie tem capacidade de adquirir praticamente todos os mecanismos conhecidos de resistência antimicrobiana (Vaz-Moreira *et al.*, 2012).

Outras espécies como a *P. fluorescens*, *P. stutzeri* e *P. putida* também podem estar associadas a infecções humanas. No entanto, informações sobre a resistência a antimicrobianos em outras espécies do gênero *Pseudomonas* são escassas, principalmente para os isolados ambientais. Infelizmente, algumas espécies deste gênero possuem marcante capacidade de resistirem a desinfetantes, característica responsável, em parte, por seu papel nas infecções hospitalares.

Outro fator importante para seu desenvolvimento em ambientes hospitalares é a capacidade de formação de biofilmes, que fornece para este gênero uma habilidade de crescer em ambientes inesperados como resíduos de sabão, alguns tipos de pomadas, torneiras, água utilizada para diálise, cateteres e entre outros locais (Vaz-Moreira *et al.*, 2012; Madigan, 2015).

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos nos ambientes hospitalares vem contribuindo para o aumento de bactérias resistentes e conseqüentemente para a disseminação de genes de resistência no meio ambiente através dos efluentes hospitalares não tratados. Muitas substâncias antibióticas utilizadas na medicina humana podem ser descartadas no esgoto hospitalar ou serem conduzidas diretamente ao esgoto municipal e, depois, para estação de tratamento. Entretanto, esses efluentes podem entrar em contato com o ambiente aquático antes de receberem tratamento. Se as concentrações de antimicrobianos encontradas no meio ambiente forem suficientemente altas, irão gerar condições seletivas para populações resistentes (Kümmerer, 2003).

O conhecimento da influência dos antimicrobianos presentes em águas residuais na saúde pública ainda é escasso, no entanto a presença de altas concentrações de substâncias antibióticas no ambiente aquático é uma preocupação mundial. Uma vez que muitas bactérias Gram-negativas possuem a capacidade de adquirir e transmitir genes de resistência a outros patógenos e, conseqüentemente, podem contribuir para a disseminação da resistência.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo a detecção fenotípica das bombas de efluxo e realizar também a detecção de genes de bombas de efluxo em isolados de *Pseudomonas* sp. de efluente hospitalar, previamente identificados (Spindler, 2009; Fuentesfria, 2009).

Os objetivos específicos foram:

- Detecção fenotípica das bombas de efluxo através da concentração inibitória mínima na presença e na ausência de um desacoplador de força próton motiva, o carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP).

- Detectar a presença dos genes *mexB*, *mexD*, *mexY* e *mexF* de bomba de efluxo da família Resistência-Nodulação-Divisão (RND) pela técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFIA

2.1 *Pseudomonas* sp.

O gênero *Pseudomonas* é caracterizado por abranger bacilos Gram-negativos, retos ou levemente curvos que são dispostos aos pares e usualmente móveis, devido a presença de flagelos (Actor, 2011; Murray *et al.*, 2011). Possuem requisitos nutricionais simples, crescem em pH neutro e temperaturas mesofílicas (Li, 2013).

Outras características frequentemente associadas às espécies de *Pseudomonas*: são oxidase positivas, negativas para formação de gás a partir de glicose, citrato positivas, negativas para produção de indol e beta-hemolíticas em ágar sangue. Também secretam pioverdina ou compostos similares que atuam como sideróforos em condições de crescimento onde o ferro é um fator limitante (Garrity, 1984). Crescem em meios relativamente simples à custa de compostos orgânicos e podem crescer em temperaturas baixas, onde a melhor temperatura de crescimento para a maioria das cepas é 28°C. Em algumas espécies, a temperatura máxima de crescimento é de 45°C, sendo estas consideradas termófilas. Essas características adaptáveis a uma variedade de condições físicas contribuem para sua presença em diferentes ambientes (Palleroni, 2005).

O gênero compreende mais de 200 espécies em uma variedade de ambientes, incluindo o solo, matéria orgânica em decomposição, água, na superfície de plantas e animais e, por isso, é conhecido por sua ubiquidade no ambiente natural (Ozen *et al.*, 2011). A capacidade deste gênero em utilizar diferentes

compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, assim como a sobrevivência na ausência de nutrientes tem sido atribuída a sua versatilidade genética que se traduz em uma atividade metabólica reforçada, permitindo a este grupo de bactérias se adaptar e colonizar uma ampla variedade de nichos ecológicos (Ibginosa *et al.*, 2012).

2.2 Resistência antimicrobiana em *Pseudomonas* sp.

A resistência bacteriana é um grave problema de saúde mundial e a falta de controle no uso de antimicrobianos tem causado sérias consequências, como o fracasso da terapia antimicrobiana, aumento da morbidade e mortalidade, além do aumento de custos em ações de manutenção e prevenção de saúde em humanos e animais (Castellanos *et al.*, 2014).

Muitos antimicrobianos e bactérias resistentes são descartados em grande quantidade no ambiente como resultado do uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos nas práticas médicas, veterinárias e agrárias. A contaminação dos ambientes aquáticos por estes poluentes pode contribuir para manutenção e disseminação da resistência bacteriana (Fuentefria *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que as águas de resíduos hospitalares são ambientes altamente seletivos e que tem contribuído para o aparecimento de bactérias resistentes no ambiente natural (Ferreira *et al.*, 2011; Fuentefria *et al.*, 2011; Mooges *et al.*, 2014;).

A importância clínica dos bacilos Gram-negativos não fermentadores tem aumentado consideravelmente devido a gravidade das infecções, das altas taxas de morbimortalidade em pacientes hospitalizados e do alto índice de resistência que este microrganismos tem apresentado (Torres *et al.*, 2006). A distribuição generalizada de *Pseudomonas* sp. ocasiona algumas preocupações na saúde pública, pois algumas espécies são patógenos oportunistas que podem colonizar homens e animais. A maioria das espécies deste gênero tem capacidade de adquirir resistência a diversos agentes antimicrobianos (Arslan *et al.*, 2011; Vaz-moreira *et al.*, 2012).

Entre as espécies do gênero que causam infecções oportunistas a *P. aeruginosa* é a mais estudada. Encontrada normalmente como agente nosocomial, esta espécie possui uma longa história de aquisição de multirresistência contra a maioria dos antimicrobianos de ultima geração. Além de uma resistência natural

devido a baixa permeabilidade da membrana externa, a produção de beta-lactamases e a presença de bombas de efluxo, os membros desta espécie têm capacidade de adquirir e expressar praticamente todos os mecanismos conhecidos de resistência antimicrobiana (Vaz-Moreira *et al.*, 2012).

Espécies bacterianas de *Pseudomonas* são consideradas um grande problema clínico devido a sua resistência múltipla aos antimicrobianos e a difícil erradicação da doença. As características deste gênero combinadas com o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos nos ambientes hospitalares contribuem para a seleção de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos convencionais, causando o aumento da taxa de infecção hospitalar com alto índice de morbidade e mortalidade (Fuentefria *et al.*; 2008; Vaz-Moreira *et al.*, 2012; Castellanos *et al.*, 2014).

Além da *P. aeruginosa* outras espécies também são conhecidas por causar infecções em humanos como a *P. fluorescens*, *P. stutzeri* e *P. putida*. No entanto, informações sobre a resistência a antimicrobianos em outras espécies do gênero *Pseudomonas* são escassas, principalmente para os isolados ambientais (Spindler *et al.*, 2012; Vaz-Moreira *et al.*, 2012).

2.2.1 Resistência a beta-lactâmicos

O gênero *Pseudomonas* é naturalmente resistente a muitos antimicrobianos utilizados em hospitais, além de possuir a capacidade de adquirir resistência a praticamente todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis (Hocquet, 2007).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos compartilham em comum, no seu núcleo estrutural, um anel central conhecido como β -lactâmico, além disso, possuem uma cadeia lateral variável que permite a divisão desta classe. Esta família de antimicrobianos é composta por penicilinas, cefalosporinas (ceftazidima), monobactâmicos, cefamicinas e carbapenêmico (imipenem) (CLSI, 2015). Os β -lactâmicos tem como principal mecanismo de ação, a inibição de enzimas envolvidas na síntese da parede celular bacteriana (Drawz & Bonomo, 2010).

As cefalosporinas são caracterizadas pelo seu amplo espectro de ação no combate a diversas infecções bacterianas. Este grupo é classificado em quatro gerações, cada qual composta por cadeias laterais que se diferem entre si,

conferindo para cada geração diferentes propriedades farmacocinéticas, sendo as cefalosporinas de 4ª geração as de maior espectro de ação (Drawz & Bonomo, 2010). A ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração que possui uma potente ação contra bactérias do gênero *Pseudomonas* e contra algumas *Enterobacteriaceae*. Sua potencia de ação é reduzida contra microorganismos Gram-positivos (Zasowski, 2015).

Os carbapenêmicos desempenham um papel muito importante entre os β -lactâmicos, pois possuem um amplo espectro de atividade e uma maior potência contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, dessa forma são comumente utilizados como tratamento de última escolha (Papp-Wallace, 2011). Este grupo é considerado uma importante opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas pelo gênero *Pseudomonas*, devido a apresentarem uma considerável estabilidade frente a uma ampla variedade de β -lactamases em comparação com outros antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, por isso são considerados fármacos de reserva, frequentemente empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos demais β -lactâmicos. Dentre os antimicrobianos deste grupo encontra-se o Imipenem, Meropenem e Ertapenem (Neves, 2011; Campana, 2013).

O principal mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos no gênero *Pseudomonas* ocorre devido a presença de genes que atuam na degradação enzimática do antimicrobiano pela produção de beta-lactamases, mas a perda ou diminuição da expressão de proteínas da membrana externa e a expressão de bombas de efluxo também são mecanismos de resistência muito importantes no gênero *Pseudomonas* e podem estar envolvidos nesta resistência (Poole, 2004; Drawz & Bonomo, 2010).

2.3 Sistemas de Efluxo em Bactérias

A maioria dos mecanismos de proteção bacteriana contra a entrada indesejada de moléculas prejudiciais à célula é governada por um mecanismo de transporte ativo para o exterior celular, um sistema denominado bomba de efluxo, no qual proteínas de transporte expulsam substâncias tóxicas (Webber & Piddok, 2003; Neves *et al.*, 2011). Esses sistemas são responsáveis pela proteção contra vários

antimicrobianos e desinfetantes na maior parte das espécies bacterianas (Neves *et al.*, 2011).

Os sistemas de efluxo são mecanismos cromossomicamente codificados e amplamente distribuídos em bactérias Gram-negativas (Poole, 2004). Podem ser específicos para um substrato ou por uma série de compostos estruturalmente diferentes (Webber & Piddok, 2003).

De acordo com Webber *et al.* (2003) e Delmar *et al.* (2014), as bombas de efluxo podem ser divididas em cinco famílias distintas, sendo elas: ABC (“ATP binding cassette”), MFS (“major facilitator superfamily”), SMR (“small multidrug resistance”), RND (“resistance-nodulation-division”), MATE (“multidrug and toxic compound extrusion”).

Os sistemas de efluxo são caracteristicamente dependentes de energia, utilizando o transporte ativo primário ou o transporte ativo secundário. O transporte ativo primário é dependente da hidrólise de ATP, a família ABC utiliza este tipo de transporte (Piddok, 2006). No transporte ativo secundário, o gasto de energia é oriundo da força próton motora (Moreira, 2008), um gradiente eletroquímico no qual o movimento de íons conduz o transporte, e as famílias RND, MATE, MFS e SMR participam deste tipo de transporte (Piddok, 2006a).

As famílias de efluxo estão amplamente distribuídas entre as linhagens de bactérias, incluindo as principais espécies patogênicas (Du *et al.*, 2015). Com exceção da família RND, que está presente apenas em bactérias Gram-negativas, os sistemas de efluxo das outras quatro famílias estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sun *et al.*, 2014).

2.3.1 Família ABC

A família de ligação cassete adenosina trifosfato (ABC) representa uma das principais classes de transportadores e são importantes em diversas funções biológicas nas bactérias e nas células eucarióticas. Em bactérias, estes transportadores são importantes fatores de virulência, pois desempenham um significativo papel na absorção de nutrientes, e na expulsão de substâncias tóxicas e de agentes antimicrobianos da célula bacteriana (Davidson & Chen, 2004), a partir da hidrólise direta de ATP que fornece a energia necessária para este transporte (Moodley *et al.*, 2015).

Alguns sistemas de efluxo da família ABC já foram identificados e implicados na resistência bacteriana a muitos antimicrobianos de uso clínico. O LmrA de *Lactococcus lactis* foi o primeiro sistema ABC relacionado à diminuição da sensibilidade a diversos antimicrobianos como macrolídeos, aminoglicosídeos, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclínas, estreptograminas e lisaminas (Poelarends *et al.*, 2002; Lubelski *et al.*, 2007). Neste sistema de efluxo, ainda estão incluídos outros transportadores como o MsrA que está relacionado a resistência do *Staphylococcus epidermidis* à eritromicina, o HorA presente em *Lactobacillus brevis* envolvido no efluxo e resistência à novabiocina (Lage, 2003).

2.3.2 Família MATE

A família de extrusão de multidroga e compostos tóxicos (MATE) é a descoberta mais recente das bombas de efluxo, identificada pela primeira vez em bactérias, onde contribui na resistência aos antimicrobianos (Wong *et al.*, 2014). Este sistema de efluxo foi classificado primeiramente como membro da superfamília MSF devido à presença de 12 segmentos transmembranares. Entretanto, logo foi identificado como um tipo diferente de transportador devido à diferença na sequência de aminoácidos (Omote *et al.*, 2006; Kumar & Schweizer, 2005).

As bombas de efluxo MATE dependem de um sistema de transporte antiporte (prótons H⁺) que acopla cátions sódio (Na⁺) (Ogawa *et al.*, 2015) através da membrana para o transporte de drogas, corantes catiônicos, etídio e outros (Kuroda & Tsuchiya, 2009).

O transportador NorM de *Vibrio parahaemolyticus* contribuiu para a caracterização da família, sendo o primeiro transportador MATE descoberto e que confere resistência a norfloxacin e aos aminoglicosídeos (Kuroda & Tsuchiya, 2009). Outros exemplos de bombas de efluxo pertencentes à família MATE foram descritas na literatura: YdhE de *Escherichia coli*, PmpM de *P. aeruginosa* e MepA de *Staphylococcus aureus*, entre outras (Kuroda & Tsuchiya, 2009; Omote *et al.*, 2006).

2.3.3 Família MFS

A super família dos facilitadores principais (MFS) é uma das mais antigas, grandes e diversificadas superfamílias de efluxo, possuindo mais de mil membros

sequenciados. Além disso, a maioria desses transportadores é substrato específico e possuem 12 ou 14 segmentos transmembranares (Marquez, 2005).

Encontrada em eucariotos e procariotos, a família MFS pode utilizar os mecanismos uniporte, simporte soluto/cátion (H^+ ou Na^+), o antiporte soluto/ H^+ ou o antiporte soluto/soluto para o transporte de açúcares, metabólitos, ânions, drogas e aminoácidos (Kumar & Schweizer, 2005; Madej & Kaback, 2013). Nas bactérias, esta família de transportadores é a principal responsável pela absorção de nutrientes, embora alguns atuem como bombas de efluxo de drogas conferindo resistência aos antimicrobianos (Saunders, 2003).

Desde a sua descoberta inicial, os transportadores MFS tornaram-se uma área de intensiva investigação devido à capacidade de conferir resistência a múltiplas drogas (Kumar *et al.*, 2013). A presença de bombas de efluxo da família MFS é clinicamente relevante, principalmente em bactérias Gram-positivas como, por exemplo, NorA em *S.aureus*, uma bactéria que causa doenças de pele e que com a expressão dessa bomba confere resistência ao cloranfenicol e as fluoroquinolonas (Piddock, 2006). Outros sistemas de efluxo MFS, também envolvidos na extrusão de antimicrobianos são: a Bmr e Blt de *Bacillus subtilis*, MdfA e EmrD de *Escherichia coli*, KmrA de *Klebsiella pneumonia* (Shaheen *et al.*, 2015).

2.3.4 Família SMR

As proteínas da família de baixa resistência multidrogas (SMR) são relativamente pequenas quando comparadas a outras famílias de bomba de efluxo. As subunidades deste sistema são compostas de 110 a 150 aminoácidos e possuem apenas quatro segmentos transmembrana (Bay *et al.*, 2008).

Semelhante a família de transportadores MFS, a SMR também demonstrou um transporte de efluxo próton-dependente através de um gradiente eletroquímico pelo mecanismo antiporte (Bay *et al.*, 2008). Ao contrário de outras famílias de transportadores, a SMR transporta apenas compostos lipofílicos, como compostos quaternários de amônio e também antimicrobianos, antissépticos e detergentes (Bay *et al.*, 2008; Bay & Turner, 2009).

Os transportadores SMR são encontradas em muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas o transportador EmrE de *E. coli* tem sido o mais estudado e caracterizado, representando um modelo para a SMR (Wong *et al.*,

2013). Outros exemplos bem estudados de bombas de efluxo desta família incluem EbrAB de *B. subtilis*, SsmE de *Serratia marcescens* e Smr de *S. aureus*, que estão envolvidos na resistência a uma variedade de antimicrobianos e compostos quaternários (Bay *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2009).

2.3.5 Família RDN

O efluxo da família RND é acionado através da força próton motriz, um gradiente eletroquímico em que o movimento de íons de hidrogênio conduz o transporte do substrato. Transportadores de efluxo da superfamília de resistência-nodulação-divisão podem causar sérios problemas na quimioterapia do câncer e no tratamento de infecções (Pidcock, 2006b).

Em bactérias Gram-negativas, os transportadores desta família são particularmente eficazes na geração de resistência a antimicrobianos, devido a formação de um sistema dividido em três partes (FIGURA 1):

- a) proteína transportadora inserida na membrana citoplasmática e que desempenha o papel de bomba – mexB, mexD, mexF e mexY;
- b) proteína de fusão localizada no espaço periplasmático que une as outras duas proteínas, ou seja, a bomba e o canal de extrusão – mexA, mexC, mexE e mexX;
- c) as proteínas de membrana externa ou porinas, que formam o canal de extrusão – OprJ, OprM e OprN (Horiyama & Nishino, 2014).

Cada um destes três transportadores é essencial para o efluxo das substâncias e a ausência de um único componente acarreta na inativação total do complexo tripartite (Nikaido & Takatsuka, 2009)

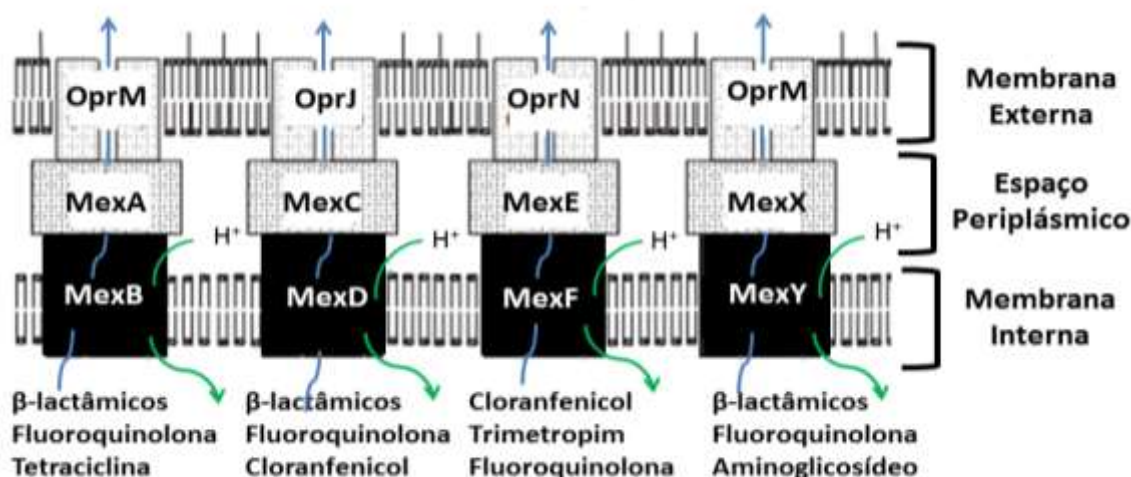


FIGURA 1: Modelo representativo dos sistemas de efluxo da família RND presentes em *Pseudomonas aeruginosa*, indicando a posição das proteínas que compõe a bomba.

Fonte: Adaptação de Aeschlimann, 2003.

2.4 Sistemas de Efluxo em *Pseudomonas*

A resistência intrínseca aos antimicrobianos pelo gênero *Pseudomonas* é relacionada em parte a sua baixa permeabilidade da membrana e a presença de sistemas de efluxo (Avrain *et al.*, 2013). A partir do sequenciamento do genoma da *P. aeruginosa* foram identificados doze sistemas de efluxo da família RND denominados *mex*, do inglês “multidrug efflux pump”, dos quais, dez já estão caracterizados: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexGHI-OpmD, MexVW-OprM, MexPQ-OpmE, MexMN, e TriABC (Aeschlimann, 2003; Xavier, 2008; Avrain *et al.*, 2013). Estes sistemas são denominados como MDR (*Multi-drug Resistance*), pois são capazes de conferir resistência a uma ampla variedade de quimioterápicos (Kriengkauykiat, *et al.*, 2005; Piddock, 2006).

Entre os sistemas de efluxo da família RND caracterizados em *Pseudomonas*, o MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM são os mais relacionados à resistência intrínseca e adquirida à uma ampla diversidade de drogas de importância clínica (Kriengkauykiat *et al.*, 2005; Mesaros *et al.*, 2007).

Cada bomba possui afinidade a um determinado grupo de antimicrobianos (TABELA 1), mas algumas drogas são substratos universais para determinados tipos, como por exemplo, as fluoroquinolonas para as bombas *mex* e

essa exposição tem contribuído para seleção de mutantes de *P.aeruginosa* com o fenótipo multirresistente a múltiplas drogas (MDR) através da superexpressão de bombas de efluxo (Kriengkauykiat *et al.*, 2005).

TABELA 1- Substratos antimicrobianos para diferentes bombas de efluxo presentes em isolados do gênero *Pseudomonas*.

| MexAB-OprM | MexXY-OprM | MexCD-OprJ | MexEF- OprN |
|---------------------|----------------|----------------|------------------|
| Aztreozan | Amicacina | Cefepima | Ciprofloxacina |
| Carbenicilina | Cefepima | Cefuroxima | Cloranfenicol |
| Cefotaxima | Cefotaxima | Cloranfenicol | Clavulanato |
| CEFTAZIDIMA* | Eritromicina | Ciprofloxacina | IMIPENEM* |
| Cefuroxima | Ciprofloxacina | Eritromicina | Norfloxacina |
| Cloranfenicol | Gentamicina | Levofloxacina | Levofloxacina |
| Ciprofloxacina | Tetraciclina | Nafcilina | Sulbactram |
| Clavulanato | Levofloxacina | Norfloxacina | Trimetoprima |
| Faropenem | | Tetraciclina | |
| Levofloxacina | | | |
| Meropenem | | | |
| Nafcilina | | | |
| Norfloxacina | | | |
| Piperacilina | | | |
| Sulbactram | | | |
| Tetraciclina | | | |
| Trimetoprima | | | |

* Ceftazidima e Imipenem são os antimicrobianos utilizados no presente estudo.
Fonte: Adaptação de Aeschlimann, 2003.

O sistema MexAB-OprM é um dos sistemas de maior relevância clínica em *Pseudomonas aeruginosa* devido a sua grande prevalência em isolados de amostras clínicas e por contribuir para a resistência intrínseca e adquirida a diversos antimicrobianos (Masuda *et al.*, 2000). Este sistema possui a capacidade de expulsar várias classes de antibióticos não relacionados, mais especificamente, transporta fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclinas, trimetoprim, sulfamidas, cloranfenicol e a maioria dos β -lactâmicos. (Avrain *et al.*, 2013). É importante ressaltar que o sistema MexAB-OprM transporta a classe dos β -lactâmicos que não é um substrato comum em bombas de efluxo, exceto o imipenem que não é transportado devido a diferenças em sua estrutura molecular (Xavier, 2008).

A expressão deste sistema é regulada pela inserção da proteína MexR na região entre os genes *mexR* e *mexA* (região promotora do operon MexAB-OprM).

Essa inserção permite a auto regulação do sistema, atuando como repressora do MexAB-OprM (Masuda et al., 2000).

A bomba MexCD-OprJ não contribui para resistência intrínseca aos antimicrobianos, fazendo com que se diferencie dos outros sistemas de efluxo identificados no gênero *Pseudomonas*. No entanto, a mutação no gene *nfxB* cujo produto reprime esse sistema de efluxo leva a um aumento considerável da produção de MexCD-OprJ e conseqüentemente a resistência de antimicrobianos como alguns β -lactâmicos, fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina, sulfametoxazol e cloranfenicol (Jeannot et al. 2008). Estudos tem demonstrado que mutantes que não possuem a região MexAB-OprM e expressam o sistema MexCD-OprJ estão relacionados à extrusão de ceftazidima e cefoperazona (Masuda, et al., 2000).

O sistema MexEF-OprN é regulado pelo gene *mexT*, que por sua vez regula negativamente a porina OprD, causando uma diminuição na sua expressão, o que gera um aumento na resistência ao imipenem (Llanes et al., 2011). A porina OprD é a principal via de entrada do imipenem em *P. aeruginosa*, cuja ausência de expressão é frequentemente observada em cepas resistentes a este antimicrobiano (Fetar et al., 2011). Além disso, esse sistema de efluxo pode reduzir a expressão das bombas MexAB-OprM e MexXY-OprM, pois parece exercer uma atividade corregulatória sobre elas (Maseda et al., 2000; Llanes et al., 2011).

O MexXY-OprM é um intrigante sistema de efluxo de múltiplas drogas, pois apesar de transportar um número bem menor de substratos comparado ao sistema MexAB-OprM, ele pode remover muitas substâncias antipseudomonas clinicamente úteis como aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina (Aeschlimann, 2003; Avrain et al., 2013).

2.5 Inibidores de Sistemas de Efluxo

Com a caracterização dos sistemas de efluxo e a identificação da sua importância na resistência bacteriana a antimicrobianos de uso clínico, surgiu o interesse em compostos que atuam como inibidores destes sistemas. É possível avaliar fenotipicamente a expressão das bombas de efluxo através de compostos que agem inibindo as suas funcionalidades (Askoura et al., 2011).

As substâncias inibidoras utilizam mecanismos diferentes para atuar sobre a funcionalidade dos sistemas, como:

- inibição da ligação da droga com a própria bomba de efluxo;
- inibição da interação entre componentes que formam o sistema de efluxo;
- restrição da fonte de energia;
- inibição da expressão gênica dos sistemas de efluxo

Dentre as substâncias mais utilizadas estão a *phenylalanine arginyl beta-naphthylamide* (PaβN) e *carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* (CCCP).

A PaβN foi o primeiro a ser identificado e caracterizado como inibidor dos quatro sistemas de efluxo presentes em *Pseudomonas* sp., o MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (Sun, 2014). O principal mecanismo de atuação deste sistema é através da inibição competitiva, em que a bomba de efluxo reconhece a PaβN como substrato ao invés do antimicrobiano alvo. Dessa forma, o inibidor compete com o antimicrobiano pelo sítio de ligação da bomba sendo expulso para fora das células e, conseqüentemente, aumenta a concentração do antimicrobiano no interior da célula (Askoura *et al.*, 2011).

O principal mecanismo pelo qual o CCCP atua como inibidor de sistemas de efluxo é a dissipação do gradiente de prótons através da membrana interna (Dreier.& Ruggeron, 2015). O CCCP é conhecido não só como um inibidor da força próton motiva, mas como inibidor das bombas de efluxo da família RND, podendo ser adicionado em ágar Muller-Hinton durante a sua preparação, sendo assim este inibidor tem sido utilizado em estudos fenotípicos de bombas de efluxo (Adabi *et al.*, 2015). Estudos tem demonstrado que este inibidor está relacionado com a inibição das bombas de efluxo das famílias MATE, RND e SMR (Zhang, 2010).

O CCCP tem sido utilizado em laboratório por abolir totalmente o efluxo de diversos tipos de moléculas, no entanto, sua elevada toxicidade o torna inviável para o uso terapêutico (Mahamoud, 2007).

Assim, a inibição das bombas de efluxo por estas moléculas descritas acima é promissora no sentido de aumentar a concentração intracelular de droga, restabelecer a atividade da droga contra as bactérias resistentes, e reduzir ainda mais o desenvolvimento de bactérias resistentes (Askoura *et al.*, 2011).

2.6 Microorganismos Resistentes no Ambiente Aquático

A dispersão e a evolução de microorganismos resistentes a antimicrobianos têm sido muito relacionadas a ambientes aquáticos. A água constitui não somente um ambiente de disseminação de bactérias resistentes entre populações de humanos e de animais, mas também uma via na qual os genes de resistência são introduzidos nos ecossistemas naturais (Baquero, 2008).

A introdução e o progressivo acúmulo de antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos da poluição industrial têm favorecido a dispersão e aumento da resistência destes microorganismos no ambiente aquático (Baquero *et al.*, 2008). Pesquisas conduzidas em vários países têm detectado tanto a presença de microorganismos resistentes como concentrações de antimicrobianos em micrograma por litro ou nanograma por litro variando em diferentes ambientes aquáticos, tais como, efluente hospitalar, esgoto municipal, estações de tratamento de esgoto, águas superficiais, lagos, oceanos e água potável (Kümmerer, 2003; Baquero *et al.*, 2008;).

Diante desses fatos percebe-se que a presença destas drogas no meio ambiente contribui para a seleção de mecanismos de resistência aos antimicrobianos no meio ambiente (Kümmerer, 2004; Baquero *et al.*, 2008).

Estudos mostram que mais de 90% dos isolados bacterianos originados da água do mar são resistentes a pelo menos um antibiótico e 20% são resistentes a pelo menos cinco (Baquero, 2008). A condução de uma pesquisa em águas de rio nos Estados Unidos apresentou um alto nível de resistência em todos os rios testados e entre os gêneros identificados estavam *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Proteus* (Ash *et al.*, 2002). No Rio de Janeiro, um estudo do esgoto hospitalar identificou uma ampla variedade de gêneros bacterianos e todos os isolados foram considerados multirresistentes (Chagas *et al.*, 2011).

Além de microorganismos resistentes em águas residuais, esgotos e efluentes hospitalares, outro problema é a alta concentração de antimicrobianos encontrada nestas águas. Em rios japoneses, um elevado número de antimicrobianos pode ser encontrado como sulfonamidas, trimetoprim, e macrolídeos (Baquero *et al.*, 2008). Outro estudo, detectou concentrações de 0,7 a 124,5 g/L

ciprofloxacina e concentrações compreendidas entre 20 e 80 g/L de Ampicilina no efluente de um grande hospital na Alemanha (Kümmerer, 2003).

Considerando a falta de dados nacionais sobre a contribuição de sistemas de bombas de efluxo para a resistência do gênero *Pseudomonas* em isolados de efluente hospitalar, realizamos tanto a pesquisa da presença de genes associados a este mecanismo de resistência quanto a análise fenotípica da para estudar a presença de bombas de efluxo em isolados ambientais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular 222F, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Meios de Cultura e Soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados na prática desta dissertação estão descritos nos anexos.

3.2 Isolados Bacterianos

Foram selecionadas 159 cepas de *Pseudomonas* sp., previamente coletadas e identificadas, que foram obtidas de efluentes hospitalares de Porto Alegre e de Passo Fundo (Fuentefria et al., 2015 e Spindler et al., 2012). Destas cepas que estavam armazenadas em ágar conservação, apenas 60 foram recuperadas, sendo 32 isolados de *Pseudomonas* sp. e 28 de *Pseudomonas aeruginosa*.

As 28 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram identificadas em um estudo prévio através de provas bioquímicas e da amplificação do gene 16S rRNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Fuentefria et al., 2011). As outras 32 cepas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* através de provas bioquímicas e da amplificação do gene 16S rRNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Spindler et al., 2012) mas ainda não tiveram as espécies identificadas.

3.3 Recuperação dos Isolados

Os isolados encontravam-se estocados em Ágar conservação e mantidos a temperatura ambiente. A partir do ágar conservação as amostras foram semeadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), e cultivadas por 48h em estufa a 37°C. A seguir,

foram semeadas em Ágar Cetrimide por 48h em estufa a 37° e, os isolados que tiveram crescimento foram semeados em Ágar Triptona de Soja (TSA) para obtenção de colônias isoladas, o cultivo foi realizado em estufa a 37°C por 24h. A pureza dos isolados foi verificada por coloração de Gram.

3.4 Concentração Inibitória Mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo e foram utilizados dois antimicrobianos β -lactâmicos, um classificado como carbapenêmico, o imipenem (IMP) e o outro como cefalosporina, a ceftazidima (CAZ), seguindo a determinação do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Para o preparo do inóculo, os isolados foram semeados em placas de TSA, e mantidos em estufa a 37°C durante 24 horas. As colônias isoladas foram suspendidas em solução salina a 0,9% seguindo a escala MacFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) para ajuste da turvação. Essa suspensão bacteriana foi novamente diluída em solução salina a 0,9% em uma proporção de 1:10 (10^7 UFC/mL). Após a preparação do inóculo, foi realizada a diluição seriada do antimicrobiano em caldo Müeller Hilton nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 μ g/mL (CLSI, 2015). Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 100 μ L das diluições do antimicrobiano em cada poço e 5 μ L do inóculo diluído na proporção 1:10, obtendo-se uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Em todos os testes foi utilizado um controle negativo em que foram pipetados 100 μ L do caldo Müeller Hilton sem o antimicrobiano e sem inóculo para observar a esterilidade do meio de cultura e um controle positivo, com caldo sem antimicrobiano em que o inóculo foi semeado para observar o crescimento bacteriano e controle das diluições do antimicrobiano, no qual uma cepa sensível de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 era semeada.

A CIM foi estabelecida como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. Foram considerados resistentes à CAZ os isolados que apresentaram CIM ≥ 32 μ g/mL e para o IMP ≥ 8 μ g/mL (CLSI, 2015).

3.5 Sistema de efluxo dependente da força próton motiva

Para detecção de mecanismos de bomba de efluxo dependentes de força próton-motora foram realizados testes de inibição por microdiluição na presença e ausência de um desacoplador da força próton motiva, carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP), que diminui a energia disponível ao transporte, ou seja, ele inibe a ação das bombas de efluxo.

Foram realizados testes com diversas concentrações de CCCP, para cada isolado e, a concentração escolhida, foi a maior que mantinha o crescimento microbiano. Este teste foi realizado em caldo Mueller Hilton no volume final do poço de 105µl, com 10⁵ UFC/mL da cultura bacteriana, 10µM de CCCP e antimicrobiano na concentração determinada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015).

A redução da CIM de no mínimo duas vezes, em presença do desacoplador, indica resultado positivo para bombas de efluxo (Moreira *et al.*, 2005).

3.6 PCR para Detecção dos Genes de Bombas de Efluxo

3.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo descrito por Misbah *et al.* (2005), com modificações. Os isolados foram cultivados em placas contendo TSA a 37°C por 24h. Após a incubação, foram selecionadas de duas a três colônias que foram suspendidas em microtubos contendo 100µL de água MiliQ e fervidas por dez minutos. Após a fervura, as amostras foram centrifugados a 1200 g por dez minutos, resultando num sobrenadante contendo o DNA bacteriano que foi separado e armazenado a -20°C para amplificação posterior dos genes.

3.6.2 Amplificação dos genes de Bomba de Efluxo

Para a identificação da presença de bombas de efluxo foi realizado a amplificação dos genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY* a partir da técnica de PCR. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão determinadas utilizando o programa *Gene Fischer Interactive Primer Design*, de acordo com as

sequências do gene de estudo, depositadas e publicadas na rede mundial de computadores no *GeneBank* e são apresentados na Tabela 2 (Xavier, 2008).

TABELA 2- Oligonucleotídeos Iniciadores utilizados para amplificação dos genes de bomba de efluxo.

| Genes | Primers | Sequência 5'- 3' | Tamanho do fragmento (pb) |
|--------------|----------------|-------------------------|----------------------------------|
| mexB | mexB-F | GTGTTCCGGCTCGCAGTACTC | 244 |
| | mexB-R | AACCGTCGGGATTGACCTTG | |
| mexD | mexD-F | CGAGCGCTATTCGCTGC | 165 |
| | mexD-R | GGCAGTTGCACGTCGA | |
| mexF | mexF-F | CGCCTGGTCACC GAGGAAGAGT | 255 |
| | mexF-R | TAGTCCATGGCT TGCGGGAAGC | |
| mexY | mexY- F | CCGCTACAACGGCTATCCCT | 250 |
| | mexY- R | AGCGGGATCGACCAGCTTTC | |

As reações de amplificação foram realizadas em misturas contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM de dNTP's, 1µM de cada oligonucleotídeo, 1U Taq DNA-Polimerase, 1X de tampão de reação Taq DNA-polimerase e 2µL de DNA bacteriano em um volume final de 25µL. O equipamento utilizado foi o termociclador *Mastercycler personal* nas seguintes condições para os genes *mexB* e *mexD*: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto e, ao final dos 35 ciclos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Para os genes *mex F* e *mex Y*, as condições de ciclagem foram mantidas com exceção da temperatura de anelamento que ocorreu a 60°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, a corrida ocorreu em tampão TAE 1x, a 80mV, por aproximadamente uma hora e visualizados em luz ultravioleta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de Resistência das Cepas Estudadas a Ceftazidima e ao Imipenem

Os 60 isolados apresentaram um perfil de resistência de 63,3% para ceftazidima (38/60) e 55% para o imipenem (33/60) de acordo com o resultado da análise de concentração inibitória mínima (CIM) realizada. No grupo *Pseudomonas aeruginosa* 85,7% dos isolados apresentou resistência para ceftazidima e 92,9% para o imipenem, sendo assim os isolados foram tão resistentes para Ceftazidima como para o imipenem. Entre os isolados de *Pseudomonas* sp. 46,9% apresentaram resistência a ceftazidima e 21,9% para o Imipenem, demonstrando que a resistência a ceftazidima foi superior a do imipenem (TABELA 3). Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* mostraram-se mais resistentes aos antimicrobianos testados do que o grupo de *Pseudomonas* sp.

Ao compararmos a resistência dos isolados aos dois antimicrobianos (ceftazidima e Imipenem) testados, verificamos que os isolados do grupo de *Pseudomonas aeruginosa* foram mais resistentes aos dois antimicrobianos (82,14%) do que os isolados do grupo de *Pseudomonas* sp. (18,75%).

TABELA 3- Resistência a Ceftazidima e Imipenem dos isolados de *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* de efluentes hospitalares.

| Antimicrobianos | <i>Pseudomonas</i> sp. (n= 32) | | <i>P. aeruginosa</i> (n=28) | |
|-----------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| | Isolados Resistentes | Percentual (%) | Isolados Resistentes | Percentual (%) |
| Ceftazidima | 15 | 46,9% | 24 | 85,7% |
| Imipenem | 7 | 21,9% | 26 | 92,9% |
| Ceftazidima +Imipenem | 6 | 18,75% | 23 | 82,14% |

Ceftazidima +Imipenem: isolados que foram resistentes aos dois antimicrobianos.

4.2- Avaliação Fenotípica das Bombas de Efluxo

A determinação fenotípica da expressão dos sistemas de efluxo foi realizada através da comparação das CIMs dos antibióticos (ceftazidima e imipenem), na ausência e na presença do inibidor de bomba. O teste na presença do CCCP foi realizado apenas nos isolados que apresentaram resistência ao antimicrobiano testado sendo considerados positivos para esta avaliação aqueles que apresentaram redução na CIM de no mínimo duas vezes na presença da substância inibidora (Moreira *et al.*, 2005). (TABELA 4).

TABELA 4- Concentração Inibitória Mínima de isolados de *Pseudomonas* sp e *Pseudomonas aeruginosa* na ausência e presença de CCCP.

| ISOLADOS | | CIM (µg/mL) | | | | ISOLADOS | | CIM (µg/mL) | | | |
|---------------------------|------|-------------|--------------|------|--------------|---|------|-------------|--------------|------|--------------|
| | | IMP | IMP+ CCCP | CAZ | CAZ+ CCCP | | | IMP | IMP+ CCCP | CAZ | CAZ+ CCCP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | 139L | <1 | ** | >512 | 512 | <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> | F5 | <1 | ** | <1 | ** |
| | L19 | 64 | <1 | 64 | 64 | | F22 | 128 | 8 | 256 | 256 |
| | L20 | 32 | 32 | 512 | 128 | | F28 | 64 | 16 | 16 | ** |
| | L25 | 256 | 2 | 128 | 64 | | F35 | 32 | 16 | 16 | ** |
| | L27 | 32 | 16 | 128 | 64 | | H12B | >512 | 256 | >512 | >512 |
| | L36 | <1 | ** | 256 | 256 | | L10 | >512 | >512 | >512 | 512 |
| | L39 | <1 | ** | 512 | 64 | | L11 | >512 | 512 | >512 | >512 |
| | M36 | 1 | ** | 256 | 256 | | L12 | 512 | 512 | >512 | >512 |
| | 55L | 1 | ** | 128 | <1 | | L13 | 4 | ** | 8 | ** |
| | 116L | 1 | ** | 128 | 128 | | L14 | 512 | 256 | 512 | 256 |
| | M12 | <1 | ** | 8 | ** | | L17B | >512 | >512 | >512 | >512 |
| | 93L | 512 | 16 | 256 | 256 | | L21 | >512 | 256 | >512 | >512 |
| | 3L | <1 | ** | >512 | 256 | | L50 | >512 | 128 | >512 | >512 |
| | 30L | <1 | ** | 8 | ** | | L25 | >512 | 512 | >512 | >512 |
| | L40 | 64 | 8 | 512 | 128 | | L12 | 512 | 256 | >512 | >512 |
| | 52L | <1 | ** | 256 | 64 | | L17 | >512 | 512 | >512 | 512 |
| | L62 | <1 | ** | 256 | 128 | | M13 | >512 | 512 | 256 | 256 |
| | 1L | <1 | ** | <1 | ** | | M20 | 16 | 8 | 512 | >512 |
| | 4L | <1 | ** | <1 | ** | | M20A | 512 | 512 | 512 | 512 |
| | 25L | <1 | ** | <1 | ** | | M23 | 16 | 16 | 512 | 512 |
| | 29L | 1 | ** | 1 | ** | | M12 | >512 | 256 | >512 | >512 |
| | 33L | <1 | ** | <1 | ** | | N4 | >512 | 512 | >512 | >512 |
| | 38L | 4 | ** | 8 | ** | | N5 | >512 | 512 | >512 | >512 |
| | 54L | <1 | ** | 4 | ** | | N7 | >512 | 512 | >512 | >512 |
| | 57L | 8 | 8 | 8 | ** | | N18 | 512 | 256 | >512 | >512 |
| | 118L | <1 | ** | 4 | ** | | N6 | >512 | >512 | >512 | >512 |
| | 136L | <1 | ** | <1 | ** | | N8 | >512 | 512 | >512 | >512 |
| | A10 | 2 | ** | <1 | ** | | N17 | >512 | 512 | 512 | 256 |
| L59 | <1 | ** | <1 | ** | | | | | | | |
| M14 | <1 | ** | <1 | ** | | | | | | | |
| N31 | <1 | ** | <1 | ** | | | | | | | |
| P99 | <1 | ** | <1 | ** | | | | | | | |

CIM: concentração inibitória mínima; IMP: imipenem; CAZ: Ceftazidima; CCCP: carbonil cianida m-clorofenilhidrazona. Asteriscos (**) indicam que o isolado não foi testado com CCCP, pois já eram sensíveis ao antimicrobiano.

Para os isolados estudados, foi necessário conhecer a concentração de CCCP que não modificasse o crescimento bacteriano, mas que influenciasse o gradiente de prótons. Então, utilizou-se nos experimentos a maior concentração do desacoplador que manteve o crescimento microbiano, a concentração de CCCP

utilizada foi de 10 μ M. O inibidor de bomba de efluxo foi testado apenas nos isolados que apresentaram a CIM ≥ 32 μ g/mL para ceftazidima e ≥ 8 μ g/mL para o imipenem (CLSI, 2015).

A concentração inibitória mínima do imipenem na presença e na ausência do CCCP foi testada nos 33 isolados resistentes a este antimicrobiano e variou de >512 μ g/mL a <1 μ g/mL. Em *Pseudomonas* sp. apenas 7 dos 32 isolados foram testados com CCCP e observou-se a diminuição da CIM em L19, L25, 93L, L40, representando 57% dos isolados testados. Nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* 26 dos 28 isolados foram testados com CCCP e a redução da CIM na presença no inibidor foi identificada em F22, F28, H12B, L21, L50, M13 representando 23% dos isolados testados. Essa redução na CIM sugere que o mecanismo de resistência destes isolados para o imipenem seja dependente de energia oriunda de força próton motiva.

A concentração inibitória mínima da ceftazidima na presença e na ausência do CCCP foi testada nos 39 isolados resistentes a este antimicrobiano e variou de >512 μ g/mL a <1 μ g/mL. Em *Pseudomonas* sp. 15 entre os 32 isolados foram testados com CCCP e observou-se a diminuição da CIM em L20, L39, 55L, 3L, L40, 52L, representando 40% dos Isolados testados. No grupo de *Pseudomonas aeruginosa* 24 entre os 28 isolados foram testados e não houve alteração no perfil de resistência na presença do CCCP.

A utilização do desacoplador provocou a redução da resistência bacteriana para alguns isolados testados, indicando que as bombas de efluxo foram responsáveis pela resistência ao IMP tanto no grupo de *Pseudomonas aeruginosa* quanto para *Pseudomonas* sp. A resistência a CAZ causada pelas bombas de efluxo parece estar presente somente nos isolados de *Pseudomonas* sp. Estes resultados revelam que este tipo de mecanismo de resistência foi mais frequente entre os isolados do grupo *Pseudomonas* sp

Para Moreira *et al.* (2008) a redução da CIM após a adição de CCCP é indicativo na presença de um sistema de efluxo multidrogas. Porém, relatam que um fenótipo de multirresistência nem sempre é devido a um único sistema de efluxo, mas a vários sistemas de efluxo droga específica, num sistema global de regulação.

Diferentemente do IMP, quando os isolados de *P.aeruginosa* foram tratados com a CAZ na presença do inibidor , não houve alteração no perfil de

resistência. Askoura *et al.* (2011) descreve que Pa β N é o principal inibidor da bomba MexAB-OprM em *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com Sun (2014) Pa β N foi caracterizado como inibidor dos quatro sistemas de efluxo presentes em *Pseudomonas* sp., o MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM. A utilização de um marcador mais específico para as bombas de efluxo estudadas pode gerar resultados diferentes.

No presente estudo o fato da concentração inibitória mínima da CAZ não ter reduzido na presença do CCCP pode ser uma relação semelhante ao mecanismo citado por Van Bambeke *et al.* (2010) e Avrain *et al.* (2013) em que o efeito do CCCP pode ter sido mascarado por outros mecanismos de resistência, causando resultados falso-negativos. Por outro lado, também podemos sugerir a falta de expressão de bomba de efluxo, alteração genética ou o inibidor não específico para o gênero *Pseudomonas*.

4.3 Avaliação da Presença de Genes de Sistemas de Bomba Efluxo

Os isolados foram analisados quanto a presença de genes para sistemas de bombas de efluxo *mexB* (bomba de efluxo MexAB-OprM), *mexY* (bomba MexEF-OprN), *mexD* (bomba de efluxo MexCD-OprJ) , *mexF* (bomba de efluxo MexEF-OprN). O resultado de alguns isolados quanto a amplificação do gene *mexF* pode ser observado na FIGURA 2.

Em um total de 60 isolados analisadas quanto a presença dos genes *mex*, em 88% houve amplificação do gene *mexB*, em 95% amplificação do *mexY*, 48% do *mexD* e 88% do *mexF*. Os resultados desta análise pode ser verificados na Tabela 5. Assim, pode-se supor que 95% seja capaz de expressar o sistema MexXY-OprM, 88% o sistema MexAB-OprM, 88% o sistema MexEF-OprN , e 48% o sistema MexCD-OprJ .

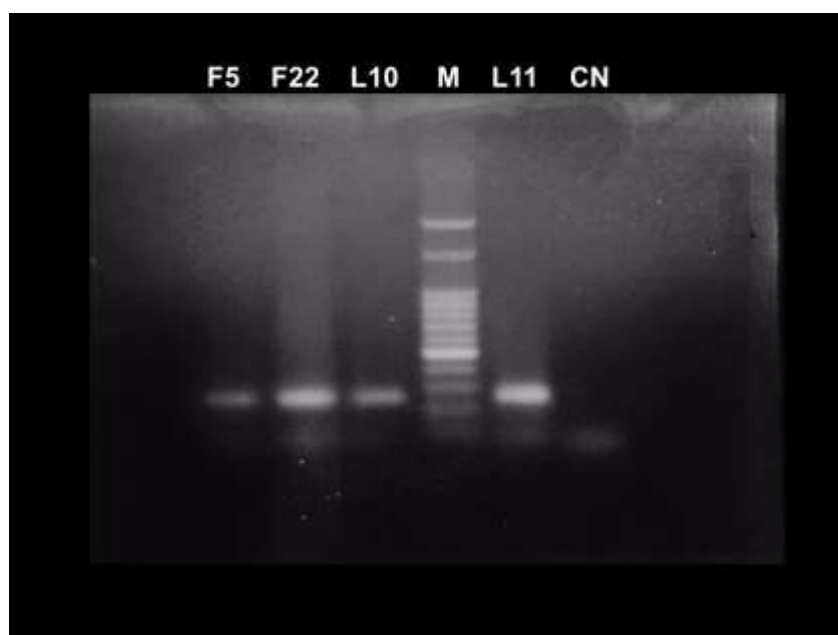


FIGURA 2: Produtos de PCR obtidos através da amplificação de um fragmento do gene *mexF*.(255pb) nos isolados F5, F22, L10, L11 de *Pseudomonas aeruginosa*. M: Marcador (100 pb); CN: Controle Negativo.

TABELA 5 - Distribuição Percentual (%) dos genes de bomba de efluxo em 60 isolados de *Pseudomonas sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*.

| Isolados Positivos / Isolados Investigados (%) | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Isolados | <i>mexB</i> | <i>mexY</i> | <i>mexD</i> | <i>mexF</i> |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 26/32 (81%) | 31/32 (97%) | 9/32 (28%) | 28/32 (88%) |
| <i>P. aeruginosa</i> | 27/28 (96%) | 26/28 (93%) | 20/28 (71%) | 25/28 (89%) |
| Total | 53/60 (88%) | 57/60 (95%) | 29/60 (48%) | 53/60 (88%) |

O gene *mexB* teve uma alta incidência (53/60 – 88%) nos isolados investigados, igualando-se ao relato de alta incidência deste gene em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. É possível que este sistema de efluxo seja característico de isolados desta origem (Neves, 2010). Para Xavier et al. (2011), a resistência aos

β -lactâmicos em *P. aeruginosa* parece ter uma relação positiva com a expressão do sistema de efluxo MexAB-OprM, já que a frequência de isolados que hiperexpressavam esse sistema é maior entre aquelas amostras que mostraram-se resistentes aos β -lactâmicos.

Masuda *et al.* (2000) descreveram a bomba de efluxo MexAB-OprM como o sistema de maior relevância entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* devido a sua alta prevalência em amostras clínicas. Entre os resultados obtidos no grupo de *P. aeruginosa*, o sistema MexAB-OprM foi o mais frequente no grupo (96%), o que pode estar associado aos dados de Masuda *et al.* (2000), pois muitas das bactérias de origem clínica acabam sendo transferidas para o meio ambiente através dos efluentes hospitalares.

O gene *mexY* codificador da bomba de efluxo MexXY-OprM teve uma incidência maior nos isolados de efluente hospitalar deste estudo, pois 95% (57/60) dos isolados tiveram amplificação para este gene. Este resultado contrapõe o resultado de Xavier *et al.* (2011) que não obteve expressão deste sistema de efluxo em isolados clínicos estudados.

O gene *mexD*, codificador do sistema MexCD-OprJ, teve uma baixa incidência (48% - 29/60) nos isolados deste estudo, sendo que em *P. aeruginosa* a percentagem de isolados foi 71%. Em estudo realizado por Xavier (2011), que analisou a expressão de genes de efluxo, o sistema MexCD-OprJ foi o que menos apresentou significância em sua expressão.

O gene *mexF*, codificador do sistema MexEF-OprN, também apresentou uma alta incidência quanto a sua presença nos isolados estudados, caracterizando 88% (53-60). Estes resultados estão de acordo com Neves (2011) onde 82% dos isolados clínicos apresentaram amplificação para este gene.

Ao analisarmos a Tabela 5 a partir dos grupos de *Pseudomonas* sp. e *P. aeruginosa*, podemos observar ainda que no grupo de *Pseudomonas* sp. obtivemos uma alta incidência dos gene *mexY* (97%), seguida dos genes *mexF* (88%) e *mexB* (81%). O gene *mexD* esteve presente em apenas (28%) dos isolados, indicando possivelmente sua baixa incidência em isolados ambientais.

O segundo sistema mais frequente nos isolados de *Pseudomonas* sp. foi o MexEF-OprN o que indica uma maior relevância deste sistema de efluxo nos isolados deste grupo, o que pode ter relação com a resistência de 7 isolados deste

grupo ao imipenem já que este antimicrobiano é substrato específico deste sistema de efluxo (TABELA 1). Entretanto, o sistema de efluxo mais frequente neste grupo, o MexXY-OprM, não utiliza os antimicrobianos testados (ceftazidima e imipenem) como substratos, portanto seria importante testar o perfil de resistência destes isolados frente a outros antimicrobianos, que são substratos para esta bomba de efluxo.

No grupo de *P. aeruginosa* (TABELA 5) obtivemos uma alta incidência em todos os genes: *Mex B* (96%), *Mex Y* (93%), *Mex F* (89%) e *Mex D* (71%). Um estudo com isolados clínicos de *P. aeruginosa* originados de infecções sanguíneas do Brasil (Xavier *et al.*, 2010), não observou a expressão de genes da bomba de efluxo MexCD-OprJ entre seus isolados. Os resultados do presente estudo e de Xavier *et al.* (2010) podem estar associados a baixa incidência deste gene em isolados brasileiros, já que o gene *mex D* foi o menos encontrado em todos os isolados do presente estudo.

Entretanto, ao comparar a análise de PCR com os resultados da CIM na presença do CCCP (Tabela 6) verifica-se que nem todas os isolados reduziram na presença do inibidor de bomba de efluxo, o que pode significar que o mecanismo de resistência que esteja atuando não seja dependente de força próton motora para todos os isolados.

TABELA 6- Comparação entre a presença de genes de efluxo e a CIM na presença e ausência do Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP).

| | ISOLADOS | Genes <i>mex</i> | | | | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | | Pesquisa <i>blaSPM-1</i> (Fuentefria et al.,2009) |
|------------------------|----------|------------------|-------------|-------------|--------------|--------------------------|------|------|-------|--|
| | | <i>mex B</i> | <i>mexY</i> | <i>mexD</i> | <i>mex F</i> | IMP+ | CAZ+ | IMP | CCCP | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | 139L | - | + | - | + | <1 | ** | >512 | 512 | - |
| | L19 | + | + | - | - | 64 | <1 # | 64 | 64 | - |
| | L20 | + | + | + | + | 32 | 32 | 512 | 128 # | - |
| | L25 | + | + | + | + | 256 | 2 # | 128 | 64 | - |
| | L27 | + | + | + | + | 32 | 16 | 128 | 64 | - |
| | L36 | - | + | - | - | <1 | ** | 256 | 256 | - |
| | L39 | + | + | - | + | <1 | ** | 512 | 64 # | - |
| | M36 | + | + | + | + | 1 | ** | 256 | 256 | - |
| | 55L | + | + | - | + | 1 | ** | 128 | <1 # | - |
| | 116L | + | + | + | + | 1 | ** | 128 | 128 | - |
| | M12 | - | + | - | + | <1 | ** | 8 | ** | - |
| | 93L | + | + | + | + | 512 | 16 # | 256 | 256 | - |
| | 3L | + | + | + | + | <1 | ** | >512 | 256 # | - |
| | 30L | + | + | - | + | <1 | ** | 8 | ** | - |
| | L40 | + | + | - | + | 64 | 8 # | 512 | 128 # | - |
| | 52L | + | + | - | + | <1 | ** | 256 | 64 # | - |
| | L62 | - | + | - | + | <1 | ** | 256 | 128 | - |
| | 1L | - | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - |
| | 4L | - | + | - | - | <1 | ** | <1 | ** | - |
| | 25L | + | - | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - |
| | 29L | + | + | - | + | 1 | ** | 1 | ** | - |
| | 33L | + | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - |
| | 38L | + | + | - | + | 4 | ** | 8 | ** | - |
| | 54L | + | + | - | + | <1 | ** | 4 | ** | - |
| | 57L | + | + | + | + | 8 | 8 | 8 | ** | - |
| | 118L | + | + | - | + | <1 | ** | 4 | ** | - |
| | 136L | + | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - |
| A10 | + | + | + | + | 2 | ** | <1 | ** | - | |
| L59 | + | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - | |
| M14 | + | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - | |
| N31 | + | + | - | - | <1 | ** | <1 | ** | - | |
| P99 | + | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - | |

TABELA 6- Continuação - Comparação entre a presença de genes de efluxo e a CIM na presença e ausência do Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP).

| | | Genes <i>mex</i> | | | | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | | Pesquisa <i>blaSPM-1</i> (Fuentefria <i>et al.</i> ,2009) |
|-------------------------------|------|------------------|--------------|--------------|-------------|--------------------------|--------------|------|--------------|---|
| ISOLADOS | | <i>mex B</i> | <i>mex Y</i> | <i>mex D</i> | <i>mexF</i> | IMP | IMP+ CCCP | CAZ | CAZ+ CCCP | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | F5 | + | + | - | + | <1 | ** | <1 | ** | - |
| | F22 | + | + | + | + | 128 | 8# | 256 | 256 | - |
| | F28 | + | + | - | + | 16 | 16 | 16 | 16 | - |
| | F35 | + | + | + | + | 32 | 16# | 16 | 16 | - |
| | H12B | + | - | + | - | >512 | 256# | >512 | >512 | - |
| | L10 | + | + | + | + | >512 | >512 | >512 | 512 | - |
| | L11 | + | + | + | + | >512 | 512 | >512 | >512 | - |
| | L12 | + | + | - | + | 512 | 512 | >512 | >512 | - |
| | L13 | + | + | + | + | 4 | ** | 8 | ** | - |
| | L14 | + | + | + | + | 512 | 256 | 512 | 256 | - |
| | L17B | + | + | - | + | >512 | >512 | >512 | >512 | - |
| | L21 | + | + | + | + | >512 | 256# | >512 | >512 | + |
| | L50 | + | + | + | + | >512 | 128# | >512 | >512 | - |
| | L25 | + | + | + | + | >512 | 512 | >512 | >512 | + |
| | L12 | + | + | + | + | 512 | 256 | >512 | >512 | - |
| | L17 | + | + | - | + | >512 | 512 | >512 | 512 | - |
| | M12 | + | + | + | + | >512 | 512 | 256 | 256 | - |
| | M20 | + | + | + | + | 16 | 8 | 512 | >512 | - |
| | M20A | + | + | + | + | 512 | 512 | 512 | 512 | - |
| | M23 | + | + | + | + | 16 | 16 | 512 | 512 | - |
| | M13 | + | + | - | - | >512 | 256# | >512 | >512 | - |
| | N4 | + | + | + | + | >512 | 512 | >512 | >512 | - |
| | N5 | + | + | - | + | >512 | 512 | >512 | >512 | + |
| | N7 | + | + | + | + | >512 | 512 | >512 | >512 | + |
| N18 | + | + | + | + | 512 | 256 | >512 | >512 | + | |
| N6 | - | - | - | - | >512 | >512 | >512 | >512 | + | |
| N8 | + | + | + | + | >512 | 512 | >512 | >512 | + | |
| N17 | + | + | + | + | >512 | 512 | 512 | 256 | + | |

CIM: concentração inibitória mínima; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima. Os asteriscos (**) indicam que o isolado não foi testado com CCCP, pois era sensível ao antimicrobiano. O símbolo (#) indica o isolados que reduziram na presença do CCCP. *blaSPM-1* indica o gene pesquisado por Fuentefria *et al.*,2009 para verificar a presença de metalo- β -lactamases (MBLs) nestes isolados.

No grupo de *Pseudomonas* sp. houve redução da CIM do imipenem na presença do CCCP nos isolados L19, L25, 93L e L40, em todos foram amplificados os genes de efluxo *mex B* e *mexY*. No entanto, L25 e 93L também apresentaram amplificação pelo *mex D* e *mexF* e L40 amplificou o *mexF*.

No isolado L19, como o resultado de PCR apresentou amplificação somente para os genes *mex B* e *mexY*, o mecanismo de resistência ao imipenem parece ser a expressão da bomba MexXY-OprN, pelo fato de o sistema MexAB-OprM ser conhecido por não transportar o antimicrobiano Imipenem (Xavier, 2008). Nos isolados (L25, 93L), nos quais foi observado a presença de todos os genes testados, o sistema MexEF-OprN pode estar envolvido na resistência, já que este possui a capacidade de transporte do Imipenem. Os antimicrobianos transportados por cada sistema de efluxo podem ser vistos na Tabela 1.

Existem relatos que o sistema MexEF-OprN seja responsável pela redução da expressão das bombas MexAB-OprM e MexXY-OprN, pois parece exercer uma atividade corregulatória entre elas (Llanes *et al.*, 2011; Maseda *et al.*, 2000). Neves (2011) confirmou a expressão de MexEF-OprN como único mecanismo de resistência ao imipenem e meropenem em alguns isolados de *Pseudomonas*.

A redução da CIM da ceftazidima em isolados de *Pseudomonas* sp. na presença do inibidor de força próton motora (CCCP), foi observada em 6 amostras estudadas (L20, L39, 55L, 3L, L40, 52L). Destes isolados, em L20 observamos a presença de todos os genes de efluxo. Nos outros isolados não foi observado apenas a presença do gene *mex D*, sendo amplificado todos os outros genes. A ceftazidima é substrato para MexAB-OprM (Aeschlimann, 2003), logo nestes isolados este mecanismo deve ser o responsável pela resistência.

No grupo *P. aeruginosa* 6 isolados (F22, F28, H12B, L21, L50, M13) tiveram a redução da CIM do Imipenem na presença do CCCP. Destes, o F22, L21 e L50 apresentaram todos os genes estudados. O F28 não amplificou o gene *mex D*, o isolado H12B não amplificou os genes *mex Y* e *mex F* e o isolado M13 não amplificou os genes *mex D* e *mex F*. O sistema MexEF-OprN utiliza o Imipenem como substrato (Aeschlimann, 2003), desta forma podemos sugerir que o mecanismo envolvido na resistência dos isolados F22, L21 e L50 e F28 seja o

sistema de efluxo MexEF-OprN, pois amplificaram o gene *mex F* e reduziram a concentração inibitória mínima do imipenem na presença do CCCP.

No grupo de *P. aeruginosa* não houve redução na Concentração Inibitória Mínima da Ceftazidima na presença do CCCP, mesmo com a amplificação de genes de efluxo para a maioria destes isolados. Com esse resultado, podemos sugerir que o principal mecanismo de atuação na resistência destes isolados a ceftazidima não são os sistemas de efluxo estudados. Provavelmente, outro mecanismo de resistência esteja atuando neste grupo.

Adabi *et al.* (2015), relataram que isolados de *Pseudomonas* ciprofloxacina resistentes apresentaram três genes de efluxo simultaneamente (*mex A*, *mex C* e *mex E*). No entanto, comparando com a análise fenotípica das bombas de efluxo concluíram que alguns genes devem estar inativos pois não reduziram a CIM na presença do CCCP.

Pournaras *et al.* (2005) relataram que isolados que expressavam sistemas bombas de efluxo *Mex* (MexAB-OprM e MexXY-OprM), foram suscetíveis a Ceftazidima e explicaram que isso se devia ao fato deste antimicrobiano ser pouco afetado por sistemas de efluxo. Segundo eles, a ausência de atuação de outros mecanismos de resistência para combinar com a atuação das bombas de efluxo pode ser a causa da suscetibilidade dos isolados frente a ceftazidima, mesmo com a expressão dos sistemas MexAB-OprM e MexXY-OprM.

Em estudo realizado por Fuentefria *et al.* (2009), com os mesmos isolados utilizados neste trabalho, verificou-se a presença do mecanismo de resistência conhecido como metalo β -lactamases (MBLs) através do gene *bla_{SPM-1}*. As MBLs hidrolisam quase todos os β -lactâmicos comercialmente disponíveis e potencializam a resistência aos β -lactâmicos causada por sistemas de efluxo além de reduzir a permeabilidade celular (Livermore, 1989). De acordo com os resultados de Fuentefria *et al.* (2009), os isolados de *P. aeruginosa* L21,L25, N5, N6, N7, N8, N17 e N18 apresentaram o gene *bla_{SPM-1}* e no presente estudo mostraram um alto nível de resistência (> 512 μ g/mL) para os dois antimicrobianos testados. É provável que estes dois mecanismos de resistência estejam agindo em conjunto e sejam os responsáveis pelos altos níveis de resistência destes isolados.

Alguns isolados do grupo *Pseudomonas* sp. (57L) e do grupo *P. aeruginosa* (L13) apresentaram todos os genes de efluxo testados no trabalho, mas mesmo assim foram sensíveis aos dois antimicrobianos utilizados no estudo. De acordo Masuda *et al.* (2000) a expressão simultânea de vários sistemas pode causar alterações na especificidade do substrato de cada sistema multidrogas. A partir desse resultado é possível presumir que as bombas de efluxo podem perder a sua especificidade na expressão de todos os sistemas de efluxo (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM), perdendo a capacidade de conferir resistência aos antimicrobianos testados.

Os genes codificadores dos sistemas de efluxo são constituintes normais do genoma bacteriano e, dessa forma, fornecem para a bactéria um potencial intrínseco de desenvolver um fenótipo de resistência aos β -lactâmicos sem a aquisição de novos genes (Hasdemir, 2004). Sendo assim, os genes e proteínas de bombas de efluxo podem estar presentes tanto em cepas resistentes quanto em cepas sensíveis. Alguns sistemas podem ser induzidos por substratos específicos, fazendo com que um isolado aparentemente sensível expresse um sistema de efluxo de tal forma que se torne resistente (Pidcock, 2006b).

Embora acredite-se que as bombas de efluxo confirmam um nível de resistência de baixo a moderado, seu impacto no tratamento clínico é considerado de suma importância, já que pode resultar na falha de antimicrobianos em sítios de infecção onde as concentrações da droga são menores do que as ideais (Mesaros *et al.*, 2007).

Pela metodologia utilizada, pode-se sugerir a atuação de sistemas de efluxo nos isolados que reduziram a CIM na presença do inibidor, porém não podemos afirmar que sistemas de efluxo estejam ausentes nos demais isolados. Mesmo em isolados sensíveis, genes de efluxo pesquisados neste estudo foram encontrados o que significa que podem se tornar resistentes a partir de uma mutação ou incorporação de uma informação genética que codifica a resistência (Kümmerer, 2003) ou a partir da indução por um substrato específico de tal forma que se torne resistente (Pidcock, 2006b).

Considerando que os isolados utilizados no estudo são provenientes de efluente hospitalar, ambiente que contém alta carga de antimicrobianos, desinfetantes, detergentes, entre outros, o contato com estas substâncias no meio

ambiente pode exercer uma pressão seletiva que pode resultar no estabelecimento de mutações que expressariam sistemas de efluxo mais eficientes. Ambientes de efluentes hospitalares são também conhecidos por apresentarem altas concentrações de detergentes e desinfetantes os quais favorecer a permanência de linhagens bacterianas que expressam sistemas de efluxo que utilizam estas moléculas como substrato, mesmo na ausência de antimicrobianos. Este processo também contribui para a permanência de bactérias que carregam genes de resistência aos antimicrobianos e conseqüentemente para sua disseminação no ambiente.

Há relatos de vários autores que os antimicrobianos podem atuar como indutores e originar eventos mutacionais que provovem a hiperexpressão das bombas de efluxo, e assim a exposição a concentrações subterapêuticas de antibióticos pode apresentar como conseqüência a seleção de estirpes mutantes (Baquero, 2008; Lynch, 2006). Nossos resultados demonstram a capacidade dos isolados ambientais expressarem bombas de efluxo e o elevado nível de resistência dos mesmos, por isso destacamos a importância da monitorização do uso de antibióticos e o tratamento cuidadoso e eficiente dos efluentes hospitalares.

Portanto, este estudo demonstra que efluentes hospitalares não tratados são uma grande fonte de contaminação ambiental e um reservatório de bactérias resistentes com grande capacidade de expressar bombas de efluxo. A presença de antimicrobianos no esgoto hospitalar combinados com o descarte de microrganismos favorece o aumento das Concentrações Inibitórias Mínimas dos antimicrobianos e, conseqüentemente, a resistência bacteriana. Diante dos resultados encontrados é possível concordar com Baquero (2008) de que água constitui não somente um ambiente de disseminação de bactérias resistentes entre populações de humanos e de animais, mas também uma via na qual os genes de resistência são introduzidos nos ecossistemas naturais.

5. CONCLUSÕES

5.1- Os isolados de *P. aeruginosa* mostraram-se mais resistentes a ceftazidima e ao imipenem dos que os isolados de *Pseudomonas* sp.

5.2- Dos 28 isolados de *P. aeruginosa* testados com CCCP para o antimicrobiano Ceftazidima nenhum deles reduziu a CIM, o que indica que as bombas de efluxo com energia oriunda da força próton-motora não são responsáveis pela resistência a Ceftazidima destes isolados. Quando testados com o antimicrobiano Imipenem, 6 isolados tiveram a redução na CIM na presença do CCCP, sugerindo a atuação das bombas de efluxo.

5.3- Tanto no grupo de *Pseudomonas aeruginosa* quanto no grupo de *Pseudomonas* sp. alguns isolados reduziram a CIM quando foi adicionado um inibidor de força próton-motiva (CCCP), o que indica a atuação de bombas de efluxo do tipo *mex*.

5.4 No grupo de *Pseudomonas aeruginosa* obtivemos uma alta incidência de todos os genes testados (*mexB*, *mexY*, *mexF*, *mexD*). Entre os isolados de *Pseudomonas* sp. obtivemos uma alta incidência dos genes *mexB*, *mexY*, *mexF*. O gene *mexD* esteve presente em apenas (28%) dos isolados, indicando possivelmente sua baixa incidência em isolados ambientais.

5.5- Mesmo na presença de genes que codificam as bombas de efluxo alguns isolados foram sensíveis aos antimicrobianos testados, isto porque estes isolados não devem estar expressando estes genes.

5.6- Nos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* oito isolados apresentaram tanto o gene o gene *bla_{SPM-1}* como os genes de bomba de efluxo testados. É provável que estes dois mecanismos estejam atuando em conjunto e sejam os responsáveis pelos altos níveis de resistência (>512µg/mL) destes isolados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos complementares quanto a expressão dos genes *mexB*, *mexD*, *mexY* e *mexF* através da técnica de PCR em Tempo Real ajudariam a compreender melhor a função das bombas de efluxo na resistência aos antimicrobianos testados. Além disso, a pesquisa de outros mecanismos de resistência que possam estar atuando juntamente com as bombas de efluxo pode colaborar para o entendimento de como estes mecanismos atuam e como podem estar interligados.

A utilização de outro inibidor da força próton motora como, por exemplo, a phenylalanine arginyl beta-naphthylamide (PaβN), pode resultar em CIM diferentes das encontradas com o CCCP, sendo possível comparar a atuação destes dois principais inibidores de bomba de efluxo para os sistemas *mex*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTOR, J.P. **Imunologia e Microbiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ADABI, M.; TALEBI-TAHER, M.; ARBABI, L.; AFSHAR, M.; FATHIZADEH, S.; MINAEIAN, S.; MOGHADAM-MARAGHEH, N.; MAJIDPOUR, A. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. **Infection & Chemotherapy**, v. 47, n.2, p. 98-104, jun. 2015.

AESCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 7, p. 916-924, jul. 2003.

ASH, R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. 713-716, jul. 2002.

ARSLAN, S.; EYI, A.; ÖZDEMİR, F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* sp. isolated from cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 94 n. 12, dez. 2011.

ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ABUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal Medicine**, v. 6, p. 58-70, mai. 2011.

AVRAIN, L.; MERTENS P.; BAMBEKE F. V. RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism. **Clinical Laboratory International**, v. 26321, p. 26-28, mai. 2013.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 260 - 265, jun. 2008.

BAY, D. C.; ROMMENS, K. L.; TURNER, R.J. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1814-1838, set. 2008.

BAY, D. C.; TURNER R. J. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p.140-167, jun. 2009.

CAMPANA, E.H. Resistência aos carbapenems e sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*: estudos dos mecanismos de resistência envolvidos. Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. 2013.

CASTELLANOS, T. G.; MARSHAL, A. C.; RODRÍGUEZ, L.C. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias Gram-negativas. **Revista Cubana de Salud Pública**, v. 40, n.1, p.129-135, mar. 2014.

CHAGAS, T. P.; SEKI, L. M.; CURY, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; DÁVILA, A. M.; SILVA, D. M. Asensi MD. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p.572-581, set. 2011.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute / NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, PA 19087 USA, 2015.

DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 241-268, abr. 2004.

DELMAR, J. A. Bacterial multidrug efflux transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 43, p. 93-117, mai. 2014.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -Lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 160-201, jan. 2010.

DREIER, J.; RUGGERON, P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers of Microbiology**, v. 6, p., 1-21, jul. 2015.

DU, D.; VAN VEEN, H. W.; LUISI, B. F. Assembly and operation of bacterial tripartite multidrug efflux pumps. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 311-319, n. 5, mai. 2015.

FETAR, H.; GILMOUR, C.; KLINOSKI, R.; DAIGLE, D. M.; DEAN, C. R.; POOLE, K. mexEF-oprN multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by the mexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 508-514, fev. 2011.

FERREIRA, A. E.; MARCHETTI, D. P.; DE OLIVEIRA, L. M; GUSATTI, C. S.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 17,n. 2, p. 221-22. Jun. 2011.

FUENTEFRIA, D. B. Detecção de metalo-beta-lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial. Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental na Universidade do Rio Grande do Sul. 2009.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. Spread of metallo β -lactamases: screening reveals the presence of *abla*spm-1 gene in hospital sewage in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 82-85, mar. 2009.

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2ed., 1984.

HASDEMIR, U. O.; CHEVALIER, J.; NORDMANN, P.; PAGÈS, J. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2701-2707, jun. 2004.

HOCQUET, D.; BERTHELOT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; FAVRE, R.; JEANNOT, K.; BAJOLET, O.; MARTY, N.; GRATTARD, F.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; BINGEN, E.; HUSSON, M.; COUETDIC, G.; PLÉSIAT, P. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3531-3536, out. 2007.

HORIYAMA, T.; NISHIRO, K. AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in Enterobactin export in *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, v. 9, e108642 10.1371, set. 2014.

IBGINOSA, I. H.; NWODO, U.; SOSA, A.; TOM, M.; OKOH, A. Commensal *Pseudomonas* Species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, p. 2537–2549, jul. 2012.

JEANNOT, K.; ELSEN, S.; KÖHLER, T.; ATTREE, I.; VAN DELDEN, C.; PLÉSIAT, P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2455–2462, jul. 2008.

KRIENGKAUYKIAT, J.; PORTER, E.; LOMOVSKAYA, O.; WONG-BERINGER, A. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrobial and Agents Chemotherapy, v.49, n. 2, p. 565–570, fev. 2005.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n.10, p.1486-1513, jul. 2005.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M.; VARELA M. F. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1-15, out. 2013.

KÜMMERER, K.; HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 9, n. 12, p. 1203-1214, dez. 2003.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.54, n.2, p. 311-320, jun. 2004.

KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 763–768, mai. 2009.

LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, n.3, p. 188-199, set. 2003.

LI, L.; ABU AL-SOUD, W.; BERGMARK L.; RIBER, L.; HANSEN, L. H.; MAGID J.; SORENSEN S. J. Investigating the Diversity of *Pseudomonas spp.* in Soil Using Culture Dependent and Independent Techniques. **Current Microbiology**, v. 67, p.423-430, mai. 2013.

LIVERMORE, D. M. Role of β -lactamase and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 257-63, 1989.

LLANES, C.; KÖHLER, T.; PATRY, I.; DEHECQ, B.; VAN DELDEN C.; PLÉSIAT, P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5676-5684, dez. 2011.

LUBELSKI, J; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. M. Distribution and physiology of ABC-Type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 463-476, set. 2007.

MADEJ, M. G.; KABACK H. R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 110, p. E4831–E4838, dez. 2013.

MADIGAN, M. **Brock Biology of Microorganisms**. 14rd ed. New York: Prentice Hall Press, 2015.

MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; KERN, W. V.; PAGÈS, J. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.59, n.6, p.1223-1229, jan. 2007.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v. 87, p. 1137-1147, dez. 2005.

MASEDA, H.; YONEYAMA, H.; NAKAE, T. Assignment of the Substrate-Selective Subunits of the MexEF-OprN Multidrug Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.44, n. 3, p. 658–664, mar. 2000.

MASEDA, H.; SAWADA, I.; SAITO, K.; UCHIYAMA, H.; NAKAE, T.; NOMURA, N. Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing

autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.48, n. 4, p. 1320-1328, abr. 2004.

MESAROS, N.; GLUPCZYNSKI, Y.; AVRAIN, L.; CACERES, N. E.; TULKENS, P. M.; VAN BAMBEKE, F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 378-386, fev. 2007.

MASUDA, N.; SAKAGAWA, E.; OHYA, S.; GOTOH, N.; TSUJIMOTO, H.; NISHINO, T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p.3322–3327, dez. 2000.

MOODLEY, C.; REID, S. J.; ABRATT, V. R. Molecular characterization of ABC-type multidrug efflux systems in *Bifidobacterium longum*. **Anaerobe**, v. 32, p. 63-69, abr. 2015.

MOOGES, F.; ENDRIS, M.; BELYHUN, Y.; WORKU, W. Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. **BMC Research Notes**, v.7, p. 215-221, abr. 2014.

MOREIRA, M. A. S.; FERREIRA, A. B.; TRINDADE, T. F. S. L.; REISI, A. L. O.; MORAES, C. A. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1307-1314, dez. 2008.

MOREIRA, M. A.; OLIVEIRA, J. A.; TEIXEIRA, L. M.; MORAES, C.A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p.75–81. 2005.

MULET, M. Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 455-464, Out. 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

NEVES, P. R.; MAMIZUKAI, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47. n. 4. p. 409-420, ago., 2011.

NEVES, P. R. Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem. Tese de doutorado pela Universidade de São Paulo. 2010.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 769-781, mai. 2009.

OGAWA, W.; MINATO, Y.; DODAN, H.; ONISHI, M.; TSUCHIYA, T., KURODA, T. Characterization of MATE-type multidrug efflux pumps from *Klebsiella pneumoniae* MGH78578. **PLOS One**, v. 10, mar. 2015.

OMOTE, H.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M.; MORIYAMA, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.27, p. 587–593, nov. 2006.

OZEN, I. A.; USSERY, W. D. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line With Azobacter? **Microbial Ecology**, v. 63, p.239–248, ago. 2011.

PALLERONI, N. J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J.T (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriologic**. Vol.2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 323–352, 2005.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R.A. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 4943–4960, nov. 2011.

PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629-636, ago. 2006a.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.319-402, abr. 2006b.

POELARENDS, G. J.; MAZURKIEWICZ, P.; KONINGS, W. N. Multidrug transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v.1555, p.1-7, set. 2002.

POOLE, K. Resistance to b-lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 2200-2223, ago. 2004.

POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P. T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N. J.; MANIATIS, A. N. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n.4, p. 761- 764, ago. 2005.

SAUNDERS, J. Bacterial physiology: Unravelling membrane transport. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, out. 2003.

SHAHEEN, A.; ISMAT, F.; IQBAL, M.; HAQUE, A.; ZORZI, R.; MIRZA, O.; WALZ, T.; RAHMA, M. Characterization of putative multidrug resistance transporters of the major facilitator-superfamily expressed in *Salmonella Typhi*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 357-362, mai. 2015.

SPINDLER, A.; OTTON, L.M.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Beta-lactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas spp.* isolated from untreated hospital effluents in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 102-108, mar. 2012.

SRINIVASAN, V. B.; RAJAMOHAN, G.; GEBREYES, W.A. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n. 12, p. 5312-5316, dez. 2009.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n.2, p. 253-267, out. 2014.

TORRES, J. C. N.; MENEZES, E. A.; ÂNGELO, M. R. F.; OLIVEIRA, I. R. N.; SALVIANO, M. N. C.; XAVIER, D. E.; FILHO, L. S. Cepas de *Pseudomonas spp.* produtoras de metalo betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42 .n. 5, p. 313-319, out. 2006.

VAN BANBEKE, F.; PAGÈS, J. M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**, v.1, p. 138-175, jun. 2010.

VAZ-MOREIRA, L.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas spp.* from drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 426, p. 366-374, jun. 2012.

WEBBER, M. A; PIDDOCK, L. J .V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 9–11, jan. 2003.

XAVIER, D. E. Avaliação da Expressão de Sistemas de Efluxo para a Resistência Antimicrobiana entre Amostras Clínicas de *Pseudomonas Aeruginosa*. Dissertação de Mestrado apresentada Escola Paulista de Medicina. 2008.

XAVIER, D. E.; PICÃO, R. C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L.C.; GALES, A. C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 217- 224, ago. 2010.

WONG, K.; MA, J.; ROTHNIE, A.; BIGGIN, P. C.; KERR, I. D. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n.1, p. 8-16, jan. 2014.

ZASOWSKI, E. J.; RYBAK, J. M. The β -Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n.8, p. 755-770, ago. 2015.

ZHANG, Z. LIU, Z.; ZHENG, P.; TANG, F.; YANG, P. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. v. 16, n.10, p. 1279-1284, mar. 2010.

8. ANEXOS

8.1- Meios de Cultura

Cetrimide Ágar

Hidrolisado Pancreático de Gelatina – 20g
Cloreto de Magnésio – 1,4g
Sulfato de Potássio – 10g
Glicerol – 10mL
Cetrimida – 0,3g
Ágar – 13,6g
Água destilada – 1000mL

Caldo BHI (Brain Heart Infusion)

Infusão de Cérebro de Vitelo - 200g
Infusão de Coração Bovino – 250g
Peptona proteose – 10g
Dextrose - 2g
Cloreto de Sódio – 5,0g
Fosfato Dissódico – 2,5g
Água destilada – 1000mL

Ágar TSA (Agar Triptona de Soja)

Hidrolisado Enzimático de Caseína – 15g
Peptona de Soja – 5g
Cloreto de Sódio – 5g
Agar – 15g
Água destilada – 1000mL

8.2 Soluções para Eletroforese

TAE 50X

Tris base – 242g
Ácido Acético Glacial – 57,1mL
EDTA (0,5M, pH 8,0,) – 100mL
Água destilada – 715,1mL

TAE 1X

TAE 50X – 20mL
Água Destilada – 980mL

Gel de Agarose 1%

Agarose - 1g
TAE 1X – 100mL

Solução de Brometo de Etídio

Brometo de Etídio – 10mg/mL
Água destilada esterilizada – 1 mL
Solução estoque, armazenar a 4°C.

Tampão de corrida 6X

Azul de Bromofenol – 0,5g
Glicerol – 30mL
Água destilada – 70mL
Ajustar o pH com NaOH (1M) até obter uma coloração escura.
Armazenar a -20°C.