

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Débora Santos Minkovicius**

**IC-15**

**COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PADRÃO DE RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS EM *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLADAS DE AMOSTRAS  
VETERINÁRIAS NA GRANDE SÃO PAULO**

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC COMPARISON OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE  
PATTERNS IN *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLATED FROM VETERINARY SAMPLES IN  
SÃO PAULO METROPOLITAN AREA**

**São Paulo**

**2024**

**Débora Santos Minkovicius**

**COMPARAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PADRÃO DE RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS EM *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLADAS DE AMOSTRAS  
VETERINÁRIAS NA GRANDE SÃO PAULO**

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC COMPARISON OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE  
PATTERNS IN *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLATED FROM VETERINARY SAMPLES IN  
SÃO PAULO METROPOLITAN AREA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Biomedicina do Centro Universitário São  
Camilo, orientado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marjorie Marini,  
como requisito parcial para obtenção do título de  
biomédica.

**São Paulo**

**2024**

## RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é observada em grande parte das *Pseudomonas* spp. isoladas na clínica veterinária, não apenas pela resistência intrínseca desse gênero a muitos antimicrobianos, mas também em decorrência do uso indiscriminado destes, o que torna cada vez mais difícil encontrar uma alternativa de tratamento. Na rotina, a resistência aos antimicrobianos é detectada pelo teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Contudo, os padrões fenotípicos encontrados nesse teste nem sempre sinalizam precisamente os mecanismos moleculares envolvidos nessa resistência. Isso se dá pelo fato de que mesmo que uma bactéria possua um gene que confira a resistência, no momento da realização do antibiograma, esse gene pode não estar sendo expresso, dificultando assim a identificação destes por meio das técnicas usadas na rotina microbiológica. O objetivo desse estudo foi realizar uma comparação fenotípica e genotípica do padrão de resistência em *Pseudomonas* spp. de origem veterinária na Grande São Paulo. Foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão e reação em cadeia de polimerase dos genes OXA50, parC, oprD, mexB, mexT, aac(3)-Ia, ant(2'')-Ia, GES, nalD e gyrA para todos os isolados incluídos no trabalho. O gene gyrA amplificou em 15 isolados, parC em 20, nalD em 32, mexT em 3, oprD em 5, OXA50 em 24, GES em 29, mexB em 9, aac(3)-Ia em 1 e ant(2'')-Ia em nenhum desses isolados. A classe de antimicrobianos testada que apresentou a maior resistência entre os isolados foi a das fluoroquinolonas. Em contrapartida, a que apresentou a maior sensibilidade foi a da cefalosporina de terceira geração antipseudomônica, sendo que nenhum dos 35 isolados apresentaram fenótipo resistente, porém, 29 amplificaram para pelo menos 1 dos 3 genes associado às cefalosporinas. Discrepâncias encontradas entre fenótipo e o genótipo dos genes avaliados sugerem a participação de outros genes e a necessidade de ampliar as análises moleculares.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, *Pseudomonas* spp., Veterinária

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is observed in most *Pseudomonas* spp. isolated in veterinary clinics, not only due to the intrinsic resistance of this genus to many antimicrobials but also because of their indiscriminate use, which makes finding treatment alternatives increasingly difficult. In practice, antimicrobial resistance is detected through antimicrobial susceptibility testing. However, the phenotypic patterns observed in this test do not always accurately indicate the molecular mechanisms involved in resistance. This occurs because, even if a bacterium possesses a resistance-

conferring gene, that gene may not be expressed at the time of the antibiogram, complicating its identification using routine microbiological techniques.

The objective of this study was to perform a phenotypic and genotypic comparison of resistance patterns in *Pseudomonas* spp. of veterinary origin in the Greater São Paulo region. Antimicrobial susceptibility testing was performed using the disk-diffusion method, and polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the following genes: *OXA50*, *parC*, *oprD*, *mexB*, *mexT*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *GES*, *nalD*, and *gyrA* in all isolates included in the study.

The *gyrA* gene was amplified in 15 isolates, *parC* in 20, *nalD* in 32, *mexT* in 3, *oprD* in 5, *OXA50* in 24, *GES* in 29, *mexB* in 9, *aac(3)-Ia* in 1, and *ant(2'')-Ia* in none of these isolates. The class of antimicrobials showing the highest resistance among the isolates was fluoroquinolones, while the third-generation antipseudomonal cephalosporins showed the highest sensitivity. None of the 35 isolates exhibited a resistant phenotype to this class, but 29 amplified at least one of the three genes associated with cephalosporins.

Discrepancies between the phenotypic and genotypic profiles of the evaluated genes suggest the involvement of other genes and highlight the need for broader molecular analyses.

Keyword: Bacterial resistance, *Pseudomonas* spp., Veterinary

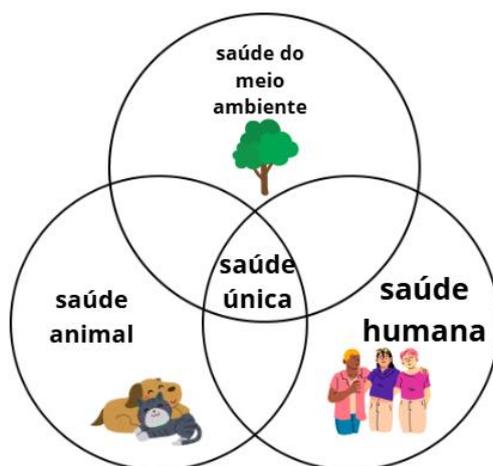
## INTRODUÇÃO

A resistência aos agentes antimicrobianos é uma preocupação de grande relevância global, sendo destacada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das dez principais ameaças à saúde pública enfrentadas pela humanidade (11,12). Em 2015, a OMS lançou uma iniciativa destinada a monitorar a resistência e o uso de agentes antimicrobianos em bactérias e fungos, através do Sistema Global de Vigilância da Resistência e Uso de Antimicrobianos (GLASS – Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) (13). Em 2024, foi divulgada uma lista de patógenos prioritários resistentes aos antimicrobianos, contendo 12 bactérias que representam os maiores riscos à saúde humana, sendo que uma das espécies que está presente nessa lista é a *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista que tem se destacado quanto às infecções hospitalares (14, 34). Porém, isolados resistentes desse gênero já estão sendo identificados na comunidade, o que mostra que o problema da resistência bacteriana não está restrito aos pacientes imunocomprometidos e ao ambiente hospitalar (35). Com o objetivo de identificar a resistência

antimicrobiana, a OMS estabelece como prioridade a detecção de bactérias resistentes, bem como de genes de resistência, com o intuito de rastrear e compreender a propagação da resistência em diferentes ambientes (15, 25).

Esse esforço se mostra alinhado ao conceito “One Health” (“Saúde Única”), também promovida pela OMS, que defende a interligação entre a saúde humana, animal e ambiental (25, 32). A resistência antimicrobiana é um exemplo de como esses três domínios de saúde estão interligados, uma vez que o uso incorreto de antimicrobianos, seja na saúde humana ou na veterinária, assim como sua presença no meio ambiente, auxiliam no surgimento e na propagação de linhagens resistentes. Além disso, o interesse veterinário em animais de produção, como bovinos e suínos, para fins comerciais, já é bem consolidado, entretanto, em relação aos animais de companhia, os estudos considerando o conceito de saúde única, ainda não estão bem estabelecidos, tornando fundamental a realização de estudos nesse campo. Dessa forma, esse conceito evidencia a sinergia entre diferentes aspectos, buscando uma resposta mais efetiva e integrada a essa ameaça global (17).

(Figura 1)



**Figura 1:** Esquema do conceito “one health”. Figura autoral.

Tendo em vista o cenário citado, é necessário realizar uma vigilância de como a resistência bacteriana circula em diversos campos da sociedade, em especial nos animais de companhia, que ainda são pouco estudados. Para isso, selecionamos *Pseudomonas* sp. isoladas na prática clínica veterinária para a realização de testes fenotípicos e genotípicos, a fim de avaliar a ocorrência da resistência aos antimicrobianos em animais de companhia na Grande São Paulo.

## MÉTODOS

### Aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais e Comitê de Pesquisa

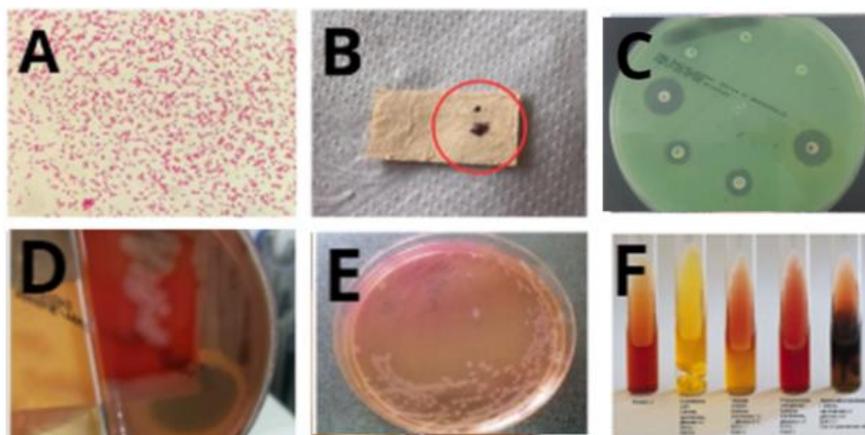
Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do centro Universitário São Camilo - CEUA (parecer consubstanciado nº 04/23) e pelo Comitê de Pesquisa do Centro Universitário São Camilo - CPq (parecer 37/2021).

### Obtenção dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados nesse estudo foram cedidos pela Unidade Veterinária Especializada Dognostic, a qual possui filiais no bairro do Belém, outras duas nos bairros do Campo Belo e Brooklin; outras duas no município de Barueri e uma quinta no município de Guarulhos. Foram incluídas bactérias isoladas na rotina clínica, entre os meses de novembro de 2023 a março de 2024, provenientes de amostras de animais de companhia cuja análise microbiológica isolou espécies de *Pseudomonas.*, além de que, no teste de sensibilidade aos antimicrobianos, apresentaram diferentes fenótipos de resistência aos antimicrobianos.

### Triagem microbiológica

A análise microbiológica de triagem foi realizada pelo Setor de Microbiologia da empresa, localizado no bairro do Belém. Os testes realizados para identificar o gênero da bactéria foram a bacterioscopia, podendo observar a presença de bacilos Gram-negativos, crescimento em ágar sangue e ágar MacConkey, teste de oxidase com resultado positivo, e testes bioquímicos para identificação de bactérias fermentadoras de açúcares de acordo com a fermentação de carboidratos, chamado ágar TSI (ágar tríplice açúcar ferro, do inglês “triple sugar iron ágar”), sendo que o gênero *Pseudomonas* apresenta resultado negativo para fermentação da lactose, da glicose e da sacarose, e negativo para H<sub>2</sub>S e produção de gás. Em alguns casos, a presença de pigmento nos ágar ou a coloração prateada metalizada em meio ágar sangue, além do característico cheiro adocicado, de uva ou de plástico EVA podem auxiliar na identificação da *Pseudomonas* sp (**Figura 2**).



**Figura 2:** (A) Lâmina de *Pseudomonas* sp. em coloração de Gram em aumento de 100X; (B) Teste de oxidase positivo ; (C) Placa de antibiograma por disco difusão em ágar Muller-Hinton de *Pseudomonas* sp; (D) Colônias de *Pseudomonas* sp. Em ágar sangue; (E) Colônias de *Pseudomonas* sp. em ágar Mac Conkey; (F) Teste TSI, quarto tubo da esquerda para a direita correspondente ao resultado de *Pseudomonas* sp. Figura autoral.

### Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Após a determinação do gênero *Pseudomonas*, os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade por disco difusão, de acordo com o BrCAST-EUCAST-2024/CLSI-VET (2024).

### Extração de DNA genômico

Para a obtenção de DNA genômico das amostras foi adaptado um método manual de extração de DNA genômico (Sambrook, J.; et al. Molecular cloning. 2003; Wilson, Kate. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. Current Protocols In Molecular Biology, 2001)

### PCR dos genes de resistência

Para avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos antimicrobianos dos isolados, foram selecionados pares de primers para os seguintes genes, de acordo com os artigos “Resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with bronchiectasis” (**Quadro 1**). O produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% a 2%, TAE 1X.

GENE AMPLIFICADO	PAR DE PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	AMPLICON (BP)	TM (°C)
gyrA	gyrA-F	AGTCCTATCTCGACTACGCGAT	341	57 a 56,6
	gyrA-R	AGTCGACGGTTTCCTTTCCAG		
parC	parC-F	CGAGCAGGCCTATCTGAACTAT	235	58
	parC-R	GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA		
nalD	nalD-F	GCGGCTAAAATCGGTACACT	789	56
	nalD-R	ACGTCCAGGTGGATCTTGG		
mexT	mexT-F	TGCATCACGGGGTGAATAAC	1398	56,5
	mexT-R	GGTAGCGCCAGGAGAAGTG		
oprD	oprD-F	GGCAGAGATAATTTCAAACCAA	1384	51
	oprD-R	GTTGCCTGTCGGTCGATTAC		
oxa50	oxa50-F	AATCCGGCGCTCATCCATC	619	58
	oxa50-R	GGTCGGCGACTGAGGCGG		
GES	ges-F	GTTTTGCAATGTGCTCAACG	371	54
	ges-R	TGCCATAGCAATAGGCGTAG		
aac(3)-Ia	aac(3)Ia-F	CCCTGACCAAGTCCAATCCATGC	435	58
	aac(3)Ia-R	GGTGGCGGTACTIONGGTTCGATA		
ant(2'')-Ia	ant(2'')Ia-F	ATGAGCGAAATCTGCCGCTCTG	150	58
	ant(2'')Ia-R	GCCCGCCGAGCATTCAACTAT		
mexB	mexB-F	CAACATCCAGGACCCACTCT	167	56,5
	mexB-R	AGGAAATCTGCACGTTCTGC		

**Quadro 1:** Lista de genes amplificados, com seus respectivos *primers forward*, *primers reverse*, *amplicons* em pares de base e temperatura de anelamento (TM (°C)). Quadro autoral.

## RESULTADOS

Foram incluídos 35 isolados de *Pseudomonas* sp. que apresentaram diferentes fenótipos de resistência aos antimicrobianos nos testes realizados pelo Setor de Microbiologia do laboratório parceiro. Desses 35 isolados, o maior número foi obtido em sítio otológico e cutâneo. Todas as amostras foram armazenadas e congeladas em meio BHI+glicerol.

Após o isolamento da bactéria e sua identificação como *Pseudomonas* sp., foi realizado o antibiograma, onde, dependendo do tipo de amostra, separados em amostras otológica, cutânea, urinária, secreção ocular, secreção nasal ou sem identificação, podem ter sido testados os seguintes antimicrobianos: enrofloxacino (ENO 5), gentamicina (GEN 10), ceftazidima (CAZ 30), levofloxacino (LEV 5), amicacina (AMI 30), aztreonam (ATM 30), ciprofloxacino (CIP 5), piperacilina + tazobactam (PPT 30/6), tobramicina (TOB 10), imipenem (IPM 10) e meropenem (MER 10).

Quanto aos genes testados, houve amplificação na seguinte proporção: nalD em 32 isolados; oprD em 5; mexB em 9; mexT em 3; OXA50 em 24; gyrA em 15; GES em 29; ant(2'')-Ia em 0; aac(3)-Ia em 1; e parC em 20 (**anexos 1 a 6; Quadro 2 a 7**).

De todos os isolados incluídos no estudo, nenhum apresentou fenótipo multidroga resistente (resistente a pelo menos um antimicrobiano de três classes testadas). Quanto às fluoroquinolonas, oito apresentaram resistência às três drogas testadas, uma a duas drogas testadas e 7 a 1 droga testadas (**anexo 1, quadro 2**).

	ENROFLOXACINO	LEVOFLOXACINO	CIPROFLOXACINO
FENÓTIPO	<b>R: 16</b> <b>I: 12</b> <b>S: 7</b>	<b>R: 9</b> <b>I: 0</b> <b>S: 26</b>	<b>R: 8</b> <b>I: 26</b> <b>S: 1</b>
GENÓTIPO	<b>NaID</b> +: 32 -: 3 <b>mexB</b> +: 9 -: 26	<b>mexT</b> +: 3 -: 32 <b>gyrA</b> +: 15 -: 20	<b>parC</b> +: 20 -: 15

**Quadro 2:** Resultados simplificados do teste fenotípico (superior) e genotípico (inferior) da resistência as fluoroquinolonas. Quadro autoral.

Quanto às cefalosporinas, todos os isolados apresentaram fenótipo sensível (**anexo 2, quadro 3**).

	CEFTAZIDIMA		
FENÓTIPO	<b>R: 0</b> <b>I: 0</b> <b>S: 35</b>		
GENÓTIPO	<b>mexB</b> +: 9 -: 26	<b>oprD</b> +: 5 -: 30	<b>GES</b> +: 29 -: 6

**Quadro 3:** Resultados simplificados do teste fenotípico (superior) e genotípico (inferior) da resistência as cefalosporinas. Quadro autoral.

Aos monobactâmico, 4 apresentaram resistência, enquanto todos os demais apresentaram fenótipo intermediário (**anexo 3, quadro 4**).

	<b>AZTREONAM</b>	
<b>FENÓTIPO</b>	<b>R: 4</b> <b>I: 31</b> <b>S: 0</b>	
<b>GENÓTIPO</b>	<b>mexB</b> +: 9 -: 26	<b>oprD</b> +: 5 -: 30

**Quadro 4:** Resultados simplificados do teste fenotípico (superior) e genotípico (inferior) da resistência ao monobactâmico. Quadro autoral.

Aos carbapenêmicos, 1 isolado apresentou resistência a ambas as drogas testadas, enquanto outros 2 isolados apresentaram resistência a apenas uma dessas drogas. Todos os demais isolados apresentaram sensibilidade a uma das drogas e fenótipo intermediário à outra (**anexo 4, quadro 5**).

	<b>IMIPENEM</b>		<b>MEROPENEM</b>	
<b>FENÓTIPO</b>	<b>R: 3</b> <b>I: 32</b> <b>S: 0</b>		<b>R: 1</b> <b>I: 0</b> <b>S: 34</b>	
<b>GENÓTIPO</b>	<b>mexB</b> +: 9 -: 26	<b>oprD</b> +: 5 -: 30	<b>GES</b> +: 29 -: 6	<b>OXA50</b> +: 24 -: 11

**Quadro 5:** Resultados simplificados do teste fenotípico (superior) e genotípico (inferior) da resistência aos carbapenêmicos. Quadro autoral.

Já ao beta-lactâmico em associação ao inibidor de beta-lactamase, todos os isolados apresentaram fenótipo intermediário (**anexo 5, quadro 6**).

PIPERACILINA + TAZOBACTAM	
FENÓTIPO	R: 0 I: 35 S: 0
GENÓTIPO	OXA50 +: 24 -: 11

**Quadro 6:** Resultados simplificados do teste fenotípico (superior) e genotípico (inferior) da resistência ao beta-lactâmico em associação ao inibidor de beta-lactamase. Quadro autoral.

E quantos aos aminoglicosídeos, 2 isolados apresentaram a resistência a 1 droga testada, enquanto 2 apresentaram fenótipo intermediário a outra droga. Os demais apresentaram fenótipo sensível aos aminoglicosídeos testados (**anexo 6, quadro 7**).

	GENTAMICINA	AMICACINA	TOBRAMICINA
FENÓTIPO	R: 0 I: 2 S: 33	R: 0 I: 0 S: 35	R: 2 I: 0 S: 32 NS: 1**
GENÓTIPO	ant(2'')-Ia +: 0 -: 35	aac(3)-Ia +: 1 -: 34	

**Quadro 7:** Resultados simplificados do teste fenotípico (superior) e genotípico (inferior) da resistência ao beta-lactâmico em associação aos aminoglicosídeos. Quadro autoral.

\*\* não suscetível

## DISCUSSÃO

### Identificação da espécie dos isolados

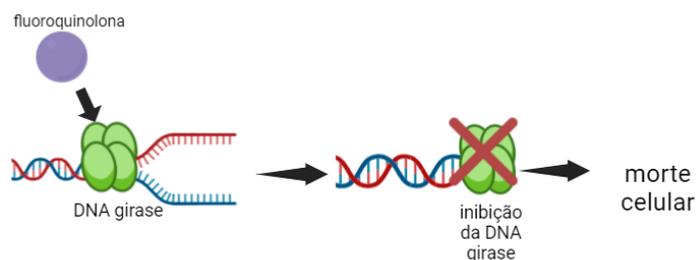
Os testes bioquímicos utilizados na rotina microbiológica só permitem identificar à nível de gênero os isolados, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto, o gene OXA50, como é possível encontrar em diversos trabalhos na literatura, é um gene cromossômico constitutivo do genoma de *Pseudomonas aeruginosa*, porém não é encontrado em outras espécies do gênero *Pseudomonas*.(1)

Ao obter 24 isolados que amplificaram esse gene, é possível sugerir que todos esses 24 isolados são da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto os isolados que não amplificaram esse gene pertenceriam a outra espécie que não a *Pseudomonas aeruginosa*.

## Comparação fenotípica e genotípica

### 1. Fluoroquinolonas

Neste trabalho analisamos a presença dos genes *nalD*, *gyrA*, *parC*, *mexT* e *mexB*, relacionados à resistência às fluoroquinolonas, classe de antimicrobianos que atuam na inibição da DNA girase, enzima que atua na síntese do DNA bacteriano (**Figura 3**).



**Figura 3:** Modelo esquemático do mecanismo de ação das fluoroquinolonas. Figura autoral.

O gene *nalD* é um regulador negativo do operon *mexAB-oprM*, e quando existem mutações nesse regulador, ocorre uma superexpressão da bomba de efluxo *mexAB-oprM*, aumentando a capacidade dessa de bombear as fluoroquinolonas para fora da bactéria, reduzindo a concentração intracelular da droga, levando a apresentar o fenótipo resistente (2). Esse mecanismo está envolvido principalmente com as fluoroquinolonas de terceira geração, como o levofloxacino. Ao comparar os resultados da PCR com os testes fenotípicos, todos os isolados que apresentaram resistência ao levofloxacino amplificaram para o gene *nalD*.

O gene *gyrA* codifica a subunidade A da DNA girase, uma topoisomerase tipo II. O par de primer foi desenhado de forma a identificar mutações nesse gene que podem alterar o sítio alvo, reduzindo a afinidade da subunidade A da DNA girase entre as fluoroquinolonas, promovendo assim a resistência (3). Ao comparar o resultado da PCR com os testes fenotípicos, em alguns pontos, foram encontradas divergências, como é o caso de 7 isolados que apresentaram fenótipo intermediário (sensível em exposição aumentada) para enrofloxacin, embora tenham amplificado para o gene

na PCR. Esses resultados abrem para a discussão da possibilidade desses isolados apresentarem algum outro gene associado no mecanismo da resistência que não foi incluído nesse estudo ou questões ligadas à expressão gênica.

Para o gene *parC*, que codifica para a subunidade C da topoisomerase II, assim como o que ocorre em mutações na *gyrA*, mutações podem alterar o sítio alvo, impedindo que o antimicrobiano se ligue, e o par de primers foi desenhado de modo a detectar a mutação em questão (3). Dos 35 isolados, 20 apresentaram a mutação, sendo que, 5 apresentaram fenótipo resistente às 3 fluoroquinolonas testadas.

O gene *mexB* é responsável por expressar a membrana externa do exportador multidroga do complexo de bomba de efluxo *mexAB-oprM*. Na sua presença, as drogas são bombeadas para fora da célula bacteriana, promovendo assim a resistência (4). O gene foi amplificado em 9 dos 35 isolados, sendo que 5 desses isolados apresentaram fenótipo resistente às 3 fluoroquinolonas testadas, 1 resistente a 2 fluoroquinolonas testadas, 1 resistente a apenas 1 fluoroquinolona, e os demais, apresentaram fenótipo sensível e intermediário, o que pode ser explicado pela presença dos demais genes de resistência estudados.

Por fim, o gene *mexT*, que codifica para o ativador transcricional que regula positivamente a bomba de efluxo *mexEF-oprN*, obteve amplificação em 3 dos 35 isolados, sendo que todos esses 3 isolados apresentaram fenótipo sensível ou intermediário, portanto, esse gene não teve ter relevância no mecanismo de resistência das fluoroquinolonas nos isolados selecionados para esse estudo (2).

## **2. Cefalosporinas de terceira geração antipseudomônicas**

O mecanismo de ação das cefalosporinas, assim como os demais beta-lactâmicos, está envolvido no comprometimento da síntese da parede celular bacteriana. A droga tem capacidade de se ligar às proteínas ligadoras de penicilina (PBP), que são essenciais no processo da construção da parede. Ao bloquear a ação das PBPs, ocorre a interrupção da formação das ligações cruzadas entre as cadeias de peptídeo-glucano (33).

Para analisar a resistência às cefalosporinas, os genes que foram selecionados para esse trabalho que estão associados a esses antimicrobianos são *oprD*, *mexB*, e *GES*, e a cefalosporina utilizada na rotina microbiológica para tratar infecções de origem veterinário de *Pseudomonas* sp. é a ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração.

O gene OprD codifica uma porina de membrana externa que permite a entrada de antimicrobianos, porém na sua ausência, na sua síntese reduzida ou até na síntese da porina mutante, pode levar a uma maior dificuldade de entrada da droga dentro da célula, levando assim à resistência (5). Além das fluoroquinolonas, o gene mexB também pode estar envolvido na resistência às cefalosporinas, uma vez que seu mecanismo não é droga-específico (4). O outro gene selecionado para avaliar a resistência às cefalosporinas foi o GES (*Guiana Extended Spectrum*), um gene que codifica uma enzima beta-lactamase de classe A, sendo que essa é classificada como uma beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), conferindo assim a resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro, que é o caso da ceftazidima (5).

Embora todos os isolados tenham apresentado fenótipo sensível a esse antimicrobiano, 5 isolados amplificaram para o gene oprD, 28 para o GES e 9 para o mexB, o que abre para a discussão da possibilidade de se tratar de casos em que a resistência possa ser apresentada *in vivo*, já que existe a presença do gene, não condizendo com o teste de sensibilidade *in vitro*, levando assim a uma falha terapêutica e reduzindo as alternativas de tratamento.

### **3. Monobactâmico**

Para estudar a resistência aos monobactâmicos, os genes selecionados foram o oprD e o mexB, e a droga testada na clínica veterinária para *Pseudomonas* sp. é o Aztreonam, cujo mecanismo é o mesmo que os demais beta-lactâmicos, com a diferença de que possuem apenas um anel beta-lactâmico em sua estrutura. Todos os isolados que apresentaram fenótipo resistente não amplificaram o gene oprD, o que justificaria a resistência, já que, como explicado anteriormente, o desenho do primer foi realizado a detectar as mutações que não permitem que a droga entre na célula bacteriana (5).

Por outro lado, dos isolados que amplificaram para o gene mexB, apenas 3 apresentaram fenótipo resistente, enquanto os demais apresentaram fenótipo intermediário (4). Essa classificação, segundo o BrCAST, define intermediário como sendo “sensível com exposição aumentada”, que existe altas chances de sucesso terapêutico quando for ajustada a dosagem da droga usada, aumentando a sua concentração. Sendo assim, a diferença entre o fenótipo “sensível” e “intermediário” está na concentração da droga usada (53).

#### 4. Carbapenêmicos

Os genes envolvidos nos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, que foram incluídos nesse estudo, são o oprD, mexB, OXA50 e GES. Na rotina microbiológica veterinária, os carbapenêmicos testados são o Imipenem e o Meropenem, sendo que esses antimicrobianos também são beta-lactâmicos, porém, devido a diferenças químicas na estrutura da molécula, como a presença do anel ciclopentano, confere uma ação mais ampla contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e anaeróbias, além de serem resistentes a maior parte das beta-lactamases, inclusive as ESBL.

O gene OXA50, também chamado de blaOXA50, é uma beta-lactamase de *Pseudomonas* sp. que codifica uma oxacilinase (7). A eficiência desta enzima contra carbapenêmicos é geralmente baixa, mas a presença de outros mecanismos de resistência na bactéria pode contribuir para uma resistência significativa a múltiplas classes de beta-lactâmicos, embora ela tenha atividade principalmente sobre o meropenem e pela piperacilina + tazobactam.

Já o gene GES, também chamado de *Guiana Extended Spectrum*, também é uma beta-lactamase, porém de classe A, logo, funciona como uma ESBL (beta-lactamase de espectro estendido), e como todas as demais beta-lactamases, atua na inativação de beta-lactâmicos. Sua atividade se dá principalmente sobre os carbapenêmicos e as cefalosporinas (5).

Quanto ao imipenem, apenas foram obtidos fenótipos “intermediário” e “resistente”, sendo que, dos “resistentes” (3 isolados), 2 não apresentaram amplificação para o gene oprD, e 1 apresentou amplificação. Quanto ao meropenem, apenas 1 apresentou fenótipo “resistente”, inclusive esse mesmo isolado apresentou resistência ao imipenem e não amplificou para o gene oprD, enquanto todos os outros isolados apresentaram fenótipo “sensível”.

Focando no isolado que apresentou resistência aos 2 carbapenêmicos, esse amplificou para o gene mexB, OXA50 e GES. Os outros dois isolados que apresentaram resistência (apenas ao imipenem), ambos amplificaram apenas para os genes OXA50 e GES.

#### 5. Beta-lactâmico em associação com inibidor de beta-lactamase

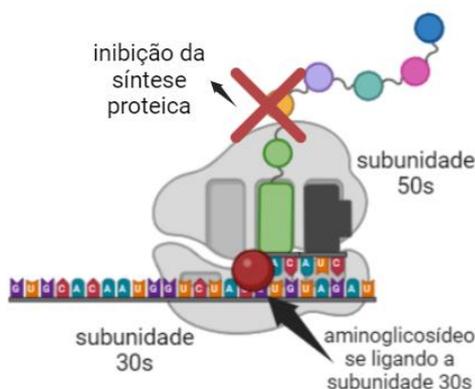
O gene associado a resistência a piperacilina com tazobactam é o OXA50 (7), e uma das alternativas terapêuticas em casos de infecções por *Pseudomonas* sp. é a piperacilina com tazobactam, uma associação entre beta-lactâmico e inibidor de beta-lactamase, respectivamente.

A piperacilina, assim como os demais beta-lactâmicos, atua na inibição da síntese da parede celular da bactéria. Já o tazobactam, por ser um inibidor de beta-lactamase, atua inibindo a ação de alguma beta-lactamase, caso a bactéria a produza, potencializando assim o efeito do beta-lactâmico em questão, a piperacilina, levando ao sucesso do tratamento.

Para esse gene, 24 isolados amplificaram, porém, todos os isolados incluídos apresentaram fenótipo intermediário, o que pode indicar a necessidade de utilizar uma dosagem maior da droga caso essa seja a alternativa terapêutica de escolha.

## 6. Aminoglicosídeos

Os genes envolvidos nos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos incluídos no estudo foram os *ant(2'')*-Ia e o *aac(3)*-Ia. Essa classe de antimicrobianos atuam na inibição da síntese proteica nas bactérias, ligando-se á subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Quando são usados para tratar infecções por *Pseudomonas* sp., os aminoglicosídeos de escolha são gentamicina, ampicacina ou tobramicina (**Figura 4**).



**Figura 4:** Modelo esquemático do mecanismo de ação dos aminoglicosídeos. Figura autoral.

O gene *ant(2'')*-Ia codifica uma enzima chamada aminoglicosídeo-2''-O-nucleotidiltransferase, que catalisa a reação de transfrência de um grupo AMP de um substrato ATP, processo chamado adenilação. Quando esse processo ocorre, a inativação do aminoglicosídeo é estabelecida, levando a resistência (8).

Já o gene *aac(3)*-Ia codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeos (em especial a gentamicina), a 3-*N*-aminoglicosídeo acetiltransferase, que atua na acetilação de grupos hidroxila

do aminoglicosídeo, levando assim a sua modificação, e conseqüentemente, dificultando a sua ligação a subunidade 30S do ribossomo, o que gera a resistência (8).

De todos os isolados, nenhum obteve amplificação de nenhum dos dois genes, com exceção de um isolado, que apresentou amplificação para o gene *aac(3)-Ia*, entretanto, esse isolado apresentou fenótipo sensível para os três aminoglicosídeos testados. É possível que, mesmo que esse isolado tenha apresentado o fenótipo sensível, a resistência se apresente após uma exposição prolongada à droga

Embora quase todos os isolados tenham apresentado fenótipo “sensível” ou “intermediário” aos 3 aminoglicosídeos testados, 2 isolados apresentaram fenótipo “resistente” à tobramicina, enquanto 1 isolado apresentou o fenótipo “não suscetível”, que indica a possibilidade de falha terapêutica ao utilizar essa droga, podendo apresentar a resposta “resistente” ou “intermediário” em doses usuais da droga, mas que não foi utilizado o termo “resistente” após realizado o teste de sensibilidade por não haver a certeza de que não é uma alternativa terapêutica.

### **Conclusão**

Realizar o controle e vigilância da circulação dos genes de resistência em *Pseudomonas* spp. de origem veterinária na comunidade, além de estudar os seus mecanismos moleculares, é fundamental para criar medidas de controle da disseminação dessa resistência; E discrepâncias encontradas entre fenótipo e genótipo da resistência nos isolados avaliados sugerem a participação de outros genes e mecanismos, além da possibilidade da falha terapêutica ocorrer devido a diferença entre a expressão gênica *in vitro* e *in vivo*, evidenciando assim a necessidade de ampliar as análises moleculares. Além disso, considerando a abordagem “one health”, esse controle é fundamental para garantir que os genes de resistência tenham a sua circulação dificultada em humanos, animais e no meio ambiente, promovendo assim a saúde de todos esses sistemas como um só.

## Referências

- 1- Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jun;48(6):2043-8. doi: 10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004. PMID: 15155197; PMCID: PMC415580.
- 2- Mar Solé M, et al. In vivo evolution of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients admitted to an intensive care unit: mechanisms of resistance and antimicrobial exposure. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Nov;70(11):3004-13.
- 3- Akasaka T, et al. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Aug;45(8):2263-8.
- 4- Serra C. MexXY multidrug efflux system is more frequently overexpressed in ciprofloxacin-resistant French clinical isolates compared to hospital environment ones [Internet]. *Front Microbiol*. 2019 [cited 2024 Aug 26].
- 5- Horna G, et al. High frequency of the *exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>+</sup> genotype associated with multidrug-resistant "high-risk clones" of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep*. 2019 Jul 26;9(1).
- 6- BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. [cited 2023 Aug 4]. Available from: <https://brcast.org.br/>
- 7- EUCAST: New S, I and R definitions [Internet]. [citado 4 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://www.eucast.org/newsiandr>
- 8- El Zowalaty M, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol*. 2015 Oct;10(10):1683-706.
- 9- Castanheira M, et al. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including *Enterobacteriaceae* molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Sep 14.

- 10- Nayara I, et al. Comparação fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* spp. recuperados de infecções associadas a implantes ortopédicos com falha de tratamento. Braz J Infect Dis. 2022 Sep 1;26:102403-102403.
- 11- Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022 - World | ReliefWeb [Internet]. 2022 [citado 31 de julho de 2023]. Disponível em: <https://reliefweb.int/report/world/global-antimicrobial-resistance-and-use-surveillance-system-glass-report-2022>
- 12- Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 2022 Feb;399(10325):629–55.
- 13- Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) [Internet]. [citado 31 de julho de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/glass>
- 14- WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. [citado 31 de julho de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- 15- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018 Mar 1;18(3):318–27.
- 16- Jin M, Osman M, Green BA, Yang Y, Ahuja A, Lu Z, et al. Evidence for the transmission of antimicrobial resistant bacteria between humans and companion animals: A scoping review. One Health Amst Neth. 2023 Dec;17:100593.
- 17- Rincón-Real AA, Suárez-Alfonso MC. Carbapenem resistance in critically important human pathogens isolated from companion animals: a systematic literature review. Osong Public Health Res Perspect. 2022 Dec;13(6):407–23.
- 18- Iseppi R, Di Cerbo A, Messi P, Sabia C. Antibiotic resistance and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing (ESBL/AmpC) Enterobacteriaceae from humans and pets. Antibiot Basel Switz. 2020 Mar 31;9(4):152.
- 19- Martins E, Maboni G, Battisti R, da Costa L, Selva HL, Levitzki ED, et al. High rates of multidrug resistance in bacteria associated with small animal otitis: A study of cumulative microbiological culture and antimicrobial susceptibility. Microb Pathog. 2022 Apr;165:105399.4<sup>o</sup>

- 20- Ministério da Agricultura e Pecuária [Internet]. Mapa implementa Programa de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos. [citado 1o de agosto de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-aprova-programa-de-vigilancia-da-resistencia-aos-antimicrobianos>
- 21- Reynolds D, Kollef M. The epidemiology, pathogenesis, and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs*. 2021 Nov 7;81(18):2117–31.
- 22- Cabrera R, Fernández-Barat L, Vázquez N, Alcaraz-Serrano V, Bueno-Freire L, Amaro R, et al. Resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with bronchiectasis. *J Antimicrob Chemother*. 2022 May 29;77(6):1600-1610. doi: 10.1093/jac/dkac084. PMID: 35323912; PMCID: PMC9155640.
- 23- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 24- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Current protocols in molecular biology*. 2001.
- 25- Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol*. 2019;4(9):1432-1442.
- 26- Gholami A, Majidpour A, Talebi-Taher M, Boustanshenas M, Adabi M. PCR-based assay for the rapid and precise distinction of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from burns patients. *J Prev Med Hyg*. 2016;57(2)
- 27- Riccio ML, Docquier JD, Dell'Amico E, Luzzaro F, Amicosante G, Rossolini GM. Novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(5):1746-1748. doi: 10.1128/AAC.47.5.1746-1748.
- 28- Kao CY, Udval U, Huang YT, Wu HM, Huang AH, Bolormaa E, Yan JJ, Urangoo Z, Batbaatar G, Khosbayar T, Wu JJ. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates in Mongolia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49(5):692-700. doi: 10.1016/j.jmii.2015.05.009.
- 29- Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadjji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, Banla-Kere A, Karou S, Simpore J. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:104. doi: 10.1186/s13756-019-0552-0.

- 30- Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadjı AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, Banla-Kere A, Karou S, Simpore J. Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:104. doi: 10.1186/s13756-019-0552-0.
- 31- Gniadek TJ, Carroll KC, Simner PJ. Carbapenem-resistant non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. *J Clin Microbiol*. 2016;54(7):1700–10. doi: 10.1128/JCM.03264-15.
- 32- Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Apr 1;72(4):957–68.
- 33- Bui T, Patel P, Preuss CV. Cephalosporins. [Updated 2024 Feb 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>
- 34- Pires EJVC, Silva Júnior VV da, Lopes AC de S, Veras DL, Leite LE, Maciel MAV. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Rev bras ter intensiva* [Internet]. 2009 Oct;21(4):384–90. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2009000400008>
- 35- Niederman MS, Torres A. Severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir Rev*. 2022;31(166):220123. Available from: <https://doi.org/10.1183/16000617.0123-2022>

## Anexo

AMOSTRA	ANTIMICROBIANOS			GENES					AMOSTRA	ANTIMICROBIANOS			GENES				
	ENO	LEV	CIP	nalD	mexT	mexB	gyrA	parC		ENO	LEV	CIP	nalD	mexT	mexB	gyrA	parC
P1-Φ	-	-	±	-	-	-	+	+	P20-C	+	+	+	+	-	+	-	-
P2-Θ	+	+	+	+	-	+	+	+	P21-U	±	-	±	+	-	-	+	+
P3-C	+	+	±	+	-	+	-	+	P22-C	+	-	±	+	-	-	-	-
P4-Φ	±	-	±	+	-	+	+	+	P23-Θ	+	+	+	+	-	-	+	+
P5-Θ	+	+	+	+	-	+	+	+	P24-Φ	±	-	±	+	-	-	+	-
P6-Θ	+	-	±	+	-	-	-	-	P25-Θ	±	-	±	+	-	-	+	+
P7-Θ	±	-	±	+	-	-	-	+	P26-Θ	-	-	±	+	-	-	-	+
P8-Θ	+	+	+	+	-	+	-	+	P27-Θ	±	-	±	+	-	-	-	-
P9-Φ	±	-	±	+	-	-	+	+	P28-Θ	-	-	±	+	-	-	-	+
P10-C	+	-	±	+	-	-	-	+	P29-N	±	-	±	+	+	-	-	+
P11-Θ	-	-	-	+	-	-	+	+	P30-Θ	+	+	+	+	-	-	-	-
P12-Θ	+	-	±	+	-	-	+	-	P31-Θ	+	+	+	+	-	-	-	+
P13-C	-	-	±	-	-	-	+	-	P32-Θ	-	-	±	+	-	-	-	-
P14-Φ	+	-	±	+	-	-	+	-	P33-N	±	-	±	+	-	-	-	+
P15-C	+	-	±	-	-	+	-	+	P34-C	+	-	±	+	-	-	-	-
P16-N	-	-	±	+	+	+	-	+	P35-TR	±	-	±	+	-	-	-	-
P17-Θ	±	-	±	+	-	-	+	-									
P18-Θ	±	-	±	+	-	-	+	-									
P19-Θ	+	+	+	+	-	+	-	-									

**Anexo 1:** Dados do fenótipo de resistência às fluoroquinolonas dos isolados, sendo: **ENO** (enrofloxacino), **LEV** (levofloxacino), **CIP** (ciprofloxacino), - (sensível), ± (intermediário), + (resistente); E dados da presença dos genes de resistência nos isolados, sendo: + (presença), - (ausência)

AMOSTRA	ANTIMICROBIANO	GENES			AMOSTRA	ANTIMICROBIANO	GENES		
	CAZ	oprD	mexB	GES		CAZ	oprD	mexB	GES
P1-Φ	-	-	-	-	P20-C	-	-	+	+
P2-Θ	-	+	+	+	P21-U	-	-	-	+
P3-C	-	+	+	+	P22-C	-	-	-	+
P4-Φ	-	-	+	+	P23-Θ	-	+	-	+
P5-Θ	-	-	+	+	P24-Φ	-	-	-	+
P6-Θ	-	-	-	-	P25-Θ	-	-	-	-
P7-Θ	-	-	-	-	P26-Θ	-	-	-	+
P8-Θ	-	-	+	+	P27-Θ	-	-	-	+
P9-Φ	-	±	-	+	P28-Θ	-	-	-	+
P10-C	-	+	-	+	P29-N	-	-	-	-
P11-Θ	-	+	-	+	P30-Θ	-	-	-	+
P12-Θ	-	-	-	-	P31-Θ	-	-	-	+
P13-C	-	-	-	+	P32-Θ	-	-	-	+
P14-Φ	-	-	-	+	P33-N	-	-	-	+
P15-C	-	-	+	+	P34-C	-	-	-	+
P16-N	-	-	+	+	P35-TR	-	-	-	+
P17-Θ	-	-	-	+					
P18-Θ	-	-	-	+					
P19-Θ	-	-	+	+					

**Anexo 2:** Dados do fenótipo de resistência à cefalosporina, sendo: **CAZ** (ceftazidima), - (sensível), ± (intermediário), + (resistente); E dados da presença dos genes de resistência nos isolados, sendo: + (presença), - (ausência), NA (não avaliado)

AMOSTRA	ANTIMICROBIANO	GENES		AMOSTRA	ANTIMICROBIANO	GENES	
	AZTREONAM	oprD	mexB		AZTREONAM	oprD	mexB
P1-Φ	+	-	-	P20-C	+	-	+
P2-Θ	NA	+	+	P21-U	±	-	-
P3-C	±	+	+	P22-C	±	-	-
P4-Φ	+	-	+	P23-Θ	±	+	-
P5-Θ	±	-	+	P24-Φ	±	-	-
P6-Θ	±	-	-	P25-Θ	±	-	-
P7-Θ	±	-	-	P26-Θ	±	-	-
P8-Θ	±	-	+	P27-Θ	±	-	-
P9-Φ	±	-	-	P28-Θ	±	-	-
P10-C	±	+	-	P29-N	±	-	-
P11-Θ	±	+	-	P30-Θ	±	-	-
P12-Θ	±	-	-	P31-Θ	±	-	-
P13-C	±	-	-	P32-Θ	±	-	-
P14-Φ	±	-	-	P33-N	±	-	-
P15-C	±	-	+	P34-C	±	-	-
P16-N	±	-	+	P35-TR	±	-	-
P17-Θ	±	-	-				
P18-Θ	±	-	-				
P19-Θ	+	-	+				

**Anexo 3:** Dados do fenótipo de resistência ao monobactâmico dos isolados, sendo: **ATM** (aztreonam), -, (sensível), ± (intermediário), + (resistente); E dados da presença dos genes de resistência nos isolados, sendo: + (presença), - (ausência), NA (não avaliado)

AMOSTRA	ANTIMICROBIANOS		GENES				AMOSTRA	ANTIMICROBIANOS		GENES			
	IPM	MER	oprD	mexB	OXA50	GES		IPM	MER	oprD	mexB	OXA50	GES
P1-Φ	±	-	-	-	+	-	P20-C	±	-	-	+	-	+
P2-Θ	±	-	+	+	+	+	P21-U	±	-	-	-	+	+
P3-C	±	-	+	+	+	+	P22-C	±	-	-	-	+	+
P4-Φ	+	+	-	+	+	+	P23-Θ	+	-	+	-	+	+
P5-Θ	±	-	-	+	+	+	P24-Φ	±	-	-	-	-	+
P6-Θ	±	-	-	-	-	-	P25-Θ	±	-	-	-	+	-
P7-Θ	±	-	-	-	+	-	P26-Θ	±	-	-	-	+	+
P8-Θ	±	-	-	+	+	+	P27-Θ	±	-	-	-	-	+
P9-Φ	±	-	-	-	+	+	P28-Θ	±	-	-	-	+	+
P10-C	±	-	+	-	+	+	P29-N	±	-	-	-	+	-
P11-Θ	±	-	+	-	+	+	P30-Θ	±	-	-	-	-	+
P12-Θ	±	-	-	-	-	-	P31-Θ	+	-	-	-	+	+
P13-C	±	-	-	-	-	+	P32-Θ	±	-	-	-	-	+
P14-Φ	±	-	-	-	-	+	P33-N	±	-	-	-	-	+
P15-C	±	-	-	+	+	+	P34-C	±	-	-	-	+	+
P16-N	±	-	-	+	+	+	P35-TR	±	-	-	-	+	+
P17-Θ	±	-	-	-	-	+							
P18-Θ	±	-	-	-	-	+							
P19-Θ	±	-	-	+	+	+							

**Anexo 4:** Dados do fenótipo de resistência as carbapenêmicos, sendo: **IMI** (imipenem), **MER** (meropenem), - (sensível), ± (intermediário), + (resistente); E dados da presença dos genes de resistência nos isolados, sendo: + (presença), - (ausência)

AMOSTRA	ANTIMICROBIANO	GENE	AMOSTRA	ANTIMICROBIANO	GENE
	PPT	OXA50		PPT	OXA50
P1-Φ	±	+	P20-C	±	-
P2-Θ	±	+	P21-U	±	+
P3-C	±	+	P22-C	±	+
P4-Φ	±	+	P23-Θ	±	+
P5-Θ	±	+	P24-Φ	±	-
P6-Θ	±	-	P25-Θ	±	+
P7-Θ	±	+	P26-Θ	±	+
P8-Θ	±	+	P27-Θ	±	-
P9-Φ	±	+	P28-Θ	±	+
P10-C	±	+	P29-N	±	+
P11-Θ	±	+	P30-Θ	±	-
P12-Θ	±	-	P31-Θ	±	+
P13-C	±	-	P32-Θ	±	-
P14-Φ	±	-	P33-N	±	-
P15-C	±	+	P34-C	±	+
P16-N	±	+	P35-TR	±	+
P17-Θ	±	-			
P18-Θ	±	+			
P19-Θ	±	+			

**Anexo 5:** Dados do fenótipo de resistência ao beta-lactâmico em associação com inibidor de beta-lactamase, sendo: **PPT** (piperacilina + tazobactam), - (sensível), ± (intermediário), + (resistente); E dados da presença dos genes de resistência nos isolados, sendo: + (presença), - (ausência)

AMOSTRA	ANTIMICROBIANOS			GENES		AMOSTRA	ANTIMICROBIANOS			GENES	
	GEN	AMI	TOB	ant(2'')-IA	aac(3)-IA		GEN	AMI	TOB	ant(2'')-IA	aac(3)-IA
P1-Φ	-	-	+	-	-	P20-C	-	-	-	-	-
P2-Θ	±	-	NS	-	-	P21-U	-	-	-	-	-
P3-C	-	-	-	-	-	P22-C	-	-	-	-	-
P4-Φ	-	-	-	-	-	P23-Θ	-	-	-	-	-
P5-Θ	-	-	-	-	-	P24-Φ	-	-	-	-	-
P6-Θ	-	-	-	-	-	P25-Θ	-	-	-	-	-
P7-Θ	-	-	-	-	-	P26-Θ	-	-	-	-	-
P8-Θ	-	-	-	-	-	P27-Θ	-	-	-	-	-
P9-Φ	-	-	+	-	-	P28-Θ	-	-	-	-	-
P10-C	-	-	-	-	-	P29-N	-	-	-	-	-
P11-Θ	-	-	-	-	-	P30-Θ	-	-	-	-	-
P12-Θ	±	-	-	-	-	P31-Θ	-	-	-	-	-
P13-C	-	-	-	-	+	P32-Θ	-	-	-	-	-
P14-Φ	-	-	-	-	-	P33-N	-	-	-	-	-
P15-C	-	-	-	-	-	P34-C	-	-	-	-	-
P16-N	-	-	-	-	-	P35-TR	-	-	-	-	-
P16-N	-	-	-	-	-	P34-C	-	-	-	-	-
P17-Θ	-	-	-	-	-	P35-TR	-	-	-	-	-
P18-Θ	-	-	-	-	-						
P19-Θ	-	-	-	-	-						

**Anexo 6:** Dados do fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos dos isolados, sendo: **GEN** (gentamicina), **AMI** (amicacina), **TOB** (tobramicina), - (sensível), ± (intermediário), + (resistente); E dados da presença dos genes de resistência nos isolados, sendo: + (presença), - (ausência), NS (não suscetível)

## Agradecimentos

Dedico esse trabalho às seguintes pessoas:

Aos meus pais, Valéria dos Santos e Cláudio Minkovicius, por me darem a vida, um lar, minha educação, por serem minhas inspirações e por serem a luz da minha vida.

Ao meu irmão Gustavo Minkovicius, por ser o melhor amigo que sempre pedi a Deus e a alma mais bonita que tive o prazer de conhecer.

Às minhas colegas de laboratório Isabella Orlandino, Danielly Carmagnani, Giovana Montilha, Gabriela Kim e Caroline Peres, por todas as tardes no laboratório, todas as risadas e toda parceria durante os anos da minha graduação, e em especial, a Rafaela Espinosa, por ser a minha dupla de TCC individual, por estar comigo em todos os momentos de dificuldade, onde nos apoiamos e brincamos, tornando os momentos mais difíceis muito mais leves.

À minha orientadora e mãe científica Marjorie Marini, por me acompanhar por 3 anos e me fornecer tantos aprendizados, acadêmicos, científicos e sobre a vida.

Ao Centro de Genômica, por auxiliar no desenvolvimento do meu pensamento crítico e científico, onde tive a possibilidade de desenvolver as minhas habilidades.

Aos meus irmãos de outra mãe Rafael Orlandino, Giovana Fontana e Giovana Rudzevicius, por serem o abraço apertado e o ombro amigo que sempre estiveram disponíveis durante toda a elaboração

desse trabalho.

Por fim, à Deus, por sempre me mostrar o caminho de luz a ser seguido, me ajudando a ser uma profissional com ética e uma pessoa com uma alma boa.

Sem vocês, a minha jornada acadêmica não teria sido tão boa, pois mesmo com todas as dificuldades, vocês sempre estiveram alí.

Com todo o meu coração, muito obrigada.