

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

DRIELE SOUZA E SILVA

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A FÁRMACOS  
ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS DE AMOSTRAS DE  
*Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

Belo Horizonte

2022

Driele Souza e Silva

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A FÁRMACOS  
ANTIMICROBIANOS E METAIS PESADOS DE AMOSTRAS DE  
*Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Paula Prazeres Magalhães  
Coorientadores: Vera Lúcia dos Santos  
Luiz de Macêdo Farias

Belo Horizonte

2022

043 Silva, Driele Souza e.

Avaliação fenotípica da resistência a fármacos antimicrobianos e metais pesados de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados [manuscrito] / Driele Souza e Silva. – 2022.

78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Paula Prazeres Magalhães. Coorientadores: Vera Lúcia dos Santos; Luiz de Macêdo Farias.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS- GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **DRIELE SOUZA E SILVA**

Nº REGISTRO: **2020659179**

Às 14:00 horas do dia **10 de outubro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Simone Gonçalves dos Santos (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Monica Larucci Vieira (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães (Orientadora), Vera Lúcia dos Santos (Coorientadora) e Luiz de Macêdo Farias (Coorientador) para julgar o trabalho final "**Avaliação fenotípica da resistência a fármacos antimicrobianos e metais pesados de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados**", da aluna **DRIELE SOUZA E SILVA**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 10 de outubro de 2022

Membros da banca:

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Profa.Dr. Monica Larucci Vieira

De acordo:

Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães(Orientadora)

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos(Coorientadora)

Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias



Documento assinado eletronicamente por **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 14/10/2022, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monica Larucci Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 14/10/2022, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 14/10/2022, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia dos Santos, Servidor(a)**, em 14/10/2022, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 15/10/2022, às 18:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz de Macedo Farias, Professor do Magistério Superior**, em 17/10/2022, às 22:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1760201** eo código CRC **27F56CDB**.

## **COLABORAÇÃO**

João Fernando Gonçalves Ferreira

Pós- doutorando

UFMG

Letícia Faria Noronha

Mestranda, Departamento de Microbiologia

Letícia Lima Ribeiro

Iniciação Científica, Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

## **APOIO FINANCEIRO**

CNPq

CAPES

FAPEMIG

PRPq/UFMG

## RESUMO

Fármacos antimicrobianos representam um recurso fundamental na medicina, com impactos imensuráveis nas abordagens terapêuticas, entretanto a disseminação da resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos é um grande desafio para os profissionais da saúde. Metais pesados são elementos naturais presentes em vários ecossistemas, não obstante atividades antropogênicas estão favorecendo o acúmulo de metais pesados que em consequência, selecionam e contribuem com a promoção da resistência bacteriana. *Pseudomonas aeruginosa*, um bastonete Gram-negativo não fermentador, é considerado um patógeno oportunista, muito relevante, em especial, como agente de infecções relacionadas à assistência à saúde. Este estudo visa a avaliação fenotípica de 44 espécimes clínicos hospitalares de *P. aeruginosa* a 1 antimicrobianos: Quais sejam, meropenem, amicacina, ceftazidima, piperacilina+tazobactam e ciprofloxacino, bem como 4 metais pesados: Zinco, prata, cádmio e cobre. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi determinado pela avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e, para metais pesados, foram feitos testes em meio sólido [*Tryptic Soy Agar* (TSA)] e líquido [*Mueller Hinton Broth* (MHB)]. Os resultados identificaram maiores percentuais de resistência a fármacos  $\beta$ -lactâmicos, entre eles, em especial, ceftazidime. Com relação aos metais pesados, taxas elevadas de resistência a zinco, cádmio e cobre foram detectadas. Observou-se aumento considerável da CIM de prata para a maioria das amostras, o que representa um sinal de alerta ao uso deste metal na prática clínica. A resistência a fármacos antimicrobianos e a metais pesados é uma realidade preocupante e todos os esforços no sentido de controlar sua evolução devem ser evitados.

Palavras-chave: Resistência a antimicrobianos; metais pesados; *P. aeruginosa*.

## ABSTRACT

Antimicrobial drugs represent a fundamental resource in medicine, with immeasurable impacts on therapeutic approaches, however the dissemination of bacterial resistance to antimicrobial drugs is a major challenge for health professionals. Heavy metals are natural elements present in various ecosystems, although anthropogenic activities are favoring the accumulation of heavy metals that consequently select and contribute to the promotion of bacterial resistance. *Pseudomonas aeruginosa*, a non-fermenting Gram-negative rod, is considered an opportunistic pathogen, especially as an agent of healthcare-related infections. This study aims at the phenotypic evaluation of 44 hospital clinical specimens of *P. aeruginosa* to 5 antimicrobials: meropenem, ampicillin, ceftazidime, piperacillin+tazobactam and ciprofloxacin, as well as 4 heavy metals: Zinc, silver, cadmium and copper. The antimicrobial susceptibility profile was determined by the evaluation of the minimum inhibition concentration (MIC) and, for heavy metals, tests were performed on solid medium [Tryptic Soy Agar (TSA)] and liquid [Mueller Hinton Broth (MHB)]. The results identified higher percentages of resistance to  $\beta$ -lactam drugs, among them, especially ceftazidime. Regarding heavy metals, high rates of resistance to zinc, cadmium and copper were detected. A considerable increase in silver MIC was observed for most samples, which represents a warning sign for the use of this metal in clinical practice. Resistance to antimicrobial drugs and heavy metals is a worrying reality and all efforts to control their evolution should be avoided.

Keywords: Antimicrobial resistance; heavy metals; *P. Aeruginosa*

## LISTA DE QUADRS

Quadro 1. Fármacos antimicrobianos testados contra amostras de *P. aeruginosa*....39

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Principais alvos de ação de fármacos antimicrobianos .....  | 15 |
| Figura 2- Principais mecanismos de resistência a fármacos antibacterianos. ....   | 17 |
| Figura3- Estimativa de mortalidade em 2050 em comparação com outras mortalidades causadas por doenças graves.....   | 19 |
| Figura 4- Mecanismo bacteriano de efluxo ativo de metais pesados .....  | 31 |
| Figura 5- Antibiograma método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de amostras de <i>P. aeruginosa</i> ..... | 41 |
| Figura 6- Avaliação do perfil de suscetibilidade ao zinco em meio sólido .....  | 44 |
| Figura 7- Avaliação do perfil de suscetibilidade ao cobre e a prata em meio líquido....   | 44 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| Gráfico 1- Perfil de Susceptibilidade a fármacos antimicrobianos das 44 amostras de <i>P. aeruginosa</i> baseados no CLSI.....                | 43 |
| Gráfico 2- Perfil de Susceptibilidade a fármacos antimicrobianos das 44 amostras de <i>P. aeruginosa</i> baseados no BrCAST.....              | 43 |
| Gráfico 3- Perfil de Susceptibilidade de 44 amostras de <i>P. aeruginosa</i> a metais pesados em meio <i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA) .....     | 46 |
| Gráficos 4- Perfil de Susceptibilidade de 44 amostras de <i>P. aeruginosa</i> a metais pesados em meio <i>Mueller Hinton broth</i> (MHB)..... | 46 |
| Gráfico 5- Perfil de distribuição das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função da distância dos dados multivariados.....           | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMI: amicacina

Ag: prata

ARG: gene de resistência a antimicrobianos

AttI: sítio de recombinação

BHI: *Brain Heart Infusion*

BrCAST: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CAZ: ceftazidima

Cd: cádmio

CIM: concentração inibitória mínima

CIP: ciprofloxacino

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CTX-M: cefotaximases

CN: carbapenemase Nordmann-Poirel

Cu: cobre

DNA: ácido desoxirribonucleico

Es $\beta$ L:  $\beta$ -lactamase de espectro estendido

ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*

HGT: transferência horizontal de genes

IGs: Ilhas genômicas

IRAS: infecções relacionadas à assistência à saúde

*intl*: gene que codifica integrase classe I

Inc: grupo de incompatibilidade de plasmídeo

IMP: imipenemase

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

M $\beta$ LS: metalobetalactamases

MDR: resistente a múltiplos antimicrobianos (*multidrug-resistant*)

MER: meropenem

MHA: *Mueller Hinton Agar*

MHB: *Mueller Hinton Broth*

MCR-1: gene plasmidial de resistência à colistina (*mobile colistin resistance*)

NDM: Nova Deli metalobetalactamase

nm: nanômetro

OMS: Organização Mundial da Saúde

OXA: oxacilinases

PAP: perfil populacional

Pb: pares de bases

PCR: reação de polimerização em cadeia

PPT: piperacilina + tazobactam

RAM: resistência antimicrobiana

Rpm: rotação por minuto

SHV: variável sulfidril

TEM: enzima Temoneira

Tns: tranpósons

TSA: *Tryptic Soy Agar*

UFC: unidade formadora de colônia

UTI: unidade de terapia intensiva

UV: ultravioleta

VIM: verona imipenemase

XDR: extensivamente resistente a antimicrobianos

Zn: zinco

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>15</b> |
| 1.1      | FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS: HISTÓRICO E ASPECTOS GERAIS                               | 15        |
| 1.2      | PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS                              | 16        |
| 1.3      | BASES GENÉTICAS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS                | 20        |
| 1.4      | MICROORGANISMOS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA - O GRUPO ESKAPE                              | 23        |
| 1.4.1    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 23        |
| 1.4.2    | Patogenicidade  | 25        |
| 1.4.3    | Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> a antimicrobianos                           | 26        |
| 1.5      | RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS  | 29        |
| 1.6      | RESISTÊNCIA BACTERIANA NA PERSPECTIVA DE ONE HEALTH                                 | 32        |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b>  | <b>34</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>35</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL  | 35        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 35        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>36</b> |
| 4.1      | AMOSTRAS BACTERIANAS ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS                           | 36        |
| 4.2      | CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE TAXONÔMICA DAS AMOSTRAS BACTERIANAS                       | 36        |
| 4.3      | DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO | 37        |
| 4.3.1    | Preparo do antimicrobiano   | 37        |
| 4.3.2    | Preparo das microplacas   | 37        |
| 4.3.3    | Preparação do inóculo   | 38        |
| 4.3.4    | Adição do inóculo na placa  | 38        |
| 4.3.5    | Leitura do teste  | 38        |
| 4.4      | DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE METAIS PESADOS                             | 39        |
| 4.4.1    | Determinação do perfil de resistência das bactérias a metais pesados em             |           |

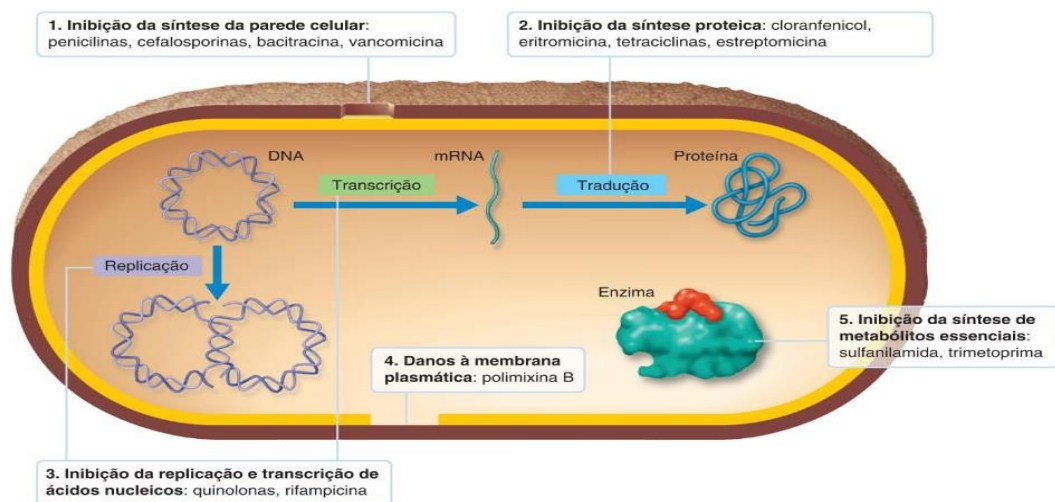
|  |           |
|--|-----------|
| meio sólido.....   | 39        |
| 4.2.2 Determinação do perfil de resistência a metais pesados em meio líquido.....  | 40        |
| 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 40        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>41</b> |
| 5.1 PERFIL de SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS.....  | 41        |
| 5.2 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESTUDADAS com base no CLSI E BrCAST..... | 42        |
| 5.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS.....  | 44        |
| 5.3.1 Perfil de Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> ao Zinco.....  | 45        |
| 5.3.2 Perfil de Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> ao Cádmio.....   | 45        |
| 5.3.3 Perfil de Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> ao Cobre.....  | 45        |
| 5.3.4 Perfil de Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> à Prata.....   | 45        |
| 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....   | 47        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>9. ANEXO.....</b>   | <b>76</b> |

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS: HISTÓRICO E ASPECTOS GERAIS

Os fármacos antimicrobianos são compostos naturais, semissintéticos ou sintéticos, capazes de interromper a multiplicação ou causar a morte de microrganismos por diversos mecanismos (LIWA e JAKA, 2015; PREMANANDH *et al.*, 2016). Nas células bacterianas, eles atuam interferindo na síntese da parede celular, de proteínas, de ácidos nucleicos e de metabólitos essenciais (metabolismo do ácido fólico) ou interferindo na estrutura da membrana plasmática (LIWA e JAKA, 2015). A figura 1 mostra os principais alvos de ação de alguns fármacos antibacterianos.

Figura 1: Principais alvos de ação de fármacos antibacterianos.



Fonte: Modificado de TORTORA; FUNKE; KASE, 2017

A introdução de fármacos antimicrobianos na prática médica teve um impacto enorme na terapêutica, sendo considerada uma verdadeira revolução no combate a agentes infecciosos patogênicos (ALÓS, 2015). Considera-se que a quimioterapia, um marco da medicina moderna, foi criada em 1909 por Paul Ehrlich que, na busca por uma substância química que tivesse ação antimicrobiana, desenvolveu um composto

a base de arsênio, denominado de 606. Essa denominação deu-se devido as 605 tentativas feitas por ele para a modificação do composto que, posteriormente, alcançou sucesso e, assim, foi comercializado. A substância foi denominada como Salvarsan, que em latim significa “salve”, mostrando-se eficaz para o tratamento de pacientes com sífilis, o que teve repercussões profundas e mudou o rumo da história na terapêutica na área da infectologia. Seguiu-se, então, a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928, e das sulfonamidas, pelo médico Gerard Domagk, em 1930 (ARAÚJO, 2013).

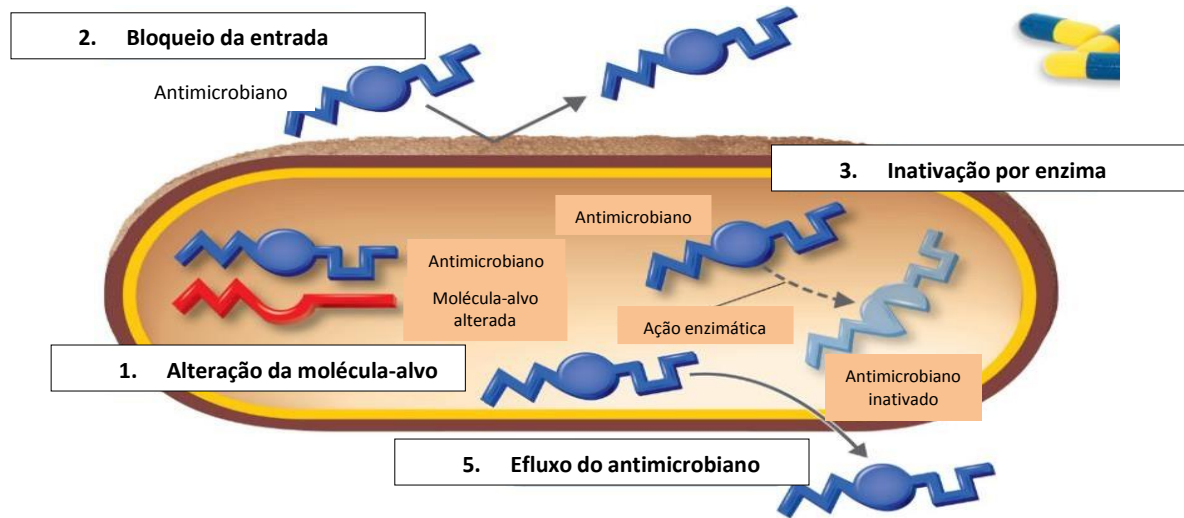
Seguindo-se à descoberta da penicilina por meio fungo *Penicillium*, passou-se a buscar outras substâncias com atividade antimicrobiana a partir de microrganismos. Assim, foram relatadas, por exemplo, a estreptomicina, produzida pelo gênero *Streptomyces*, e a cefalosporina, produzida pelo fungo *Cephalosporium* (VON NUSSBAUM, *et al.*, 2006; FERNANDES, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2010). Essa era de busca por compostos naturais foi, então, sucedida por um período de desenvolvimento de novos antimicrobianos baseado em mudanças estruturais de moléculas naturais descobertas, nomeados de semissintéticos (WALSH, 2004; PEREIRA *et al.*, 2016).

A princípio, os fármacos antimicrobianos foram eficazes no controle de infecções causadas por diversos agentes bacterianos, provendo tratamento para milhões de pessoas em várias partes do mundo (PONTES *et al.*, 2018). Entretanto, tem se observado nítida redução da eficácia desse grupo de medicamentos, relacionada à ocorrência de bactérias resistentes a eles (ALÓS, 2015).

## 1.2 PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

As células bacterianas podem apresentar várias estratégias que conferem resistência a fármacos antimicrobianos. Entre elas, citam-se inativação do antimicrobiano, modificação do local alvo de ligação do antimicrobiano, redução da permeabilidade celular ao antimicrobiano e ativação de bombas de efluxo, que permitem a expulsão do antimicrobiano da célula (FIGURA 2). A capacidade de formação de biofilme também vem sendo incluída nesse grupo de propriedades que conferem proteção contra a ação de fármacos antimicrobianos (SANTAJIT e INDRAWATTANA, 2016).

Figura 2: Principais mecanismos de resistência a fármacos antibacterianos.



Fonte: Modificado de TORTORA; FUNKE; KASE, 2017

A resistência bacteriana aos fármacos antimicrobianos é um dos maiores desafios enfrentados por profissionais da área de saúde em todo o mundo. Caracteriza-se pela habilidade do microrganismo de sobreviver e manter sua capacidade de multiplicação na presença de agentes antimicrobianos (PONTES *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019).

Duas formas básicas de resistência a fármacos antimicrobianos podem ser distinguidas, quais sejam, resistência intrínseca e resistência adquirida. A resistência intrínseca corresponde à capacidade natural das bactérias de resistir a fármacos específicos. Ela decorre de características inerentes ao microrganismo, por exemplo, pela ausência do alvo do antimicrobiano. Por exemplo, pacientes com infecções causadas por bactérias do gênero *Mycoplasma* não devem ser tratados com antimicrobianos beta-lactâmicos, uma vez que o agente não possui parede celular, alvo de ação do grupo e fármacos. Essa resistência é bem estabelecida e, assim, mais facilmente contornada. De posse do conhecimento prévio da sua ocorrência, a seleção de antimicrobianos pode ser facilmente realizada. O maior desafio é imposto pela resistência adquirida, resultado de mudanças na composição genética de um microrganismo, anteriormente sensível, que se torna resistente devido à aquisição de

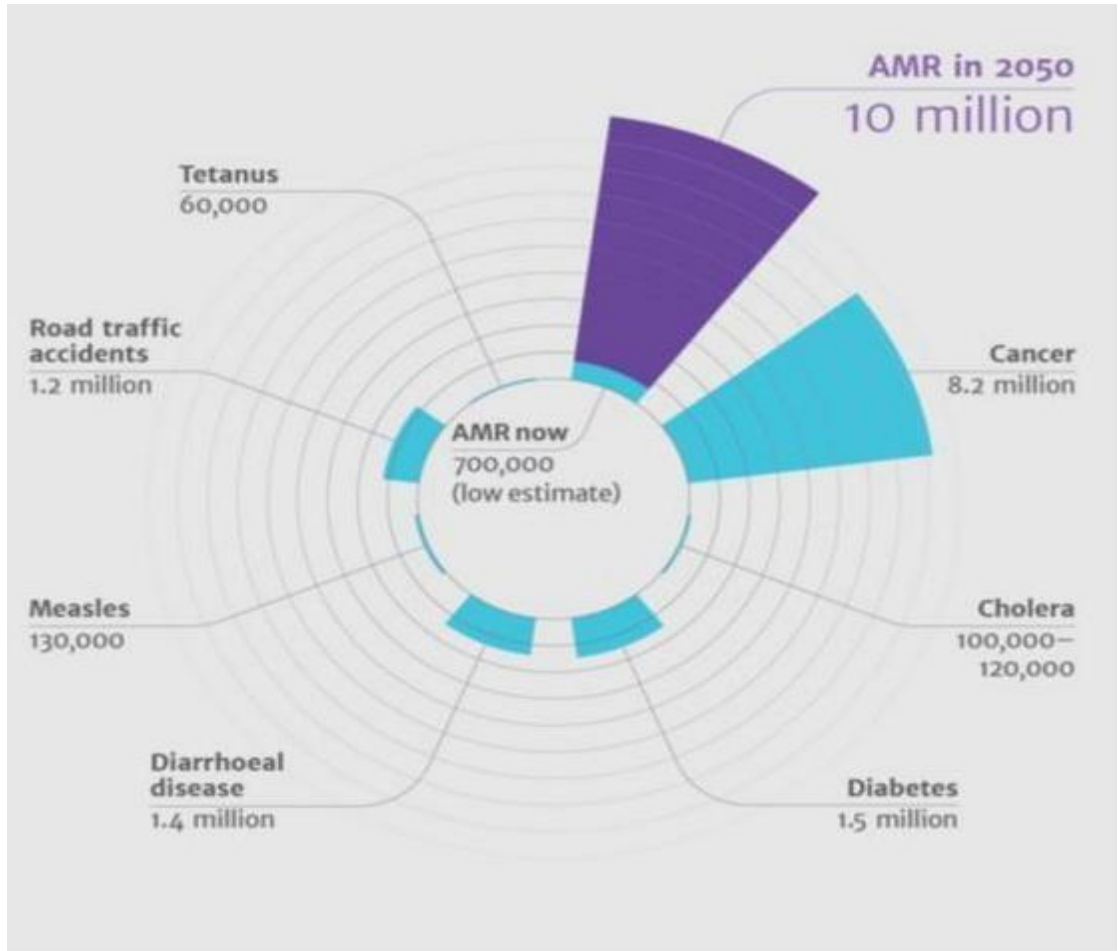
marcadores genéticos que codificam esta propriedade. Por isso, essa resistência requer monitoramento constante, em especial, para orientação da antibioticoterapia, evitando falhas terapêuticas previsíveis (BAPTISTA, 2013; PREMANANDH *et al.*, 2016; SANTOS, 2018). Já se sabe que o uso abusivo e inadequado de antimicrobianos ao longo dos anos provoca pressão seletiva à qual as bactérias são expostas e, como consequência direta desta prática, observa-se o aumento da resistência a antibacterianos, mesmo quando estão em concentrações elevadas (YUEN *et al.*, 2018).

Bastonetes Gram-negativos são incluídos entre os grupos bacterianos mais desafiadores no que se refere ao estabelecimento de protocolos eficientes para o controle de disseminação da resistência a fármacos antimicrobianos. A resistência a antimicrobianos é uma propriedade que tem evoluído de forma importante no grupo dos bastonetes Gram-negativos. Os mecanismos de resistência a antimicrobianos expressos por eles são diversos, com ênfase para a produção de enzimas, em especial,  $\beta$ -lactamases, que conferem resistência a fármacos  $\beta$ -lactâmicos. Essa classe de antimicrobianos responde por cerca de 50% da fabricação e prescrição desse grupo de medicamentos em nível mundial. Merecem menção as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), como a enzima temoneira (TEM), variável sulfidril (SHV), cefotaximases (CTX-M) e oxacilinases (OXA), e as carbapenemases, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), Nova Deli metalo-beta-lactamase (NDM), verona imipenemase (VIM) e imipenemase (IMP) (LOUREIRO *et al.*, 2016; LAVAGNOLI *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2019).

Hoje, a resistência a antimicrobianos é considerada uma ameaça global à saúde da humanidade (FIGURA 3). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a estimativa é de que, até 2050, a redução da eficácia dos antimicrobianos poderá resultar em um número maior de mortes do que de todas as outras doenças de grande impacto, chegando a cerca de 10 milhões de óbitos anuais (OMS, 2014; PREMANANDH *et al.*, 2016). Em algumas situações, é como se vivenciássemos a era pré-antibiótica. Seria promissor se vários países unissem forças nessa luta, compartilhando experiências, contribuindo em pesquisas, visto que essa realidade de saúde que vivemos não respeita fronteiras e adotar medidas que visem ao controle da resistência antimicrobiana é uma responsabilidade de todos, sendo necessárias ações conjuntas, nos mais diversos níveis, a fim de se tentar preservar a eficácia dos

antimicrobianos e contornar ameaças futuras à saúde da humanidade (LAZOVSKI *et al.*, 2017; PREMANANDHN *et al.*, 2016).

Figura 3. Estimativa de mortalidade em 2050 em comparação com outras mortalidades causadas por doenças graves



Fonte: World Health Organization (WHO), 2014.

### 1.3 BASES GENÉTICAS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

No que se refere às bases genéticas da resistência a antimicrobianos, é importante lembrar do papel das mutações, por ser a fonte básica de variabilidade genética ocorre de forma vertical durante a replicação do cromossomo, também, é absolutamente fundamental mencionar o papel da recombinação que ocorre de forma horizontal o que permite a transferência de genes entre células bacterianas, essa recombinação pode ocorrer de três formas básicas, transdução, transformação e conjugação, dessa forma toda a dinâmica da recombinação é acompanhada pela participação de vários elementos genéticos móveis que colaboram para concretização desses processos, tais como plasmídeos, fagos, transposons e integrons. (NODARI *et al.*, 2016).

As três formas básicas de recombinação: transformação, transdução e conjugação permite a transferência do material genético que deve ser seguido pela sua integração ao DNA da célula receptora ou pela captura do DNA plasmidial. O primeiro processo descrito denominado de transformação, consiste na transferência de material genético da bactéria doadora para a receptora, que capta fragmentos de DNA livres do meio extracelular. É um mecanismo menos eficiente, mais suscetível à interferência do ambiente e, para que ocorra, é necessário que a célula bacteriana receptora esteja em estado de competência. Um outro processo, a transdução, é mediado por bacteriófagos, que agem como veículos que transportam o material a ser transferido da bactéria doadora para a receptora. E o terceiro mecanismo, considerado o mais relevante do ponto de vista clínico, é a conjugação. Neste caso, ocorre a conexão entre células doadora e receptora, mediada por *pili* ou adesinas (WINTERSDORFF *et al.*, 2016).

Se tratando dos elementos envolvidos na recombinação os plasmídeos são elementos importantes nesse processo, estes são elementos extracromossômicos de DNA, autorreplicativos que, com frequência, albergam genes que conferem determinadas propriedades ao organismo, que representam, muitas vezes, vantagem competitiva em situações específicas, como é o caso da resistência a fármacos antimicrobianos. Os plasmídeos contribuem, de maneira importante, para a variabilidade genética bacteriana (CARATOLLI *et al.*, 2013; MATHERS *et al.*, 2015).

Sem dúvida, a rápida evolução da resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos é favorecida pela possibilidade de recombinação, em especial, via elementos genéticos móveis. A transferência horizontal de plasmídeos é a principal forma de disseminação de marcadores de resistência a antimicrobianos entre bactérias (PARTRIDGE *et al.*, 2018). A identificação dos genes associados à resistência por meio de plasmídeos tem sido apontada como um fator extremamente relevante diante do contexto pandêmico da resistência antimicrobiana (WINTERSDORFF *et al.*, 2016).

Outros elementos genéticos importantes, são os *integrons*, descritos no final dos anos 1980, por Stokes e Hall. Sua organização estrutural permite a incorporação e, em especial, a expressão de genes, muitas vezes, que codificam resistência a antimicrobianos. Possuem uma constituição dinâmica, que se altera, com relativa facilidade, permitindo a integração e excisão de cassetes gênicos (GILLINGS, 2014).

A estrutura funcional dos *integrons* inclui alguns elementos básicos. O primeiro, *intl*, é o gene que codifica a enzima integrase, uma recombinase sítio-específica, responsável pela inserção dos cassetes gênicos. O segundo, o sítio de recombinação *attI*, reconhecido pela integrase, que se recombina com um segundo sítio, *attC*, parte da estrutura denominada cassete gênico. Há, ainda, um promotor, *P<sub>c</sub>*, que promove a expressão dos genes integrados (GILLINGS, 2014; KAUSHIK *et al.*, 2018).

Os *integrons* comumente são agrupados em cinco classes com base no gene que codifica a integrase. Três delas estão associadas a fenótipos relacionados com multirresistência (MOZEL, 2006), sendo *integrons* de classe 1 os mais prevalentes (STALDER *et al.*, 2014; AN *et al.*, 2018). Já foram descritos, nessas estruturas, mais de 80 cassetes gênicos diferentes, relacionados com resistência por grande maioria dos fármacos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos, trimetoprim, rifampicina e cloranfenicol (KAUSHIK *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018). *Integrons* de classe 1 já foram detectados em *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia* (MOHAMED *et al.*, 2016; KAUSHIK *et al.*, 2018).

Os transpósons também considerados elementos importantes nesse contexto, são caracterizados como segmentos de DNA que possuem a capacidade de se mover

de uma local para outro do genoma. Essa movimentação é possível devido à presença de proteínas denominadas transposases. Os transpósons podem codificar resistência a antimicrobianos. A produção de carbapenemases, por exemplo, já foi associada em *P. aeruginosa* à presença dos transpósons Tn4401 (*bla*<sub>KPC-2</sub>) e Tn3 (*bla*<sub>VIM</sub>) (PARTRIDGE *et al.*, 2018; BOTELHO *et al.*, 2019).

Os bacteriófagos também são elementos genéticos móveis reconhecidos como carreadores de material genético entre microrganismos. Eles contribuem para a disseminação de genes que codificam resistência a antimicrobianos, sendo transferidos por transdução lítica ou lisogênica. Na forma lítica, o material genético é capturado pelo fago, inserido na célula bacteriana e, então, inicia-se ciclo de multiplicação viral, novos fagos são formados e há a lise celular. Já na forma lisogênica, o material genético é inserido na bactéria, ligando-se ao seu DNA e permanecendo em estado de profago, mantendo a viabilidade da célula hospedeira. Já foi documentado a transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobiano por transdução. Atualmente, há diversas pesquisas estão mais relacionadas a terapia com fagos. Porém, mais estudos são necessários para avaliar as possíveis consequências desse processo durante a terapia fágica (LECLERC *et al.*, 2022).

Ainda se tratando das bases genéticas bacterianas da resistência a antimicrobianos, as ilhas genômicas (IGs) devem ser mencionadas. Elas compreendem um conjunto de genes acessórios, ou seja, genes que não são essenciais e que foram adquiridos por meio de transferência horizontal de genes (HTG). Dessa forma, contribuem para a diversidade e adaptação microbiana. Já foram identificados inúmeros genes associados à resistência a antimicrobianos e a metais pesados em ilhas genômicas (PETITJEAN *et al.*, 2017; BOTELHO *et al.*, 2019).

## 1.4 MICRORGANISMOS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA - O GRUPO ESKAPE

O acrônimo ESKAPE refere-se a um grupo de bactérias com potencial de virulência elevado, responsável por grande parte das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e que possuem a capacidade de “escapar” da ação de vários fármacos antimicrobianos. São elas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* (BOUCHER *et al.*, 2009; NAVIDINA, 2016; MULANI *et al.*, 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu os membros do grupo ESKAPE como organismos contra os quais há necessidade premente de desenvolvimento de novos antimicrobianos. *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* foram classificados como prioridade crítica e *E. faecium* e *S. aureus* no grupo de alta prioridade (TACCONELLI *et al.*, 2018). É notório que a eficácia de antimicrobianos para tratamento de indivíduos com infecções por patógenos do grupo ESKAPE tem diminuído, o que lança um alerta para a possibilidade de um futuro no qual haja falta de recursos para a abordagem terapêutica destes pacientes (MULANI *et al.*, 2019). Assim, essa é uma tarefa desafiadora, que precisa ser assumida como prioridade absoluta, sob pena de enfrentarmos um panorama desastroso no que se refere a controle desses grupos bacterianos (MA *et al.*, 2020). Entre os microrganismos pertencentes ao grupo ESKAPE, este estudo teve como enfoque a bactéria *P. aeruginosa*.

### 1.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

As primeiras observações relativas a *P. aeruginosa* datam de cerca de 1850, quando se observou que curativos cirúrgicos de pacientes apresentavam purulência de coloração azul-esverdeada, seguidamente associada a um agente transferível, assim denominado até o momento. Posteriormente, na década de 60, o pigmento azul-esverdeado foi extraído pelo pesquisador Fordes e, em 1882 o pesquisador Lucke associou-o a um organismo em forma de bastonete. *P. aeruginosa* foi isolada em cultura pura por Carle Gessard, em 1882, e o gênero foi descrito por volta de 1894,

pelo professor Migula (LISTER *et al.*, 2009; PALLERONI *et al.*, 2010). Hoje, a bactéria é reconhecida como um organismo extremamente relevante na área de saúde, agente etiológico de doenças infecciosas que acometem os mais diversos sítios do nosso organismo.

*P. aeruginosa* pertence ao grupo dos bastonetes Gram-negativos não fermentadores. É uma espécie aeróbia, ubíqua, sendo isolada de diversos ambientes e comumente associada a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (MOYES *et al.*, 2009; SOONTHORNISIT *et al.*, 2022). É conhecido por ser um microrganismo bastante versátil, o que favorece a sobrevivência em várias condições (MIELKO *et al.*, 2019). Esse perfil contribui para seu envolvimento na etiopatogenia de doenças infecciosas que acometem seres humanos, plantas e animais (ARTINI *et al.*, 2018).

No que se refere a patogenicidade, é reconhecida como um patógeno oportunista. Está envolvido em quadros, como fibrose cística, pneumonia associada à ventilação mecânica, infecção urinária, infecções de tecidos moles e bacteremia, entre outros (PARKINS *et al.*, 2018; AL-KHUDHAIR, 2020; HASSETT *et al.*, 2021).

### 1.4.2 Patogenicidade

A patogenicidade bacteriana está associada à composição celular e/ou a substâncias secretadas pelo organismo (AZUAMA *et al.*, 2020). Entre os vários fatores de patogenicidade de *P. aeruginosa*, destacam-se as estruturas de superfície, a capacidade de formação de biofilme, o sistema de sinalização *quorum sensing* e os sistemas de secreção proteica (AZAM *et al.*, 2019).

Com relação às estruturas de superfície, destacam-se o lipopolissacarídeo (LPS), flagelos e *pili*. Flagelos e *pili* são filamentos responsáveis pela adesão e motilidade bacteriana. Já LPS é um elemento estrutural clássico da membrana externa das bactérias Gram-negativas. É reconhecido como um padrão molecular associado a patógeno (PAMP) e interage com o sistema imunológico do hospedeiro (KARNIELY *et al.*, 2017; QIN *et al.*, 2022).

Em se tratando do biofilme, essa estrutura é formada por um grupo de organismos mantidos unidos por polímeros extracelulares autosecretados, resultando em uma estrutura funcional organizada (FRIDMAM e KOLTER, 2004). O biofilme de *P. aeruginosa* é constituído por polissacarídeos Pel, Psl e alginato, bem como DNA extracelular, que são fundamentais para a fixação e a proteção da comunidade bacteriana, uma vez que dificultam a ação de antimicrobianos e do sistema imune do hospedeiro, contribuindo para a duração da infecção (THI *et al.*, 2020).

No que se refere ao sistema de sinalização por *quorum sensing*, esse é reconhecido como um mecanismo de comunicação entre células bacterianas que se comunicam por meio da produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras, que são denominadas de moléculas autoindutoras. Em *P. aeruginosa*, o sistema de *quorum sensing* controla uma variedade de fatores de patogenicidade, bem como contribui para a colonização, inclusive, para a formação do biofilme. Por exemplo, o receptor celular aril hidrocarboneto (AhR) atua como um sensor e monitora diferentes moléculas de *quorum sensing* e seus diferentes perfis de expressão ao longo da infecção. Com isso, desempenha um papel importante no controle da infecção por *P. aeruginosa* (ALVES *et al.*, 2019).

Quanto ao sistema de secreção e produtos secretados, estes regulam a interação bacteriana com o hospedeiro. Até o momento, foram identificados seis sistemas de secreção em *P. aeruginosa* (T1SS a T6SS), divididos em duas classes principais. A primeira, denominada de sistema de secreção de uma etapa, tem como componentes as proteínas T1SS, T3SS, T4SS e T6SS, e a segunda classe, denominada de sistema de secreção em duas etapas, T2SS e T5SS (QIN *et al.*, 2022). Entre as diversas substâncias secretadas por *P. aeruginosa*, destacam-se protease alcalina, elastase e lipases (SALMAM *et al.*, 2019.; LI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). Também merecem menção as proteínas efetoras (ExoS, ExoT, ExoY e ExoU (VAREECHON *et al.*, 2017).

Ainda, *P. aeruginosa* secreta metabólitos secundários, tais como a piocianina e a pioverdina. A piocianina, seu pigmento azulado, tem propriedades tóxicas para as células, mediada pelo estresse oxidativo (GUPTA *et al.*, 2021). Já a pioverdina, um outro pigmento, conhecido por sua coloração esverdeada, é responsável pela captação de ferro (SUZUKI *et al.*, 2018).

Como mencionado, *P. aeruginosa* possui várias propriedades que conferem ao microrganismo habilidade de adaptação e persistência em vários ambientes, decorrentes da plasticidade do seu grande genoma (5,2 a 7 Mbp). São inúmeras vias regulatórias que possibilitam uma alta adaptabilidade à bactéria ( MARTÍN *et al.*, 2021).

#### 1.4.3 Suscetibilidade de *P. aeruginosa* a antimicrobianos

Investigar o perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos de *P. aeruginosa* é de grande importância, tendo em vista que, nos últimos anos, a resistência a esta classe de medicamentos tornou-se, globalmente uma grande ameaça à saúde da população (CHOU *et al.*, 2020). *P. aeruginosa* está entre os patógenos mais preocupantes na prática clínica, é resistente a vários fármacos antimicrobianos, o que limita cada vez mais as opções de antibioticoterapia efetiva contra este agente (IBRAHIM *et al.*, 2020). Consequentemente, o combate a doenças infecciosas causadas por *P. aeruginosa* requer a tomada de decisões críticas na prática clínica, devendo-se levar em consideração a eficácia do antimicrobiano, o risco de resistência e a possível toxicidade (MENSA *et al.*, 2018).

Os mecanismos de resistência observados em *P. aeruginosa* podem ser intrínsecos, adquiridos ou adaptativos. Entre aqueles intrínsecos, pode-se destacar a baixa permeabilidade da membrana e os mecanismos de efluxo, no caso da resistência adquirida, é fundamental mencionar a transferência horizontal de genes, com relação a resistência adaptativa pode-se destacar a capacidade de *P. aeruginosa* de formar de biofilme, essa habilidade serve como barreira que impede o acesso dos fármacos antimicrobianos (PANG *et al.*, 2019; BEHBAHANI *et al.*, 2019).

Entre os fármacos antimicrobianos usados contra infecções causadas por *P. aeruginosa*, estão os fármacos da classe dos aminoglicosídeos tendo como representantes, amicacina, gentamicina e tobramicina, estes atuam na síntese de proteínas, ou seja, liga-se à subunidade 30S do ribossomo e impede a síntese de proteínas (MENSA *et al.*, 2018; PANG *et al.*, 2019).

As Fluoroquinolonas representam uma outra classe de antimicrobianos, na qual estão incluídos o ciprofloxacino e o levofloxacino. Estes fármacos atuam na DNA girase e na topoisomerase IV, interferindo na replicação do DNA (ALDRED *et al.*, 2014). Em contrapartida a resistência a essa classe pode ocorrer por mudanças estruturais nessas enzimas (DNA girase e topoisomerase IV) e super expressão de bombas de efluxo (ZHAO *et al.*, 2020).

Os  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de fármacos semelhantes em sua estrutura, e possuem na sua estrutura química um anel beta-lactâmico, são classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, atuam na parede celular bacteriana, interferindo nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e, conseqüentemente, impedem a síntese de peptidoglicano (LIMA *et al.*, 2020). Alguns mecanismos podem conferir resistência a diferentes  $\beta$ -lactâmicos (MENSA *et al.*, 2018).

Os fármacos  $\beta$ -lactâmicos classicamente empregados contra *P. aeruginosa* incluem ceftazidima, uma cefalosporina de terceira geração, cefepime, uma cefalosporina de quarta geração, carbapênemicos, como meropenem e imipenem e  $\beta$ -lactâmicos combinados a inibidores de beta-lactamases. Até o momento, os inibidores de beta-lactamases mais conhecidos são ácido clavulânico, sulfatam,

tazobactam, avibactam, vaborbactam e relbactam (COSTA *et al.*, 2020; TARAZI *et al.*, 2021.; YAHAV *et al.*, 2021).

A suscetibilidade de *P. aeruginosa* a esses agentes antimicrobianos citados acima é avaliada por testes que verificam a concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano. Adicionalmente, pesquisadores têm avaliado também as concentrações subinibitórias (sub-MIC) que, com o passar do tempo, influenciam na resistência a antimicrobianos (SHI *et al.*, 2019; ALEANIZY, *et al.*, 2021).

Considerando as opções de tratamento e os mecanismos de resistência, a realização do antibiograma tem papel importante na antibioticoterapia. Desta forma, órgãos internacionais e nacionais desenvolveram padrões e diretrizes para execução, interpretação e liberação de resultados dos testes realizados com fins diagnósticos (BEIRÃO *et al.*, 2020; HUMPHRIES *et al.*, 2021).

Muitos dos testes de suscetibilidade seguem os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). No Brasil, recentemente, vem se adotando as determinações do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), um comitê reconhecido pelas Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Baseado na padronização do EUCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), o BrCAST trabalha com o intuito de possibilitar a padronização e garantir um controle de qualidade nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos realizados nos laboratórios clínicos de todo o território brasileiro (BrCAST, 2021).

## 1.5 RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS

Metais pesados são elementos naturais presentes no ambiente, alguns dos quais são considerados fundamentais à vida, inclusive, para as bactérias. Entretanto, estando em altas concentrações, eles podem ser tóxicos. Acredita-se que a resistência a metais seja mais antiga que a resistência antimicrobiana e, apesar disso, não se sabe muito sobre sua epidemiologia (ARGUDÍN *et al.*, 2019).

Atividades antropogênicas estão favorecendo o aumento das concentrações de metais, favorecendo seu acúmulo no ambiente, contaminando solo e água e contribuindo para a resistência a antimicrobianos, causando graves riscos à saúde pública (OVES e HUSSANI, 2016).

Entre os metais aos quais a resistência vem sendo detectada, destacam-se cádmio (Cd), cobre (Cu), prata (Ag) e zinco (Zn) entre outros. O cádmio é um poluente importante, presente nos ecossistemas como produto secundário de indústrias metalúrgicas, tóxico para vários organismos. A exposição a esse metal pode se dar por meio de alguns alimentos, do tabagismo e de água potável (JARUP *et al.*, 2009). A longo prazo, a exposição prolongada ao cádmio pode favorecer a progressão de células cancerígenas (YAN *et al.*, 2022).

A exposição das bactérias ao cádmio pode levar, por exemplo, à ativação de sistemas de efluxo, representado na figura 4 o que confere resistência a este metal e a outros metais, como o zinco (RAJA *et al.*, 2008). Entre os genes que conferem resistência ao cádmio estão *yjiP*, *zntA*, *zntB* e *czc*, além do óperon *cad*. Estes genes podem ser encontrados em vários elementos genéticos móveis (ARGUDÍN *et al.*, 2019).

O cobre é um metal com utilidades variadas, sendo usado como algicida, antiparasitário, fungicida e contraceptivo, entre outras utilidades. Com relação à resistência ao cobre, é importante mencionar o sistema de efluxo regulado pelos genes *copA*, *cueO* e *cueP*, ( figura 4) o óperon *copABCDRS* é composto por genes que conferem resistência ao cobre em *Pseudomonas sp*, tendo sido descritos em plasmídeos e cromossomos (DAS *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2017; ARGUDÍN *et al.*, 2019).

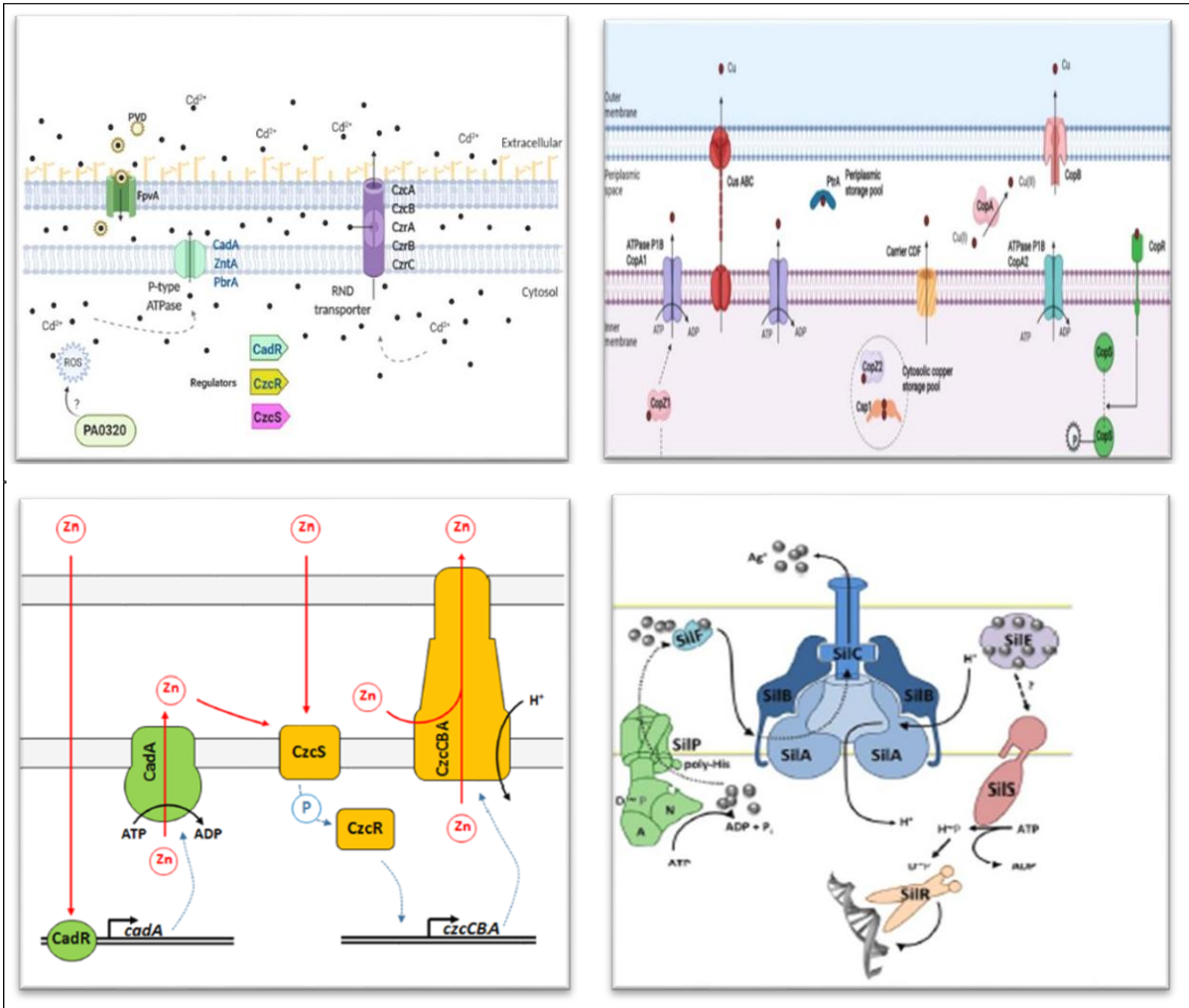
A prata é um metal muito utilizado na prática clínica a milhares de anos. Possui propriedades antimicrobianas, com atuação na membrana das células bacterianas e está entre os metais mais usados na medicina. A sulfadiazina de prata, por exemplo, de uso tópico, ainda é rotineiramente usada em queimaduras graves (HOBMAN e CROSSMAN, 2015 ). Ultimamente, tem-se explorado cada vez mais novas aplicações da prata, como nanopartículas de prata em diferentes especialidades odontológicas (FERNANDES *et al.*, 2021). No entanto, a prata também está envolvida na disseminação da resistência antimicrobiana. Experimentos de conjugação provaram que a resistência à prata mediada por plasmídeo pode se espalhar entre várias espécies bacterianas (HANCZVIKKE *et al.*, 2018). Já se sabe que, no óperon *sil*, localiza-se genes que codificam resistência à prata *silE*, *silCBA*, *silP*, *silF*, *silG* e *silS*. Esses genes já foram detectados em vários plasmídeos, próximos a genes que conferem resistência a fármacos antimicrobianos (HOBMAN & CROSSMAN, 2015; PAL *et al.*, 2017).

O zinco é um nutriente essencial para os organismos, envolvido na regulação do sistema imune inato e adaptativo. Os compostos de zinco são muito usados como aditivos alimentares e as suplementações a base de zinco reduzem distúrbios intestinais. Por ser um nutriente essencial, a deficiência de zinco é um problema para os seres humanos e animais (SANNA *et al.*, 2018; ARGUDIN *et al.*, 2019).

Para as células bacterianas, o zinco é tóxico em altas concentrações. As bactérias podem utilizar estratégias como adsorção pela parede celular e sequestro intracelular, para captar o metal. Também, pode expressar o mecanismo de efluxo, para resistir aos seus efeitos tóxicos ( figura 4) (UPADHYAY e SRIVASTAVA, 2014).

Já se sabe que as bactérias estão expostas a diferentes contaminantes ambientais, tanto fármacos antimicrobianos como metais pesados, que exercem pressão seletiva, favorecendo o aumento das taxas de resistência. Importante destacar que a contaminação por metais pesados no ambiente pode favorecer a corresponsabilidade e a resistência cruzada. A corresponsabilidade é caracterizada pela presença dos genes de resistência no mesmo elemento genético móvel, enquanto a resistência cruzada ocorre quando diferentes compostos atuam no mesmo alvo celular bacteriano. Assim, ambos, metais pesados e fármacos antimicrobianos são importantes agentes na disseminação da resistência bacteriana (NGUYEN *et al.*, 2019).

FIGURA 4: Mecanismos de efluxo ativo de metais pesados



Legenda: Representação esquemática de bombas de efluxo dos metais pesados: Cádmio (Cd); Cobre (Cu); Zinco (Zn); Prata (Ag).

FONTE: Gallardo-Benavente *et al.*, 2021 adaptado; Virieux-Petit *et al.*, 2022 adaptado; Ducret, *et al.*, 2020 adaptado; PAL *et al.*, 2017 adaptado.

## 1.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA NA PERSPECTIVA DA ONE HEALTH

A abordagem da resistência bacteriana na perspectiva da *One Health* fundamenta-se nas relações entre seres humanos, outros animais e meio ambiente, no que se refere a doenças infecciosas, muitas vezes compartilhadas. Um dos grandes desafios da *One Health* é garantir que os antimicrobianos sejam utilizados primeiramente para a terapia, raramente para a profilaxia e jamais para a promoção do crescimento (MCEWEN E COLLIGNON, 2018). Por isso a *One Health* traz uma abordagem mais ampla dos riscos da resistência bacteriana e dá ênfase à saúde humana, animal e ambiental (PATTIS *et al.*, 2022).

A saúde humana é considerada como o setor com maior risco de infecção e/ou colonização. O setor animal, mais precisamente na categoria de animais envolvidos na alimentação, tem apresentado grande demanda de intervenções contra a resistência antimicrobiana. Já o setor ambiental, tanto as coleções hídricas como o solo, merece ser evidenciado nesse panorama. Deste modo, é importante que se estabeleça relações entre diferentes meios para intervenções mais sólidas, visto que, *One Health* busca uma saúde intersetorial (LÉGER *et al.*, 2020).

Dentre os vários setores envolvidos nesse contexto, o setor avícola, por exemplo, tem se destacado, uma vez que o consumo de proteína animal na alimentação humana aumentou nos últimos 50 anos e entre o comércio total de carne (37,6 milhões de toneladas), 14,1 milhões de toneladas (37,5%) referem-se à carne de aves. O frango é o tipo de carne mais exportada, o que garante grande importância econômica da indústria avícola no cenário global, alavancando as atividades econômicas mundiais. Devido à essa crescente demanda por carne de aves, a indústria avícola se encarrega de demandas maiores nas próximas décadas, o que reforça a importância de controle rigoroso do uso de antimicrobianos nesse setor, pois, sabe-se que seu uso favorece a disseminação de resistência entre patógenos zoonóticos, bem como entre bactérias não envolvidas na etiopatogenia de doenças, mas, que podem ser reservatórios e transportam genes de resistência a antimicrobianos (ARGs) (SARAIVA *et al.*, 2022). Vários autores atribuem a prevalência da disseminação da resistência antimicrobiana ao compartilhamento zoonótico de genes de resistência a antimicrobianos por transferência horizontal de genes e setores como suinocultura também estão envolvidos nesse processo. Dessa

forma, tem se recomendado a redução do uso de antimicrobianos nas rações animais (HICKMAN *et al.*, 2021).

Com relação à transferência horizontal de genes, o conjunto de todos os genes e seus precursores envolvidos (resistoma) tem sido considerado como importante reservatório de transmissão de genes de resistência entre os diferentes setores. Por isso, estudos de diferentes resistomas na perspectiva da *One Health* são considerados essenciais para compreender os fatores prioritários e auxiliar na mitigação da resistência a antimicrobianos (KIM e CHA *et al.*, 2021).

## 2 JUSTIFICATIVA

A antibioticoterapia proporcionou, ao longo dos anos, tratamento eficaz contra agentes infecciosos. Contudo, o uso frequente e, muitas vezes, abusivo, destes medicamentos, aliado a características específicas de determinados grupos bacterianos, tem facilitado a disseminação de marcadores genéticos de resistência.

Metais pesados são componentes naturais do meio ambiente encontrados em várias concentrações em ambientes terrestres e aquáticos, células bacterianas quando expostas a contaminações por metais pesados desenvolvem características que permitem resistir a esses metais.

Em consequência, bactérias resistentes a antimicrobianos e a metais pesados têm sido uma realidade constante, considerando um problema de saúde pública em nível mundial. É importante que se compreendam os mecanismos que contribuem para o avanço da resistência antimicrobiana bem como da resistência a metais pesados, como também, quais fatores possam causar pressão seletiva em ambientes diversos, sejam assim claramente identificados e controlados.

Estudos que visam à identificação da resistência a fármacos antimicrobianos e a identificação da resistência a metais pesados são absolutamente necessários. Considerando que a problemática da resistência bacteriana a fármacos antimicrobianos e a metais pesados é de responsabilidade de todos, são necessárias ações conjuntas, que visem a preservar a funcionalidade dos antimicrobianos, impedindo que a ineficácia deste grupo de fármacos ameace a saúde da humanidade, como na era pré-antibiótica (PREMANANDN *et al.*, 2016). Assim, pretende-se identificar o perfil fenotípico de amostras bacterianas de relevância clínica isoladas de pacientes hospitalizados quanto a resistência fármacos antimicrobianos e a metais pesados, a fim de contribuir com dados que possam ser empregados na proposição de estratégias que visem ao controle da propagação da resistência bacteriana a antimicrobianos e a metais pesados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil fenotípico de resistência a fármacos antimicrobianos e metais pesados de amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, por método quantitativo, o perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos de amostras bacterianas de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes hospitalizados.
- Avaliar a concentração inibitória mínima de metais pesados das amostras clínicas de *P. aeruginosa* em estudo em meio sólido e meio líquido.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (3.219.929) e da Universidade Federal de Minas Gerais (3.586.852).

### 4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

As amostras de *P. aeruginosa* de interesse para o estudo foram isoladas de pacientes hospitalizados, cedidas pelo laboratório de análises clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, MG. A escolha da espécie a ser estudada foi baseada em resultados de análises prévias dos dados do laboratório, que mostraram que *P. aeruginosa* está entre as bactérias com perfil de multirresistência de maior prevalência no hospital.

### 4.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE TAXONÔMICA DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas foram inoculadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA; Difco, Sparks, MD, EUA) e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB/UFMG), para incubação por 24h, a 37°C. A seguir, foi realizada coloração diferencial pelo método de Gram, para confirmação de cultura pura e, então, as amostras foram armazenadas em *Brucella Broth* (BBL, Sparks, MD, EUA) acrescido de 10% de glicerol, em freezer -80°C. Em seguida, as amostras que apresentavam apenas identificação presuntiva foram submetidas a testes bioquímicos-fisiológicos para confirmação da espécie, seguindo protocolos indicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Assim, as amostras indicativas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em *Cetrimide Agar* (Difco) e submetidas às provas de oxidase e multiplicação a 42°C.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO

#### 4.3.1 Preparo do antimicrobiano

A avaliação do perfil de suscetibilidade das amostras bacterianas em estudo foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Os antimicrobianos testados foram meropenem (USP Standards), amicacina (Sigma-Aldrich), ceftazidima (Sigma-Aldrich), piperacilina sódica + tazobactam sódico (Novafarma) e ciprofloxacino (Inlab). As soluções de estoque foram preparadas de forma que estivessem 10 vezes mais concentradas. Dessa forma, as concentrações foram de 1.280 µg/mL, 2.560 µg/mL, 5.120 µg/mL, 10.240 µg/mL e 1.280 µg/mL, para meropenem (MER), amicacina (AMI), ceftazidima (CAZ), piperacilina + tazobactam (PPT) e ciprofloxacino. Então, todos os antimicrobianos foram diluídos em 10 mL de água destilada estéril e, então, esterilizados por filtração em membrana 0,22 µm e armazenados em freezer -20°C.

#### 4.3.2 Preparo das microplacas

Com base na literatura os antimicrobianos foram testados nas seguintes faixas de concentrações: MER (0,125 a 64 µg/mL), AMI (1 a 256 µg/mL), CAZ (0,5 a 256 µg/mL), PPT (1 a 512 µg/mL) e CIP (0,25 a 32 µg/mL). As diluições foram realizadas em triplicata, em microplacas de fundo chato com 96 poços. Dessa forma, foram adicionados 100 µL de caldo Mueller Hinton cátion ajustado (Difco) em todos os poços, com exceção da primeira fileira. Em seguida, a partir da solução estoque de antimicrobianos, foram preparadas as soluções de trabalho, de forma que todos os antimicrobianos estivessem duas vezes mais concentrados. Então, 200 µL da solução de trabalho dos antimicrobianos foram adicionados na primeira fileira das placas. Em seguida, com o auxílio de pipeta multicanal, alíquotas de 100 µL foram transferidas para a segunda fileira e, na sequência, o procedimento foi repetido para as demais fileiras. Em seguida, foi desprezado o volume de 100 µL da última diluição, de forma que todos os poços ficassem com o mesmo volume.

#### 4.3.3 Preparação do inóculo

As amostras foram cultivadas em meio TSA e incubadas por 24h, a 35°C. Posteriormente, com o auxílio de alça bacteriológica estéril, procedeu-se a transferência de 2 ou 3 colônias isoladas para um tubo de ensaio estéril contendo 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%). A solução foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland e, em seguida, com o auxílio de um espectrofotômetro, ajustou-se a densidade da suspensão para 0,1 unidade de densidade óptica a 600nm.

#### 4.3.4 Adição do inóculo na placa

A suspensão padronizada foi diluída 1:100 e, em seguida, com o auxílio de pipeta multicanal, alíquotas de 100 µL foram dispensadas em todos os poços da placa, exceto no controle negativo (controle de esterilidade). Controles positivos de crescimento foram incluídos em cada teste e o controle de qualidade foi realizado com a amostra de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853. As placas foram incubadas a 35°C por 16 a 20h.

#### 4.3.5 Leitura do teste

Após o período de incubação, as placas foram analisadas para validação dos controles e, posteriormente, realização da leitura. Assim, a CIM foi considerada como a menor concentração onde não foi observada multiplicação visível da bactéria, ou seja, a menor concentração de antimicrobiano (µg/mL) capaz de inibir a multiplicação bacteriana. Os experimentos foram realizados em triplicata e a interpretação dos resultados foi baseada nos pontos de corte do CLSI (CLSI, 2021) e do BrCAST (BrCAST, 2021).

Quadro 1. Fármacos antimicrobianos testados contra amostras de *P. aeruginosa*

| <b>Classe</b>                   | <b>Antimicrobiano</b>   |
|---------------------------------|-------------------------|
| Aminoglicosídeo                 | Amicacina               |
| Betalactâmico de amplo espectro | Piperacilina+Tazobactam |
| Carbapenêmico                   | Meropenem               |
| Cefalosporina 3ª Geração        | Ceftazidima             |
| Fluoroquinolona                 | Ciprofloxacino          |

Fonte: Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021).

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE METAIS PESADOS

##### 4.4.1 Determinação do perfil de resistência das bactérias a metais pesados em meio sólido

O perfil de resistência de *P. aeruginosa* a metais foi realizado de acordo com Deredjian e colaboradores (2011), com adaptações. Os metais e as respectivas faixas de concentração testadas foram: Zinco (5, 10, 20 e 40mM), cádmio (0,6; 1,25; 2,5; 5; 6 e 7mM), cobre (0,5; 1; 2; 4; 5; 6 e 10mM) e prata (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8mM). Então, as amostras bacterianas foram cultivadas a 37°C, por 24h, em TSA. A seguir, 2 ou 3 colônias foram ressuspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), que foi padronizada de acordo com a escala 0,5 de McFarland e a densidade foi ajustada para DO 0,1 a 600 nm. Posteriormente, alíquotas de 100 µL de cada suspensão padronizada foram adicionadas aos poços de um replicador de Steers. Então, o inóculo foi realizado nos meios de cultura com as diferentes concentrações de metais e na placa controle. O material foi incubado a 37°C, por 48h. A leitura foi realizada avaliando-se a presença de multiplicação bacteriana nas placas teste. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.2.2 Determinação do perfil de resistência a metais pesados em meio líquido

A determinação da resistência a metais pesados em meio líquido foi baseada na técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2021), com adaptações. As concentrações utilizadas foram 40mM; 20mM; 10mM; 5mM; 2,5mM; 1,25mM e 0,625mM para zinco (Zn), cobre (Cu) e cádmio (Cd) e 0,4mM; 0,2mM; 0,1mM; 0,05mM; 0,025mM; 0,0125mM e 0,00625mM para prata (Ag). Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços. Dessa forma, primeiramente foram adicionadas às placas 100 µL de meio Muller Hilton cátion ajustado em todos os poços com exceção das primeiras fileiras. Em seguida, foi adicionado meio contendo os metais nas primeiras fileiras e, posteriormente, as diluições foram realizadas. O controle negativo consistiu de 200µL de meio adicionado de metal sem adição de inóculo. As amostras foram cultivadas em meio TSA e incubadas por 24h. A seguir, foram selecionadas 2 ou 3 colônias isoladas, as quais foram adicionadas em um tubo de ensaio contendo 10mL de salina estéril, que foi padronizada a escala de 0,5 de McFarland e D.O de 0,1 a 600nm. A suspensão foi diluída na proporção 1:100 e, em seguida, com o auxílio de pipeta multicanal, 100µL da suspensão bacteriana padronizada foi dispensada em todos os poços da placa, exceto no controle negativo. Controle positivo de crescimento foi incluído em todas as microplacas. A leitura foi feita visualmente e a CIM foi considerada como a menor concentração onde não foi observada multiplicação visível da bactéria, ou seja, a menor concentração de metal (mM) capaz de inibir a multiplicação bacteriana.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do teste de microdiluição em caldo para os antimicrobianos foram analisados pelo *software* estatístico PAST (Palaeontological Statistics). A análise dos dados multivariados usada foi a PCoA (Análise de Coordenadas Principais).

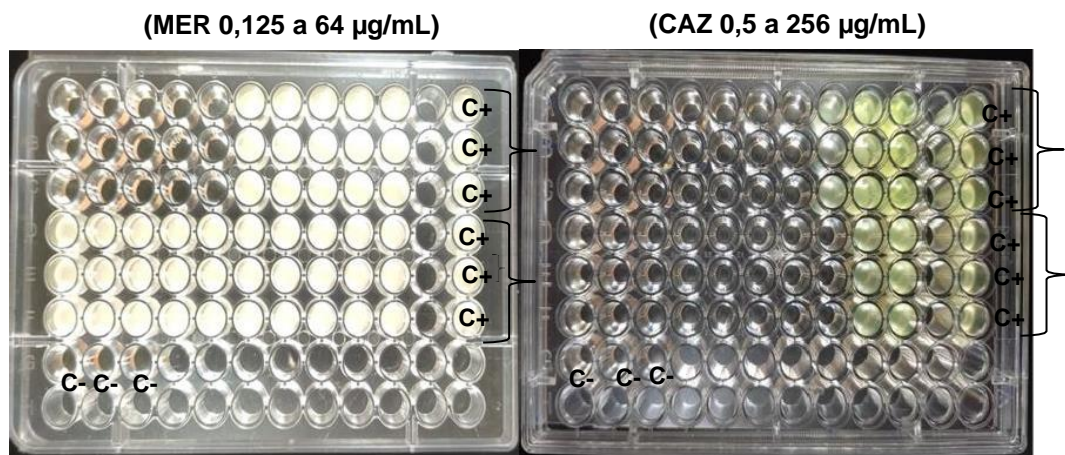
## 5. RESULTADOS

### 5.1 PERFIL de SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS

Neste estudo, 30% das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas (n=44) foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano. Entre elas, 23% foram resistentes a todos os antimicrobianos testados.

Os dados obtidos neste estudo foram interpretados de acordo com o CLSI (2021) e BrCAST (2021). Com relação ao BrCAST, as novas definições de S, I e R permitem identificar dois níveis de sensibilidade e um nível de resistência. O tratamento de um paciente infectado por um microrganismo categorizado como sensível dose padrão (S) ou sensível aumentando a exposição (I) tem boa chance de sucesso, desde que, para este caso, o ajuste do esquema terapêutico seja realizado. Já se o agente é resistente (R), há uma probabilidade importante de falha terapêutica. Ademais, para alguns antimicrobianos, não há a categoria sensível dose padrão. Por exemplo, os antimicrobianos ceftazidima (CAZ) e piperacilina+tazobactam (PPT) possuem pontos de cortes arbitrários para a categoria sensível dose padrão. Assim, em laboratórios clínicos, apenas as categorias sensíveis aumentando a exposição e resistente são consideradas (BrCAST, 2021).

Figura 5: Antibiograma - Método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de amostras de *P. aeruginosa*



Legenda: Meropenem (**MER**) faixa de concentração (0,125 a 64 µg/mL); Ceftazidima (**CAZ**) faixa de concentração (0,5 a 256 µg/mL). Controle positivo de crescimento (**C+**); Controle negativo de esterilidade (**C-**).

## 5.2 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ESTUDADAS com base no CLSI E BrCAST

Entre as classes de antimicrobianos estudadas, o percentual de resistência aos fármacos beta-lactâmicos (meropenem, ceftazidima e piperacilina+tazobactam) foi superior os fármacos pertencentes as outras classes (ciprofloxacino e amicacina). No que se refere ao meropenem, 18% das amostras expressaram resistência e 14% se enquadraram na categoria intermediária, (Gráfico1) de acordo com o CLSI (2021). A análise dos resultados com base no BrCAST foi semelhante, visto que os pontos de corte propostos em ambas as padronizações são muito próximos (Gráfico 2). Os valores de CIM (Anexo 8) para meropenem foram, na sua maioria,  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$

Com relação à ceftazidima, os percentuais de resistência e da categoria intermediária foram 20% e 5%, (Gráfico 1) respectivamente (CLSI, 2021). A interpretação dos dados com base no BrCAST (Gráfico 2) difere daquela resultante da análise baseada no CLSI. Assim, 25% das amostras foram resistentes e 75% foram sensíveis aumentado a exposição. No presente estudo, os valores para a maioria das amostras resistentes foram  $\geq 64\mu\text{g/mL}$ , considerados bem elevados.

Ainda em relação aos beta-lactâmicos, a análise do perfil com base no CLSI mostrou que 18% das amostras estudadas eram resistentes à associação piperacilina + tazobactam e 7% apresentaram perfil de resistência intermediário (Gráfico 1). Com base no BrCAST, 25% das amostras apresentaram resistência para a piperacilina + tazobactam, (gráfico 2) com valores de CIM superiores a  $64 \mu\text{g/mL}$  (anexo 7), dados semelhantes a outros estudos brasileiros (BEIRÃO *et al.*, 2020; TUO *et al.*, 2020).

Para ciprofloxacino, 16% das amostras mostraram-se resistentes, com base no CLSI (gráfico 1). Esse percentual aumentou para 18%, quando a referência usada foi o BrCAST (gráfico 2). No nosso estudo, foram detectados valores de CIM variando de 2 a  $32\mu\text{g/mL}$  em anexo.

As menores taxas de resistência foram observadas para amicacina (14%) com base no CLSI e BrCAST (gráficos 1 e 2). Neste estudo, as amostras que foram resistentes apresentaram CIM igual ou superior a  $128\mu\text{g/mL}$ .

Gráfico 1: Perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos das 44 amostras de *P. aeruginosa* baseado no CLSI.

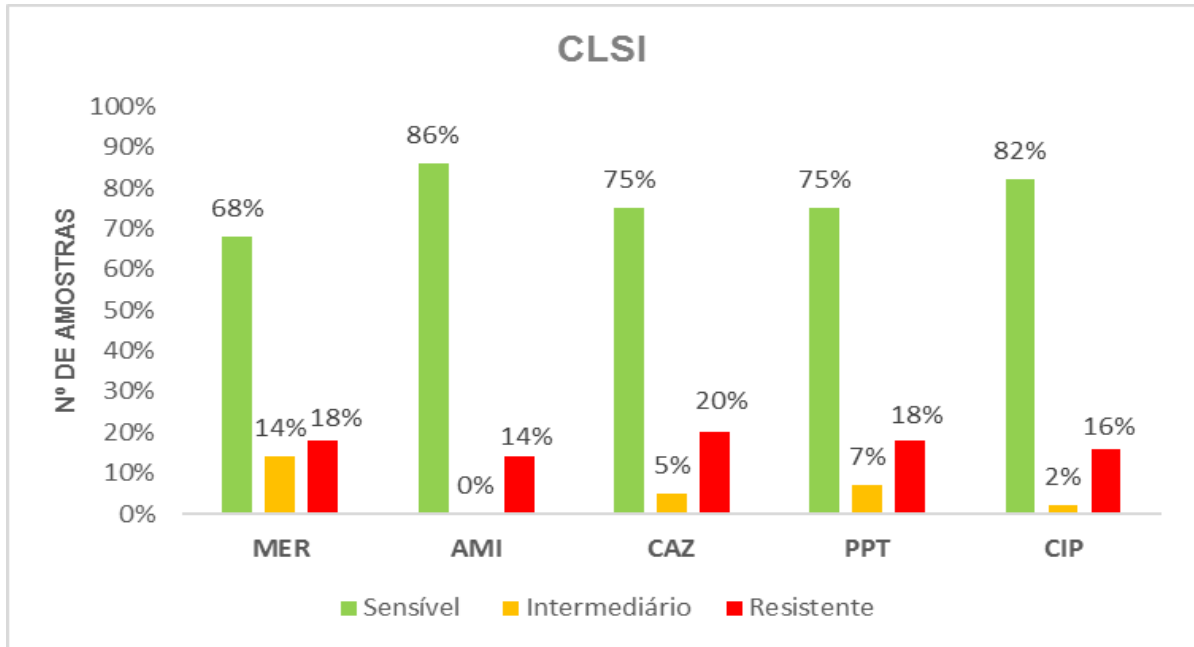
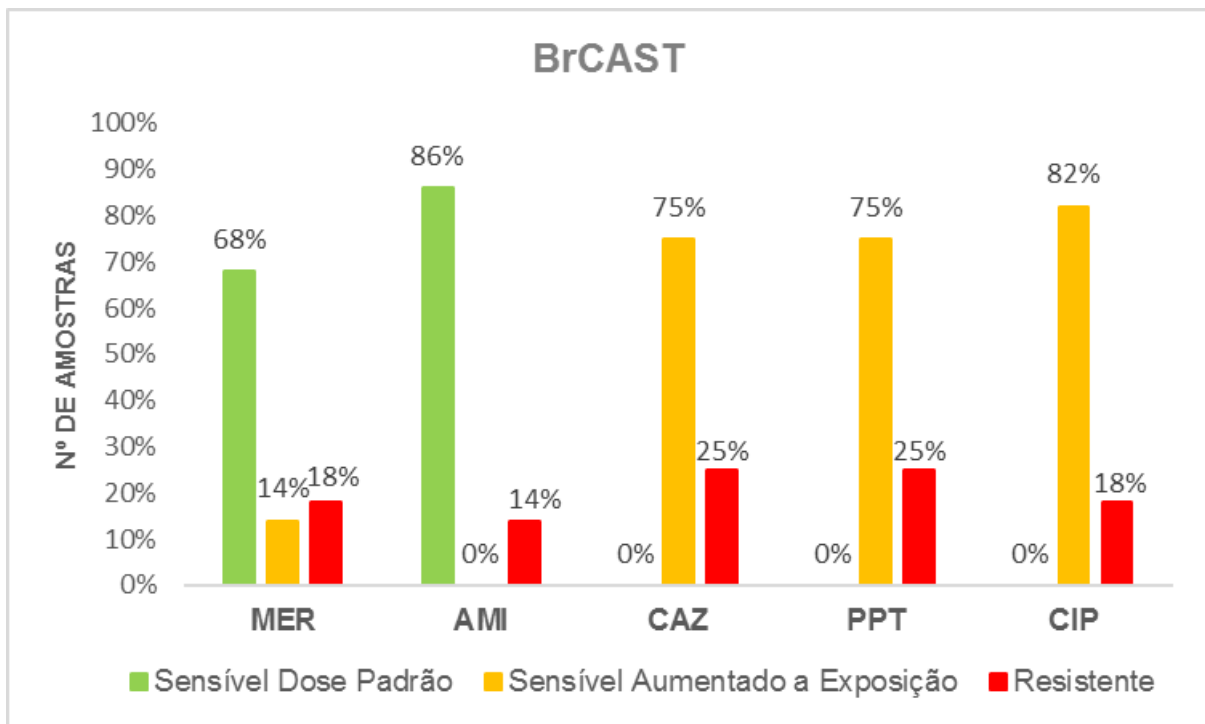


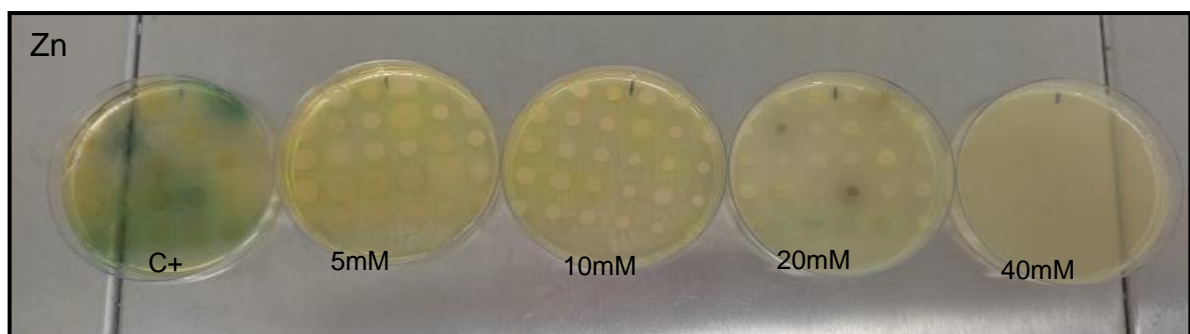
Gráfico 2: Perfil de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos das 44 amostras de *P. aeruginosa* baseado no BrCAST.



### 5.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS

Os perfis de resistência de 44 amostras *P. aeruginosa* a metais pesados foram identificados em meio sólido (TSA) e líquido (MHB). Nos testes para avaliação do perfil de resistência de *P. aeruginosa* a metais pesados em meio sólido, identificou-se multiplicação bacteriana em todas as concentrações testadas de Cd e Cu (gráfico 3). Então, os testes conduzidos em meio líquido permitiram determinar a concentração inibitória mínima para todos os metais pesados avaliados neste estudo.

Figura 6: Avaliação do perfil de suscetibilidade ao zinco em meio sólido.

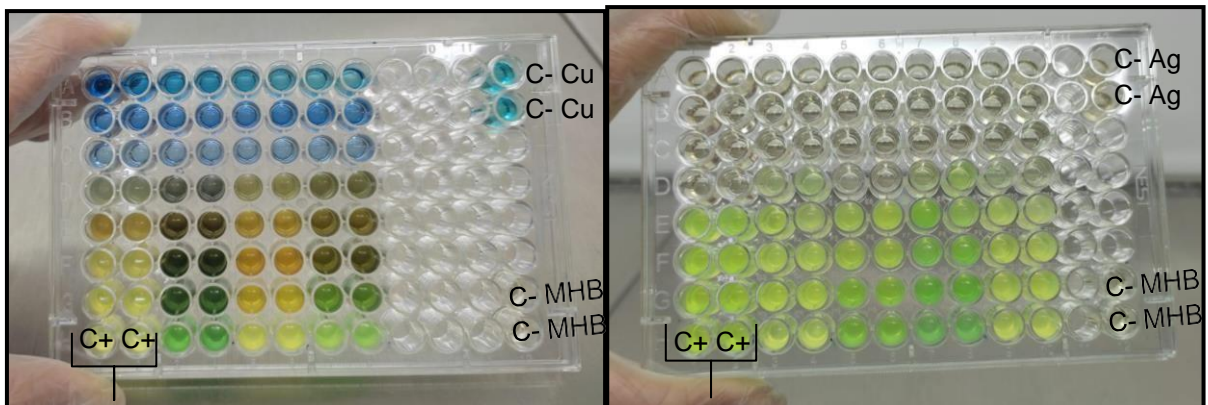


Legenda: Zinco (Zn); Controle positivo sem adição de metal (C+); Concentração Milimolar (mM) adicionado as placas 5mM, 10mM, 20mM; 40mM.

Figura 7: Avaliação do perfil de suscetibilidade ao cobre e à prata em meio líquido

(Cu 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40mM)

(Ag 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4mM)



Legenda: Cobre (**Cu**); Prata (**Ag**). Controle positivo de crescimento (C+); Controle negativo metal puro (C- Cu e C- Ag); Controle negativo de esterilidade *Mueller-Hinton broth* (C- MHB)

### 5.3.1 Perfil de Suscetibilidade de *P. aeruginosa* ao Zinco

Para o zinco, em meio sólido, todas as amostras bacterianas foram resistentes a 20mM (figura 4). No meio líquido, os resultados foram variados. A CIM detectada para 11%, 50%, 25% e 14% das amostras foi de 2,5mM, 5mM, 10mM e 20mM, respectivamente (gráfico 4).

### 5.3.2 Perfil de Suscetibilidade de *P. aeruginosa* ao Cádmi

Todas as amostras de *P. aeruginosa* foram capazes de se multiplicar na presença de 7mM de cádmio (gráfico 3), a concentração mais elevada testada. Em meio líquido, CIM de 10mM foi detectada para 98% das amostras (gráfico 4).

### 5.3.3 Perfil de Suscetibilidade de *P. aeruginosa* ao Cobre

Todas as amostras bacterianas avaliadas expressaram resistência a 10mM de cobre, maior concentração testada, no meio sólido (gráfico 3). Já no meio líquido, foram detectadas CIMs de 5mM (2% das amostras), 10mM (57% das amostras) e 20mM (41% das amostras) (gráfico 4).

### 5.3.4 Perfil de Suscetibilidade de *P. aeruginosa* à Prata

Em meio sólido, 100% das amostras de *P. aeruginosa* foram resistentes a 0,1mM e 0,2mM e 5% delas a CIM em meio sólido foi de 0,4mM (gráfico 3). Em meio líquido, os valores de CIM para 18%, 59% e 23% das amostras foram de 0,1mM, 0,05mM e 0,025mM, respectivamente (gráfico 4).

Gráfico 3: Perfil de suscetibilidade de *P. aeruginosa* a metais pesados em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA)

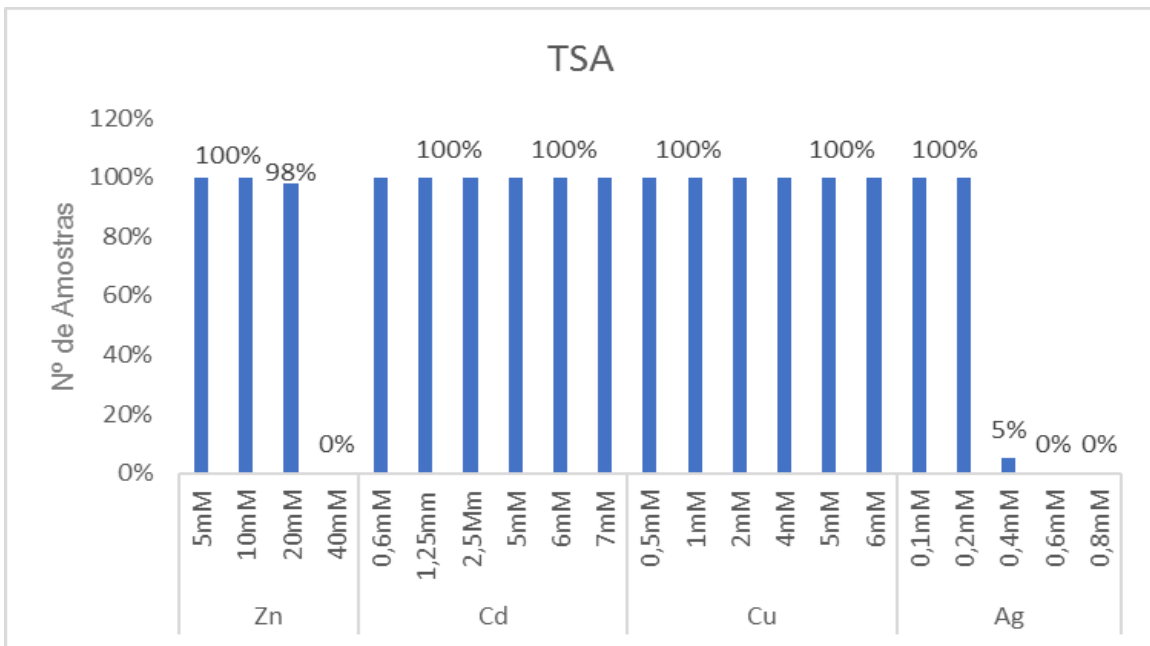
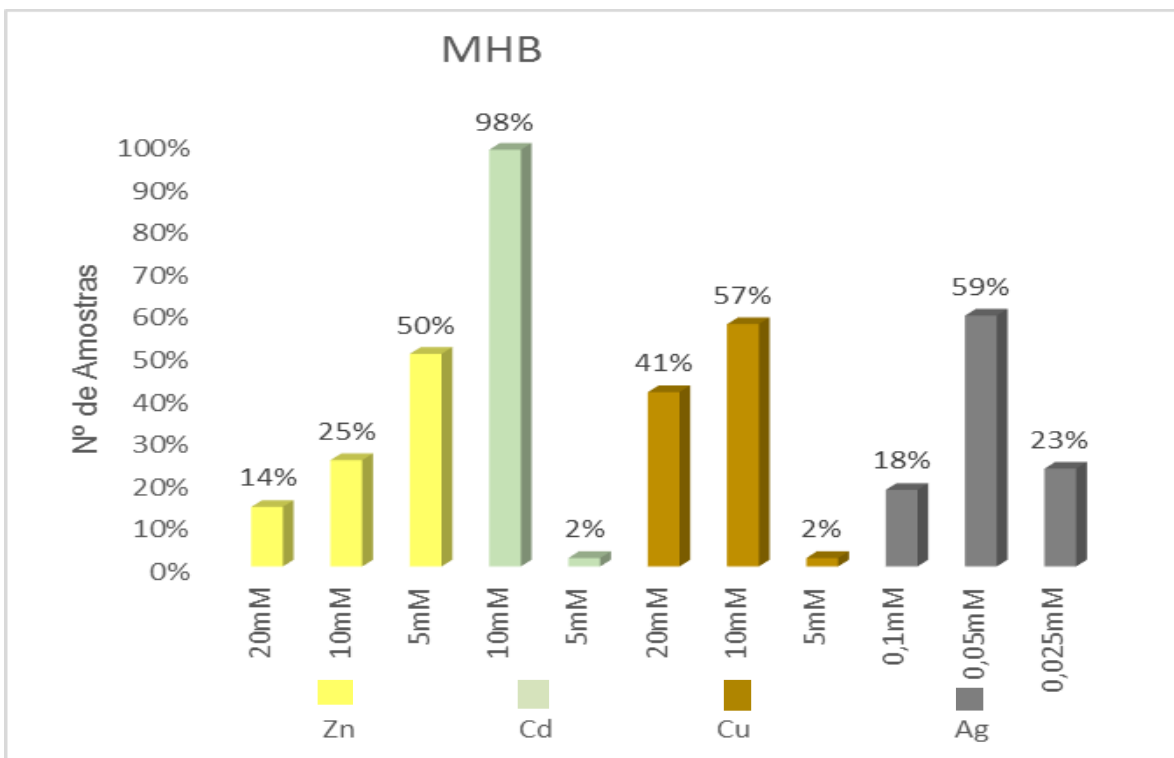


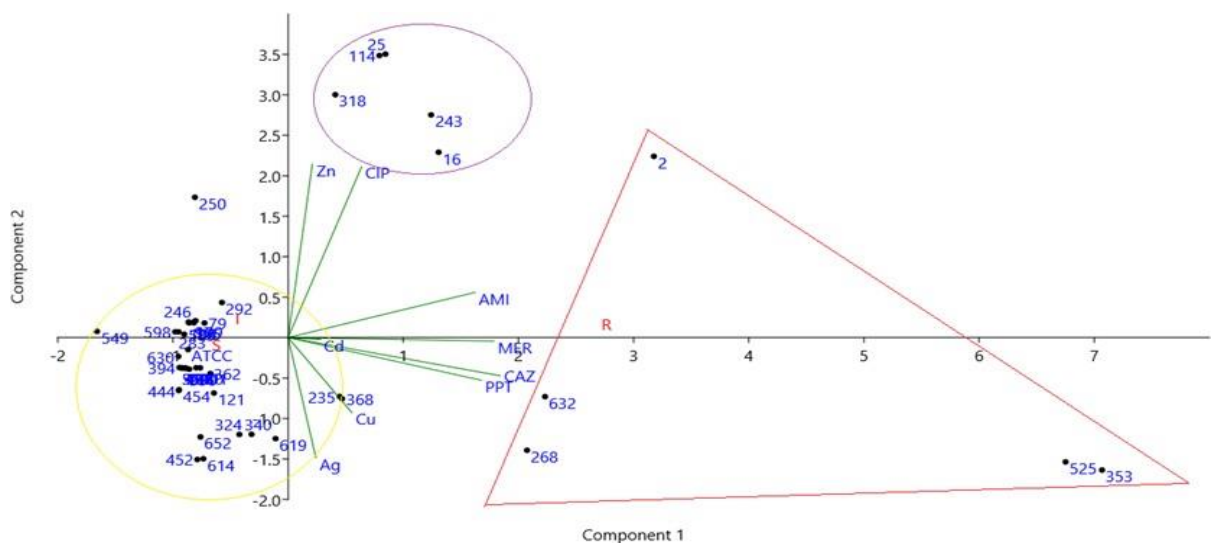
Gráfico 4: Perfil de suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* a metais pesados em *Mueller Hinton broth* (MHB)



## 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas geradas pelo programa PAST para as amostras estudadas estão representadas pelo gráfico 5, que identifica as amostras bacterianas representadas pelos seus números correspondentes. As amostras estão correlacionadas pela distância. Esse é um tipo de análise multivariada que tem como base agrupar as amostras de acordo com a proximidade de características em comum, logo, amostras mais próximas são consideradas mais semelhantes entre si. Assim, as variáveis sensíveis e intermediárias estão mais próximas e as variáveis resistentes estão mais distantes. As amostras mais distantes representam resistência a dois, três ou a todos os antimicrobianos testados neste estudo. Quanto maior a distância, maior o seu nível de resistência.

Gráfico 5. Perfil de distribuição das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* em função da distância dos dados multivariados



Com base no perfil apresentado, pode-se destacar três principais grupos, o grupo representado pelo círculo amarelo, que corresponde às amostras sensíveis e intermediárias, o grupo de coloração roxa, agrupa as amostras resistentes a pelo menos um antimicrobiano, já o grupo representado pelo triângulo vermelho, inclui as amostras resistentes a dois, três e/ou a todos os antimicrobianos ( gráfico 5). Com

relação aos metais pesados, o cádmio foi o metal que mais se aproximou dos agrupamentos e se correlacionou com os antimicrobianos que tiveram o maior percentual de resistência.

## 6. DISCUSSÃO

Com a industrialização e modernização ao longo dos anos, as mudanças no estilo de vida da população são notórias e, nesse cenário, uma grande quantidade de fármacos antimicrobianos e metais pesados são lançados no ambiente, o que, conseqüentemente, influencia na disseminação de bactérias multirresistentes a estes compostos, afetando, diretamente, a saúde da população (OVES & HUSSANI, 2016). Considerando a relevância do tema, este estudo foi desenvolvido com objetivo de avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e metais pesados de amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados.

Com relação às amostras que foram resistentes a todos os antimicrobianos, é possível que sejam extensivamente resistentes a antimicrobianos (XDR). Este termo, atribuído pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), identifica amostras resistentes a pelo menos um agente de todas as classes de antimicrobianos, exceto duas ou menos. No entanto, para classificar um organismo como XDR, os testes precisariam incluir mais do que as cinco classes de antimicrobianos testadas. Assim, as amostras foram classificadas como multirresistentes (MDR), definidas como aquelas que não são suscetíveis a pelo menos um agente de três ou mais classe de antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; KADRI *et al.*, 2018).

Os fatores de risco, que favorecem a infecção por amostras de *P. aeruginosa* resistentes, em especial a múltiplos fármacos antimicrobianos, são internação em unidade de terapia intensiva (UTI), uso preliminar de antimicrobianos e retornos consecutivos ao ambiente hospitalar. Neste estudo, as amostras foram provenientes de pacientes internados em um hospital de alta complexidade, o que pode explicar os achados. A identificação de pacientes de alto risco é importante. Os profissionais de saúde devem ficar atentos e avaliar a adequação da implementação de tratamentos empírico e alternativo (RAMAM *et al.*, 2018).

No presente estudo, a parcela de amostras ainda sensível aos antimicrobianos testados foi maior do que a parcela de amostras resistentes. Ainda assim, o perfil de resistência observado é preocupante, tendo em vista que, na prática clínica, a eficácia da antibioticoterapia é comprometida. Esse fato reforça a necessidade de estudos como esse, bem como o controle epidemiológico de pacientes hospitalizados.

Com relação ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas os fármacos beta-lactâmicos são aqueles mais prescritos na prática clínica (ARRUDA *et al.*, 2019). Sabendo-se da relevância da pressão seletiva na elevação das taxas de resistência a antimicrobianos, o resultado é esperado. No caso do meropenem, a resistência aos carbapenêmicos, classe na qual o meropenem faz parte no Brasil ocorre, principalmente, pela produção de enzimas carbapenemases, sendo Imipenemase (IMP-1) e São Paulo imipenemase (SPM) as mais prevalentes (ARAUJO *et al.*, 2016; FIGUEREDO *et al.*, 2021). Os resultados da CIMs para para meropenem são semelhantes aos relatados por um grupo de pesquisadores que detectaram CIM >16 µg/mL para 90% das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas. Os autores identificaram, por método genético, genes que codificam enzimas carbapenemases, sendo *spm* o gene mais prevalente (BEIRÃO *et al.*, 2020).

Para ceftazidima um estudo feito na Jordânia detectou 100% de sensibilidade a este antimicrobianos entre amostras de *P. aeruginosa* (TARAZI *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstraram que a detecção de amostras resistentes à ceftazidima estava relacionada a pacientes que passaram por tratamentos longos recorrentes de fibrose cística (PARKINS *et al.*, 2018; TARAZI *et al.*, 2021). No estudo de Tarazi e colaboradores (2021), já citado, nenhum paciente tinha fibrose cística. No presente estudo, não tivemos acesso aos dados dos pacientes. No Brasil, as cefalosporinas de 3ª geração estão entre os antimicrobianos mais prescritos na clínica médica (DA SILVA *et al.*, 2021). No estudo de Beirão e colaboradores (2020), conduzido no Brasil, os valores da CIM de cefalosporinas para 90% das amostras de *P. aeruginosa* foi superior a 32µg/mL. Já no presente estudo, os valores para a maioria das amostras resistentes foram  $\geq 64\mu\text{g/mL}$ , considerados bem elevados.

O uso das cefalosporina começou por volta dos anos 90 e, desde então, foi amplamente utilizada contra *P. aeruginosa*. Porém, desde os anos 2000, observa-se que a eficácia deste grupo de medicamentos vem sendo comprometida pela expressão de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). Atualmente, cefalosporinas são empregadas em associação com inibidores de beta-lactamases (DAIKOS *et al.*, 2021; MATESANZ *et al.*, 2021). Considerando o uso do antimicrobiano associado a um inibidor de beta-lactamases, seria importante avaliar a suscetibilidade das amostras frente ao uso combinado, por exemplo, da combinação ceftazidima + tazobactam ou ceftolozone + tazobactam, para subsidiar a escolha do uso combinado de fármacos na clínica (BEIRÃO *et al.*, 2020). Além da expressão de enzimas, outros mecanismos, como superexpressão de bombas de efluxo contribuem para a resistência bacteriana a cefalosporinas.

Um estudo anterior a este, conduzido pelo nosso grupo, detectou em uma das amostras a presença do gene *bla<sub>GES</sub>*, que confere resistência a penicilinas e a cefalosporinas (SILVA, 2020). Como outros genes não foram investigados, não é possível discutir de forma mais profunda o mecanismo possivelmente envolvido na resistência da bactéria às cefalosporinas.

Com relação a piperacilina+ tazobactam um estudo recente identificou um perfil de resistência semelhante ao encontrado neste estudo, 50 amostras clínicas de *P. aeruginosa*, com taxa de resistência de 16% (AL-THABHAWEE *et al.*, 2022). Outro estudo, realizado em Recife-PE, no período de 2018 e 2019, demonstrou que PPT foi o segundo agente antimicrobiano mais eficaz contra *P. aeruginosa*, ficando atrás apenas da polimixina (COSTA JUNIOR *et al.*, 2020). Em contraste, no presente estudo, PPT não ficou entre os agentes mais eficazes. Ao contrário, ficou entre aqueles aos quais a resistência foi mais comumente detectada. Um estudo recente detectou CIMs entre 64 e 512 µg/mL da associação PPT (OKOLIEGBE *et al.*, 2021). É importante a condução de investigações que permitam o acompanhamento da tendência de aumento da resistência à PPT ao longo dos próximos anos. Contudo, com base nos dados recentes divulgados, a diminuição da efetividade do fármaco pode ser atestada.

O próximo antimicrobiano a ser discutido é o ciprofloxacino pertencente à classe das fluoroquinolonas, e a ocorrência de mutações é importante para a

resistência a ele. Com relação ao mecanismo bioquímico de resistência, destaca-se o efluxo ativo do fármaco (ZHÃO *et al.*, 2020). Como foram detectados valores de CIM variando de 2 a 32µg/mL. Segundo ARAUJO e colaboradores (2016), amostras com CIM  $\geq$  a 32µg/mL fornecem indícios de presença de genes mediados por plasmídeos, tais como *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr*. Um estudo anterior, que incluiu as mesmas amostras da presente investigação, demonstrou a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* em três amostras, uma com CIM de 16µg/mL e duas com CIM de 32µg/mL.

As menores taxas de resistência foram para a amicacina e os dados estão de acordo com outros estudos e podem estar relacionado a uma prescrição médica menos comum do referido fármaco (AHMADIAN *et al.*, 2021). Com relação as CIMs superiores ou igual a 128µg/mL encontradas neste estudo, em um outro estudo feito no Nordeste do Brasil com amostras hospitalares de *P. aeruginosa* apresentou resultados semelhantes para tobramicina, um outro aminoglicosídeo. Os autores concluíram que os valores elevados de CIM estavam associados à presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME<sub>s</sub>) (COSTA- JÚNIOR *et al.*, 2021). Nossos resultados podem sugerir a presença de AME<sub>s</sub> nas amostras com níveis de resistência elevados (KASHFI *et al.*, 2017). A ocorrência dessas enzimas é um sério problema e o aumento das concentrações inibitórias mínimas pode indicar a presença simultânea dessas enzimas (AHMADIAN *et al.*, 2021).

Com relação aos metais pesados foi observado na literatura uso dos termos tolerância e resistência com o mesmo significado e sendo atribuídos ao comportamento das bactérias expostas a metais pesados. Assim, ambos são empregados para descrever a sobrevivência bacteriana em meios ricos em metais pesados (VIRIEUX-PETIT *et al.*, 2022). No presente estudo, optou-se pelo emprego do termo resistência a metais pesados. Atualmente, o ambiente é afetado, com frequência, por metais pesados. O solo e a água, por exemplo, são intensamente perturbados por metais pesados que se acumulam, causando poluição ambiental e riscos à saúde (OVES e HUNSSAIN, 2016). O perfil de resistência em diferentes meios (sólido e líquido) traz CIMs diferentes, em meio sólido, as concentrações inibitórias mínimas foram maiores (gráfico 3), possivelmente, devido às condições de difusão, mobilidade e biodisponibilidade (BENGHAIT e BLAGHEN, 2020).

Se tratando de cada metal especificamente para zinco o efluxo ativo é o principal mecanismo de resistência bacteriana (ARGUDIN, *et al.*, 2019). Sabe-se que *P. aeruginosa* possui quatro sistemas de exportação de zinco, CadA, CzcCBA, CzcD e YjiP, com destaque para os dois primeiros. Esses sistemas garantem uma rápida adaptação das células bacterianas às várias concentrações de zinco (DUCRETE *et al.*, 2020; DUCRETE *et al.*, 2021). CARDENAS e colaboradores (2017) relataram CIM de 6mM para 47,8% das amostras estudadas, semelhantes às encontradas neste estudo.

Para o metal pesado cádmio os resultados obtidos neste estudo em meio sólido foram semelhantes aos relatados por RAJA e colaboradores (2008). Em meio líquido, a CIM de 10mM foi detectada para 98% das amostras (gráfico 4). Em 2016, um estudo identificou CIM  $\geq 7$ mM de Cd em meio líquido (PITONDO-SILVA *et al.*, 2016). Em um outro estudo, uma CIM semelhante, de 7,2mM, foi observada. Assim, *P. aeruginosa* tem sido considerada altamente resistente ao cádmio (ZIVKOVI, *et al.*, 2018). Os dados da presente investigação estão de acordo com a literatura, que aponta o cádmio como o metal pesado mais comumente associado à resistência bacteriana, seguido de cobre e zinco (NGUYEN *et al.*, 2019). A resistência de *P. aeruginosa* a Cd pode ser atribuída pela expressão dos genes *czcA*, *czcB* e *czcC* associados a bombas de efluxo do tipo RND. Dessa forma, à medida que a concentração de Cd aumenta, a bactéria é submetida a este estresse e há ativação do sistema de efluxo (DAS e CHAKRABORTY, 2014). Com relação à alta resistência a Cd, é possível que possa ser atribuída à presença de diferentes genes localizados em elementos genéticos móveis (CHEN *et al.*, 2019; GALLARDO-BENAVENTE *et al.*, 2021).

Para cobre os dados da literatura são variados, mas, indicam aumento dos níveis de resistência de cobre ao longo dos anos. Estudos anteriores realizados em 2015, 2016 e 2020 identificaram valores de CIM de cobre de 3mM,  $\geq 5$ mM e 8mM, respectivamente (CHOUDHARY e SAR, 2015; PORMOHAMMAD *et al.*, 2020). Vários mecanismos estão envolvidos na resistência ao cobre. Entre eles, pode-se mencionar o efluxo ativo onde várias proteínas exportadoras estão envolvidas no processo para assegurar a exportação do cobre para fora da célula (VIRIEUX-PETIT *et al.*, 2022). Em muitos casos, a resistência de *P. aeruginosa* ao cobre se dá pela aquisição de genes de resistência presente em ilhas genômicas. Entre elas, já foi identificada a ilha

genômica GI7, que continha seis genes envolvidos na resistência ao cobre. Esse dado demonstra a possibilidade de transferência de genes de resistência a metais pesados para patógenos hospitalares (PETITJEAN *et al.*, 2017).

No caso da prata em um estudo recente, os pesquisadores relataram CIM de prata de 0,03mM, a mais baixa entre os metais pesquisados (PORMOHAMMAD e TURNER, 2020). Os dados da presente investigação apontam para resistência a concentrações elevadas do metal. Há a necessidade de controle de uso dos produtos à base de prata, para evitar a pressão seletiva.

A resistência bacteriana a prata pode ser adquirida por meio da transferência horizontal de genes e os principais genes envolvidos são *silE*, *silP* e *silS* (SÜTTERLIN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2022). Já se sabe que a prata possui um grande potencial antimicrobiano e a busca por tecnologias inovadoras a base de prata tem crescido a cada ano (FERNANDEZ *et al.*, 2021). No entanto, é necessário atenção ao seu uso, visto que a resistência a esse metal coloca em risco sua eficácia na prática clínica.

Considerando que as bactérias estão cada vez mais expostas a metais pesados e a antimicrobianos em diferentes reservatórios ambientais, sabe-se que a disseminação de resistência antimicrobiana é favorecida. Neste estudo, as amostras que apresentaram um percentual de resistência elevado aos antimicrobianos testados, exibiram também CIMs de metais pesados elevados. Nos parece fundamental a realização de testes para avaliação da ocorrência de resistência cruzada entre metais e fármacos antimicrobianos. Por exemplo, sabe-se que a mesma bomba de efluxo de *P. aeruginosa* que confere resistência aos metais cádmio e zinco, confere também resistência a fármacos antimicrobianos (MARGUERETTAZ *et al.*, 2014; IMRAN, *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2019). O fator de corresponsabilidade também é passível de ser analisado, uma vez que os genes que conferem resistência a aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, por exemplo, são transferidos de forma horizontal entre amostras de origem clínica e assim conferem também resistência a metais pesados (WALES E DAVIES, 2015). Seria interessante pesquisas futuras para comprovar essa hipótese nessas amostras.

## 7. CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo principal identificar o perfil fenotípico da resistência de *P. aeruginosa* a fármacos antimicrobianos e a metais pesados. Entre as classes de antimicrobianos analisadas neste estudo, o maior nível de resistência foi observado para fármacos  $\beta$ -lactâmicos. Sabe-se que esta classe de antimicrobianos é a mais utilizada na prática clínica. Entretanto é perceptível a diminuição da sua eficácia, o que traz graves riscos à saúde da população. Foram detectadas poucas publicações que empregam o BrCAST, o que dificultou a análise de parte dos dados obtidos neste estudo. Considerando que esta é a padronização adotada hoje no Brasil, é fundamental sua adoção em trabalhos de pesquisa desenvolvidos na área.

Com relação aos metais pesados, taxas elevadas de resistência a Zn, Cd e Cu foram observadas. Essa resistência pode estar relacionada à presença de elementos genéticos móveis e ilhas genômicas. É importante que mais estudos sejam conduzidos, visando à identificação dos marcadores genéticos associados à característica. Também, é fundamental a padronização dos testes para avaliação da resistência a metais pesados, o que permitirá uma análise mais adequada e uma comparação mais efetiva dos dados gerados.

Os dados obtidos neste estudo mostram a relevância do tema e de estudos que discutam esta problemática em uma perspectiva de saúde única, fundamental para o controle mais efetivo da resistência bacteriana a antimicrobianos, reconhecido, hoje, como um desafio de ordem mundial.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEANIZY, F.S.; ALQAHTANI, F.Y.; ELTAYB, E.K.; ALRUMIKAN, N.; ALMEBKI, N.; ALHOSSAN, A.; ALMANGOUR, T.A.; ALQAHTANI, H.; Evaluating the effect of antibiotics sub-inhibitory dose on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing dependent virulence and its phenotypes, v,28, p.550–559, 2021.

AHMED, M.N.; ABDELSAMAD, A.; WASSERMANN, T.; PORSE, A.; BECKER, J.; SOMMER, M.O.A.; HØIBY, N.; CIOFU, O. The evolutionary trajectories of *P. aeruginosa* in biofilm and planktonic growth modes exposed to ciprofloxacin: beyond selection of antibiotic resistance, **Nature Partner Journals**, v. 6, p.1-10, 2020.

AHMADIAN, L.; BAZGIR, Z.N.; AHANJAN, M.; VALADAN, R.; GOLI, H.Z. Role of Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) in Resistance to Aminoglycosides among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the North of Iran. **BioMed Research International**, v.1, p.1-10, 2021.

ALDRED, K.J., KERNS, R.J., OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry** v.53, p.1565–1574, 2014.

AL-KHUDHAIRY, M. K; AL-SHAMMARI, M. M. M. Prevalence of metallo- $\beta$ - lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diabetic foot infections in Iraq. **New Microbes New Infect**, v.35. p.1-6. 2020

ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. v.33, n.10 p.692-699, 2015.

ALVES, P. M.; PUYSKENS, A.; STINN, A.; KLEMM, M.; BORNHOF, U.G.; DORHOI, A.; FURKERT, J.; KREUCHWIG, A.; PROTZE, J.; LOZZA, L.; PEI, G.; SAIKALI, P.; PERDOMO, C.; MOLLENKOPF, H. J.; HURWITZ, R.; KIRSCHHOEFER, F.; WEISS, B. G.; WEINER, J.; RD, OSCHKINAT, H.; KOLBE, M.; KRAUSE, G.; Kaufmann, S.H.E. Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection, **Science**, v. 366. p. 1-12. 2019.

AL-THABHAWEE, M.H.J.; AL-DAHMOUSHI, H.O. M. Molecular Investigation of Outer Membrane Channel Genes Among Multidrug Resistance Clinical *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates. **Reports of Biochemistry & Molecular Biology**. v.11, p.1-9, 2022.

AKIYAMA, T. M.; TADA, T.; OHMAGARI, N.; HUNG, N.V.; THARAVICHITKUL, T.; POKHREL, B.M.; GNIADKOWSKI, M.; SHIMOJIMA, M.; KIRIKAE, T. Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Genome Biol Evol**, V.9, p. 3238–3245, 2017.

AMOS, G. C. A.; HAWKEY, P. M; GAZE, W. H; WELLINGTON, E. M. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment, **Journal of Antimicrob Chemother**, v.69. p-1785- 1791, 2014.

AN, X-L.; CHEN, Q-L.; ZHU, D.; ZHU, Y-G.; GILLINGG, M. R.; SUA, J-Q. Impact of Wastewater Treatment on the Prevalence of Integrons and the Genetic Diversity of Integron Gene Cassettes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.84, p.1-15, 2018.

ARAUJO, Ana Brígida Neves. **As doenças infecciosas e a História dos Antibióticos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. Lisboa, 2013.

ARAUJO, B. F., FERREIRA, M. L., CAMPOS, P. A. D., ROYER, S., BATISTÃO, D. W. D. F., DANTAS, R. C. C.; GONTIJO-FILHO, P. P. (2016). Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* carrying *aac* (6')-Ib-cr, *qnrS1* and *bla* SPM Genes in Brazil. **PloS one**, v.11. p.1-15, 2016.

ARGUDÍN. M. A.; HOEFER. A.; BUTAYE. P. Heavy metal resistance in bacteria from animals. **Research in Veterinary Science**, v. 122. p.132-147. 2019.

ARTINI, M.; PATSILINAKOS. A.; PAPA. R.; BOŽOVI. M.; SABATINO. M; GARZOLI. S; VRENN. G; TILOTTA, M. PEPI. F; RAGNO. R.; SELAN, L. Antimicrobial and Antibiofilm Activity and Machine Learning Classification Analysis of Essential Oils from Different Mediterranean Plants Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, v.23. p.1-13, 2018.

ARRUDA, C. J. M. Revisão Bibliográfica de Antibióticos Beta-Lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, p. 982- 995, 2019.

AZAM, M. W.; KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*, **Elsevier**, v.24. p.350-359, 2019.

AZUAMA O.C.; ORTIZ S.; QUIRÓS-GUERRERO L.; BOUFFARTIGUES E.; TORTUEL D.; MAILLOT O.; FEUILLOLEY M.; CORNELIS P.; LESOUHAITIER O.; GROUGNET R. *et al.*, Tackling *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Mulinane-Like Diterpenoids from *Azorella atacamensis*. **Biomolecules**, 2020.

BEHBAHANI , M. R.; KESHAVARZI, A.; PIRBONYEH,N.; JAVANMARDI, F.; KHOOB , F.; EMAMI, A. Plasmid-related  $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates: a molecular study in burn patients. **J Med Microbiol**, v.68.p. 1740-1746, 2019.

BEIRÃO,E. M.; SILVA, S.; TARIK, R.; ANDRADE K.; SERRA F. B.; PAULA M.D.M. THALES POLIS T. J.B.; GALES, A.C. Activity of ceftolozane-tazobactam and comparators against gram-negative bacilli: Results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART – Brazil; 2016–2017). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.24. p.310.321, 2020.

BENGHAIT, Y.; BLAGHEN, M. Heavy metals and antibiotics resistance of bacteria isolated from Marchica lagoon: Biodegradation of anthracene on submerged aerated fixed bed reactor. **Environmental Technology**, v.1, p.1-24, 2020.

BOTELHO, J.; GROSSO F.; PEIXE, L. ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *Pseudomonas aeruginosa* – MECHANISMS, EPIDEMIOLOGY AND EVOLUTION, v. 44, p. 1-11, 2019.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A. J; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L. J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p. 42-51, 2015.

BRcast, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST),. [file:///C:/Users/NoteDrielle/Downloads/Novos Conceitos TSA BrCAST%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/NoteDrielle/Downloads/Novos%20Conceitos%20TSA%20BrCAST%20(1).pdf). Acesso em: 25/07/22, 2021.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J.E.; GILBERT, D.;RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. v,48, p. 1-12, 2009.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 30th. January, 2021, Disponível em: [https://clsi.org/media/3481/m100ed30\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf). Acesso em: 04/10/2020

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. 25 Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of microbiological methods**. v.63 n. 3, p. 219-228, 2005.

CARDENAS, O.G.G.; IBARRA. L.F.N.; LARA. P.D.L.; RODRÍGUEZ,O.G. DEU RIO. Mejía. R.J. Antibiotic and heavy metal resistance profiles in potentially pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from agricultural water usage. **Nova scientia**. V.9, 2017.

CARATTOLI, A. Plasmídeos e a disseminação da resistência. **International Journal of Medical Microbiology**. v.6 p. 298-304, 2013.

CHAKRABORTY, J; DAS. S. Characterization and cadmium-resistant gene expression of biofilm-forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. **Environ Sci Pollut Res Int**, v.21, p. 14188–14201, 2014.

CHEN, D-Q; JIANG, Y-T; FENG, D-H; WEN, S-X; SU, D-H; YANG, L. Integron mediated bacterial resistance and virulence on clinical pathogens. **Microbial Pathogenesis**. v.114, p- 453-457, 2018.

CHEN.J.; LI.J.; ZHANG.H.; SHI.W.; LIU.Y. Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China **Frontiers in Microbiology**, v.10. p.1-12, 2019.

CHOU, C. H.; LAI, Y.; CHI, C.; HO, W.; CHEN, C.; LIAO, W.; HO, C. M.; CHEN. Y.; CHIH, C.; LIN, Y.; LIN, C.; LAI.C.H.; TERM, L. Surveillance of Antibiotic Prescriptions and the Prevalence of Antimicrobial Resistance in Non-Fermenting Gram-Negative Bacilli. **Microorganisms**, v.8, p.1-11, 2020.

CHOUDHARY, S.; SAR, P. Real-time PCR based analysis of metal resistance genes in metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain J007. **J. Basic Microbiol**, v.55, P- 1-10, 2015.

COSTA, J.S.T.; LIMA, C.A.; LEIVA, A.V.; MAGDALENA, I.S.M.; TOLEDO, H.B.; YÉVENES, M.D.; CAPURRO, A.O.; MONTECINOS, S.M.; AGUILUZ. M.Q.; ROCHA, G.G. Carbapenemasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales de Chile. **Rev Chilena Infectol**, v.38, p.81-87, 2020.

COSTA-J. S.D.; SILVA, A. M. C. M.; PEREIRA, J.N. P.; LIMA, J.L.C.; CAVALCANTI, I.M. F.; MACIE, A.V. Emergence of rmtD1 gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying blaKPC and/or blaVIM-2 genes in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52. P.1959–1965, 2021.

CUI, X; ZHANG, H; DU, H. Carbapenemases in enterobacteriaceae: detection and antimicrobial therapy. **Frontiers in microbiology**. v. 10, p. 1823-1858, 2019.

CUNNINGHAM, S. A.; NOORIE, T.; MEUNIER, D.; WOODFORD, N.; PATEL, R. Rapid and simultaneous detection of genes encoding *Klebsiella pneumoniae*

carbapenemase (bla KPC) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (bla NDM) in Gram-negative bacilli. **Journal of clinical microbiology**. v. 51, n. 4, p. 1269- 1271, 2013.

DAS.S.; DASH.; CHAKRABORTY.J. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Microbiol Biotechnol**, V.7, p 2967–2984, 2016.

DA SILVA, R.M.R.; DE MENDONÇA, S.C.B.; LEÃO, I.N.; DOS SANTOS, Q. N.; BATISTA, A.M.; MELO, M.S.; XAVIER, M. M; QUINTANS-J. L.J.; DA SILVA, W.B.; FRAGA, I.M. LoboUse of monitoring indicators in hospital management of antimicrobials. **BMC Infect Dis**, v.21, p.1-8,2021.

DAIKOS, G.L.; DA CUNHA, C.A.; ROSSOLINI, G. M.; STONE, G.G.; BAILLON-P, N.; TAWADROUS, M.; IRANI, P. Review of Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotic**, v.10, p.1.24,2021.

DEREDJIAN A, COLINON C, BROTHIER E, FAVRE-BONT\_E S, COURNOYER B, NAZARET S. Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Res Microbiol**, p. 162:689, 2011.

DUCRET, V.; GONZALEZ, M.R; LEONI, S; VALENTINI. M.; PERRON. K. The CzcCBA Efflux System Requires the CadA P-Type ATPase for Timely Expression Upon Zinc Excess in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.1-13, 2020.

DUCRET, V.; ABDU, M.; MILHO, C.G.; LEONI, S.; PELAUD, O.M.; SANDOZ. A.; CAMPOS, I.S.; WAEBER-T. M-L.; VALENTINI. M.; PERRON. K. Global Analysis of the Zinc Homeostasis Network in *Pseudomonas aeruginosa* and Its Gene Expression Dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v.12, p. 1-17, 2021.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development--the failure of success? **Nat. Biotechnol**, v.24, p.1497, 2006.

FERNANDEZ, C. C; SOKOLONSKI, R. A; MAÍSA SANTOS FONSECA, M. S; STANISIC, D; ARAÚJO, D. B; AZEVEDO, V; PORTELA, R.D; TASIC, L. Applications

of Silver Nanoparticles in Dentistry: Advances and Technological Innovation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22 p. 1-22, 2021.

FIGUEREDO, A. C.; FREITAS, N.L.; DALMOLIN, T. V.; BRANDÃO, F. *Pseudomonas aeruginosa*: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p. 9661-9672, 2021.

FREITAS, D.Y; ARAUJO, S; FOLADOR, A. R.C; RAMOS, R. T. J; AZEVEDO, TACÃO, M; SILVA, A; HENRIQUES, I; BARAÚNA, R, A. Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria Recovered From na Amazonian Lake Near the City of Belém, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 1-13, 2019.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. **Journal of bacteriology**, July, p. 4457–4465, 2004

GALLARDO-BENAVENTE, C.; CAMPO-GIRALDO, J.L.; CASTRO-SEVERYN, J.; QUIROZ, A.; PÉREZ-DONOSO, J.M. Genomics Insights into *Pseudomonas* sp. CG01: An Antarctic Cadmium-Resistant Strain Capable of Biosynthesizing CdS Nanoparticles Using Methionine as S-Source. *Genes*, v.12. p.1.19, 2021.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA SILVA.; PUPO, M.T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agentes. **Química Nova**. v. 33, p.667-679, 2010.

GUPTA, A.; JYOT, J.; RAVI. M.; RAMPHAL, R. High pyocyanin production and non-motility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates are correlated with septic shock or death in bacteremic patients. **Ploss one**, v. 16, p.1-15, 2021.

GILLINGS, M. R; Integrons: Past, Present, and Future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.78, n. 2, p. 257-277, 2014.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; P. D. RYAN. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9. [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm), 2001.

HANCZVIKKEL, A; FÜZSI, M.S.; UNGVÁRI, E.; TÓTH, A. Transmissible silver resistance readily evolves in high-risk clone isolates of *klebsiella pneumoniae*, **Acta Microbiol Immunol Hung**, v.65. p. 387-403, 2018.

HASSETT, D. J.; KOVALL, R. A.; SCHURR. M. J.; KOTAGIRI. N.; KUMARI. H.; SATISH. L. The Bactericidal Tandem Drug, AB569: How to Eradicate Antibiotic-Resistant Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* in Multiple Disease Settings Including Cystic Fibrosis, Burns/Wounds and Urinary Tract **Infections**. v.12. p. 1-17. 2021.

HEMBACH, N; SCHMID, F; ALEXANDER, J; HILLER, C; RGALL, E.T; SCHWARTZ T. Occurrence of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. **Frontiers in Microbiology**. v.8, p1-11, 2017.

HICKMAN,R.A.;LEANGAPICHART,T.;LUNHAK.;JIWAKANON, J.; ANGKITITRAKUL, S.; MAGNUSSON, U. *et al.*, Exploring the Antibiotic Resistance Burden in Livestock, Livestock Handlers and Their Non-Livestock Handling Contacts: A One Health Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.12, p.1-12, 2021.

HOBMAN, L.J; CROSSMAN, L.C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. **Med. Microbiol**, v. 64 p. 471-497, 2015.

HUMPHRIES,R.;BOBENCHIK, A.;HINDLER, J.A.; SCHUETZ, A. N. Overview of Changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100, 31st Edition, **Journal of Clinical Microbiol**\_, v.58. p.213-221, 2021.

IBRAHIM· D.; JABBOUR, J-F.; KANJ, S.S. Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 33. p. 464-473, 2020.

IMRAN, M.; DAS, K.R.; NAIK, M.M. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in. **Chemosphere** v.215, p. 846-857, 2019.

JÄRUP, L.; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238. p. 201-208. 2009.

KADRI, S.S.; ADJEMIAN, J.; LAI, Y.L.; SPAULDING, A.B.; RICOTTA, E.; PREVOTS, R.; PALMORE, T.N.; RHEE, C.; KLOMPAS, M.; DEKKER, J. P.; POWERS, J.H.; SUFFREDINI, A. F.; HOOPER, D.C.; FRIDKIN, S.; DANNER, L. Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-line Agents. **Clinical Infectious Diseases**, v.67. p. 1803-1814, 2018.

KASHFK, M.; HASHEMI, A.; ESLAMI, J.; SADREDIN.; M.; TARASHI, S.; TAKI, E. The Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzyme Genes Among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Burn Patients. **Arch Clin Infect Dis**, v. 12. p.1-5, 2018.

KARNIEL, Y.Y.; JIN. F.; WONG4. G. C. L.; FRENKEL. D.; DOBNIKAR, J Emergence of complex behavior in pili-based motility in early stages of *P. aeruginosa* surface adaptation. **Scientific reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.

KAUSHIK, M; KUMAR, S; KAPOOR, R. K; VIRDI, J. S; GULATI, P. Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology, International. **Journal of Antimicrobial Agents**. v.51, p. 167-176, 2018.

KIM, D.Y.; CHA, C-J. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. **Experimental & Molecular Medicine**, v.53, p. 301–309, 2021.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KUMAR, M.; JAISWAL, S.; SODHI, K. K.; SHREE, P.; SINGH, D. K.; AGRAWAL, P. K. SHUKLA, P. Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. **Environment international**. v.124, p.448-461, 2019.

LACROIX, B; CITOVSKY, V. Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. **American Society for Microbiology**. v.7 p. 1-9, 2016.

LAFFITE, A; KILUNGA P; KAYEMBE J; DEVARAJAN, N; MULAJI, C. K; GIULIANI, G, SLAVEYKOVA, V; POTÉ, J; Hospital Effluents Are One of Several Sources of Metal, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Markers Disseminated in Sub-Saharan Urban Rivers, **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p.1-14, 2016.

LAZOVSKI, J; CORSO, A; PASTERAN, F; MONSALVO, M; FRENKEL, J; CORNISTEIN, W; CORRAL, G; NACINOVICH, F. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. **Rev Panam Salud Publica** v. 41, p. 1-7, 2017.

LAVAGNOLI, L, S.; BASSETTI, B, R.; KAISER, T, D, L.; KUTZ, K, M.; Cerutti, C, J. Factors associated with acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Revista Latino-Am. Enfermagem**. v.25, p. 2935-2954, 2017.

LECLERC, Q.J.; WILDFIRE, J.; GUPTA, A.; LINDSAY, J.A.; KNIGHT, G. M. GROWTH-Dependent Predation and Generalized Transduction of Antimicrobial Resistance by Bacteriophage. **mSystems** v.7. p. 1-22, 2022.

LI, Y.; WANG, Y.W.; LI, C. W.; ZHAO, DE P.; HU, K. Y.; ZHOU, M.; DU, M.; LI, J.; WAN, P.X. The Role of Elastase in Corneal Epithelial Barrier Dysfunction Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Exoproteins. **Cornea**, v.62, p.1-11, 2021.

LIMA, L. M.; SILVA, B.N.M.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J.; B-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, P.1-25, 2020.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.22, p.582–610. 2009.

LIWA, A. C.; JAKA, H. Antimicrobial resistance: Mechanisms of action of antimicrobial agentes. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. **Formatex**. v.1 p. 876-874, 2015.

LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, p. 1825-1829, 2018. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/family?page=enterobacteriaceae>. Acesso em 24-10-20

LOUREIRO, R. J; RAQUE, F; RODRIGUES, A, T; RAMALHEIRA; HERDEIRO, M. T; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos é as resistências bacterianas: Breve notasobre a evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**. v.1, p.1- 8, 2016.

MA, Y-X; WANG, C-Y; LI, Y-Y; LI, J; WAN, Q-Q; CHEN, J-H; TAY, F. R; NIU, L-N. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections, **Advanced Science News**, v.7, p.1-43, 2020.

MAGIORAKOS A.P.; SRINIVASAN A.; CAREY R.B, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect** 2012; v.18, p.268–281. 2012.

MARGUERETTAZ ,M.; DIEPPOIS ,G.; QUE . Y. AI. DUCRET .V.; ZUCHUAT-S, PERRON.K. Sputum containing zinc enhances carbapenem resistance, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Pathog**, v.77. p.36-41, 2014.

MARTIN, R. M. M.; BACHMAN, M. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.8, p. 1-15, 2021.

MATESANZ, M.; MENSA, J. Ceftazidime-avibactam. **Revista española de quimioterapia**, v.34, p. 38-40, 2021.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 28, n. 3, p. 565–591, 2015.

MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiol Spectrum** v.6, p.1-26, 2018.

MENSA, J.; BARBERÁN, J.; SORIANO, A.; LLINARES, P.; MARCO, F.; CANTÓN, R.; BOU, G.; CASTILLO, J.J.; MASEDA, E.; AZANZA, J.R.; PASQUAU, J.; VIDAL, G. C.; REGUERA, J. M.; SOUSA, D.; GÓMEZ, J.; MONTEJO, M.; BORGES, M.; TORRES, A.; LERMA, F. A.; SALAVERT, M.; ZARAGOZA, R.; OLIVER, A. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. **Rev Esp Quimioter**, v.31. p.78-100, 2018.

MOYES, R; REYNOLDS, J; BREAKWELL, P. Differential staining of bacteria: gram stain. **Curr Protoc Microbiol**, v.1 p.1-8. 2009.

MIELKO, K.N. JABŁOŃSKI, S.J.; MILCZEWSKA, J.; SANDS, D.; ŁUKASZEWICZ, M.; MŁYNARZ, P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 35 p.1-11. 2019.

MOTTA-S. S, ALDANA, M., 2016. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v.8, p.253–267. 2016.

MOHAMED, E. R; ALY, S. A; HALBY, H. M; AHMED, S. H; ZAKARIA, A. M; EL-ASHEERO, S. M. Epidemiological typing of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, which causes paediatric ventilator-associated pneumonia in Egypt. **Journal of Medical Microbiology**. v. 66, p. 628-634, 2016.

MOZEL, D. Integrons: agents of bacterial Evolution. **Nature Reviews Microbiology**. v.4 p.608-620, 2006.

MOZAZ, S.R; Chamorro, Sara; Mart. E; Huerta. B; Gros, M; Melsió, A. S; Borrego C. M; Barceló. Balcázar; J. L. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**. v.69, p. 234-242, 2015.

MULANI, M. S; KAMBLE, E. E; KUMKAR, S. N; TAWRE, M. S; PARDESI, K. R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p1-24, 2019.

MIELKO, K.N. JABŁOŃSKI, S.J.; MILCZEWSKA, J.; SANDS, D.; ŁUKASZEWICZ.M.; MŁYNARZ. P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 35 p.1-11. 2019.

NODARI, C. S; BARTH, A. L. Resistência a antimicrobianos em enterobactérias: Foco em carbapenemases. Artigo de Revisão. Universidade Federal de São Paulo, p.1-30, 2016.

NGUYEN, C.C.; HUGIE, C.N.; KILE, M.L.; Daneshmand, t.n. Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs: A review. **Front. Environ. Sci. Eng**, v.13. p.1-17, 2019.

NAVIDINIA, M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. **Journal of Paramedical Sciences**. v.7, n.3, p.43-57, 2016.

OLSVIK, O.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington: ASM, p. 271-276, 1993.

OKOLIEGBE, I.N.; HIJAZI, K.; COOPER, K.; IRONSIDE, C.; GOULD.I.M. Trends of Antimicrobial Resistance and Combination Susceptibility Testing of Multidrug-

Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients: a 10-Year Update. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65. p.1-10, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Review on Antimicrobial Resistance . Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Review on Antimicrobial Resistance, London, United Kingdom, 2014. Acesso em: [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

OVES. M.; HUSSANI. Antibiotics and heavy metal resistance emergence in water borne bacteria. **Journal of Investigative Genomics**, v.3. p. 23-25. 2016.

PAULA, V. G; QUINTANILHA, L. V; SILVA, F. A. C; ROCHA, H. F; SANTOS, F.L. Enterobactérias produtoras de carbapenemase: Prevenção da disseminação de superbactérias em UTI's. **Universitas:Ciências da Saúde**. v.14, n.2, p.175-185. Brasília, 2016.

PAL. C.; ASIANI. K.; ARYA. S.; RENSING. C.; STEKEL. D.; LARSSON.D. G.; HOBMAN. J. L. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. **Adv Microb Physiol**, v.70. p. 261-313, 2017.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* Story. **Environmental Microbiology**, v.12, p.1377–1383, 2010.

PANG, Z.; RAUDONISB, R.; GLICKC, B. R.; LINA, T. J.; CHENGA, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies, **Elsevier** v.37. p.177-192, 2019.

PARKINS, M, D.; SOMAYAJI, R.; WATERS, V. J. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis, Parkins, M, D.; Somayaji, R.; Waters, V. J. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, p. 18-19, 2018.

PATTIS, I.; WEAVER, L.; BURGESS, S.; USSHER, J.E.; DYET, K. Antimicrobial Resistance in New Zealand-A One Health Perspective, *Antibiotics*, v. 11, p. 1-26, 2022

PEREIRA, E. L; OLIVEIRA, A, F, A. A produção de antibióticos por processos fermentativos aeróbios, *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. v. 14, n. 2, p. 1058-1078, 2016.

PETITJEAN, M.; MARTAK, D.; SILVANT, A.; BERTRAND, X.; VALOT, B.; HOCQUET, D. Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microbial Genomics*, v.3, p. 1-10, 2017.

PITONDO-SILVA, A.; GONÇALVES, G.B.; STEHLINGH, E. G. Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils, *APMIS*, v. 124, p.1-8, 2016.

PONTES, D. S; ARAUJO R. S.A; DANTAS, N; SCOTT, L. M.T; MOURA, R.O; MENDONÇA-JUNIOS, F.J.B. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v.18, p. 42–74, 2018.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Wiley Online Library*. v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.

PREMANANDH, J; SAMARA, B. S; MAZEN, A. N. *Race Against Antimicrobial Resistance Requires Coordinated Action – An Overview*. *Frontiers in Microbiology* v.6, p. 1-6 2016.

PARTRIDGE, S. R; KWONG, S. M; FIRTH, N; JENSEN, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. v.3, p.17-88, 2018.

PORMOHAMMAD. A.; TURNER. R.J. Silver Antibacterial Synergism Activities with Eight Other Metal(Ioid)-Based Antimicrobials Against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, v.9, p.1-19, 2020.

QIN, S.; XIAO, W.; ZHOU, C.; PU, Q.; DENG, X.; LAN, L.; LIANG, H.; SONG, X.; WU, M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, p. 1-27, 2022.

RAFAT, C. E; MESSIKA, J; BARNAUD, G; DUFOUR, N; MAGDOUD, F; POMARES-BILLARD, T; GAUDRY, S; DREYFUSS, D; BRANGER, C; DECREÉ, D; RICARD, J-D. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, a 5-year study in a French ICU. **Journal of Medical Microbiology**. v.67 p.1083-1089, 2018.

RAJA, C. E.; SASIKUMAR, S.; SELVAM, G.S. Adaptive and cross resistance to cadmium (II) and zinc (II) by *Pseudomonas aeruginosa* BC15, **Versita**, v.63p. 461-465, 2008.

RAMAN, G.; AVENDANO, E.; CHAN, J.; MERCHANT, S.; PUZNIAK, L.; Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 79, p.1-14, 2018.

ROSTAMI, S.; SHEIKH, A. F.; SHOJA, S.; FARAHANI, A.; TABATABAIEFAR, M. A.; JOLODAR, A.; SHEIKHI, R. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **J Chin Med Assoc**, v. 81, p. 127-132, 2018.

SACSAQUISPE-CONTRERAS; BAILÓN-CALDERÓN, R. Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. v.35, p. 259-264. 2017.

SALMAN M.; RIZWANA. R.; KHAN.H.; MUNIR. I.; HAMAYUN, M.; IQBAL. A.; REHMAN, A.; AMIN. K.; AHMED.G.; KHAN. M.; KHAN, M.; AMIN. F.U. Synergistic effect of silver nanoparticles and polymyxin B against biofilm produced

by *Pseudomonas aeruginosa* isolates of pus samples in vitro. **Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.** v. 47, p. 2465-2472, 2019.

SANNA, A.; FIRINU. D.; ZAVATTARI, P.; VALERA. P. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 10. P 1-17, 2018.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Research International.** v.1, p1-9, 2016.

SANTOS, Andressa Liberal Santos. **Perfil fenotípico e genotípico de Enterobactérias resistentes aos beta-lactâmico.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

SANTOS, J. G; FONSECA, B. O; BELLO, A. R; PEREIRA, J. A. A. Avaliação de transferência de marcadores de resistência por conjugação em enterobactérias resistentes aos antimicrobianos e telurito de potássio no ambiente hospitalar. **Revista Pensar.** v.4 p.30-41, 2018.

SARAIVA, M. DE M. S.; LIM, K.; MONTE, D.F.M.; GIVISIEZ, P.E.N.; ALVES, L.B.R. ET AL., Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a one health perspective applied to the poultry industry, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p.465–486, 2022.

SILVA, C.L. **AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS DE BASTONETES GRAM- NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES ISOLADOS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS HOSPITALARES.**

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte- MG, 2019.

SHI, GAO, Y.; YIN, D.; SONG, Y.; KANG, J.; LI, X.; ZHANG, Z.; FENG, X. Duan, J. The effect of the sub-minimal inhibitory concentration and the concentrations within resistant mutation window of ciprofloxacin on MIC, swimming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Pathog**, v.137, 2019.

SOONTHORNSIT, J.; PIMWARALUCK. K.; KONGMUANG.; N.; PRATYA. P.; PHUMTHANA. N. Molecular epidemiology of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a veterinary teaching hospital environment. **Veterinary Research Communications**, v.1, p1-14. 2022.

STALDER, T.; BARRAUD, O.; JOVE, T.; CASELLAS, M.; GASCHET, M.; DAGOT, C.; PLOY, M-C. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool, **The ISME Journal** v.8 p. 768-777, 2014.

SU, S. Y.; LIN, JY.; CHU, C.; SU, LH.; LIN, TY.; CHIU, CH. Resistência ao imipenem associada ao integron em *Acinetobacter baumannii* isolado de um hospital regional em 15 Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 27, p. 81- 84, 2006.

SÜTTERLIN, S.; DAHLÖ M.; TELLGREN-ROTH. C.; SCHAAL. W.; MELHUS. Å. High frequency of silver resistance genes in invasive isolates of *Enterobacter* and *Klebsiella* species. **J. Hosp. Infect.**; v. 96, p.256–261, 2017.

SUZUKI S, HORINOUCHE T, FURUSAWA C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

SUZUKI, T. SAYURI, O.; NAOKO, O.; NAOKI, H.; NAOMASA, G.; ATSUSHI, S. Role of pvdE Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. **Cornea**.v.37, p.99–105, 2018.

TACCONELLI, E; CARRARA. E; SAVOLDI, A; HARBARTH, S; MENDELSON, M; MONNET, D. L; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 21 p.1- 10, 2018.

TARAZI, Y.H.; ZUHAIR-E.B.; SHEREEN, B.; JAWASREH, I. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water and hospitalized patients in Jordan, **Acta Tropica**, v.217, p.1-18, 2021.  
TARTARI, D. C.; ZAMPARETTEA, C.P.; MARTINI, G.; CHRISTAKIS, S.; COSTA, L.H.; SILVEIRA, A.C.O.; SINCERO, T.C.M. a Genomic analysis of an extensively

drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST312 harbouring IncU plasmid-mediated blaKPC-2 isolated from ascitic fluid. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.25, p. 151–153, 2021.

THI, M.T.T.; WIBOWO. D.; REHM, B. H.A *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, **Molecular Sciences** v.21. p.1-25,2020.

TORTORA, GERARD. J.; FUNKE, BERDELL. R; CASE, CHRISTINE. L. **Microbiologia**. Ed.12. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UPADHYAY. A.; SRIVASTAVA. S.; Mechanism of zinc resistance in a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p.73-82, 2014.

VAREECHON, C.; ZMINA, S.E.; Karmakar, M.; Pearlman.; Rietsch, A. *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. **Cell Host & Microbe**, v.21. p611-618, 2017.

VIRIEUX-PETIT, M.; HAMMER-DEDET, F.; AUJOULAT, F.; JUMAS-BILAK, E.; BERTRAND, S.R. From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success. **Genes**, v.13. p.1-24, 2022.

VOS, M.; SIBLEYRAS. L.; LO.; HESSE. E.; GAZE, W.; KLUMPER, U.; Zinc can counteract selection for ciprofloxacin resistance. **Physiology & Biochemistry**, v.367, p. 1-8, 2020.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? *Angew Chem. Int. Ed*, 45, p. 5072, 2006.

WANG, Y.; WANG, J.; WANG, R.; CAI. Y. Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 18-27, 2020.

- WANG, H.; LI, J.; MIN, C.; XIA, F.; TANG, M.; LI, J.; HU, Y.; ZOU, M. Characterization of Silver Resistance and Coexistence of sil Operon with Antibiotic Resistance Genes Among Gram-Negative Pathogens Isolated from Wound Samples by Using Whole-Genome Sequencing. **Infection and Drug Resistance**, v.15, p. 1425-1437, 2022.
- WRIGHT A.; HAWKINS. C.H.; ANGGÅRD. E.E.; HARPER.D. R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clin Otolaryngol**, v. 34. P. 349-357, 2009.
- WINTERSDORFF, C. J. H.; PENDERS, J.; NIEKERK, J. M.; MILLIS, N. D.; MAJUMDER, S.; VAN ALPHEN, L. B.; SAVELKOUL, P. H. M.; WOLFFS, P. F. G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 173, p. 1-10, 2016.
- WALES, A.D; DAVIES, R.H. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. **Antibiotics**, v.4, p.567-604, 2015.
- WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance; ASM- Washington, 2003. **Protein Science**, v. 13, p.3059-3060, 2004.
- WANG, X; WANG, Y; ZHOU, Y; LI, J; YIN, W; WANG, S; ZHANG, S; SHEN, J; SHEN, Z; WANG, Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes & Infections**. v.7, p.1-9 2018.
- WOODFORD N, ELLINGTON MJ, COELHO JM, TURTON JF, WARD ME, BROWN S, 20 AMYES SG, LIVERMORE DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**. v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.
- YAN, Y.; SHI. M.; FANNIN, R.; YU, L.; LIU, J.; CASTRO. L.; DIXON.; D. Prolonged Cadmium Exposure Alters Migration Dynamics and Increases Heterogeneity of Human Uterine Fibroid Cells-Insights from Time Lapse Analysis. **Biomedicines**, v.10. p.1-19. 2022.

YAHAV, D.; GISKE, C.G.; GRAMATNIECE, A.; ABODAKPI, H.; TAM, V.; LEIBOVICIB, L. New -Lactam-Lactamase Inhibitor Combinations. **Clin Microbiol** Ver, v.34. p. 1-61,2021.

YUEN- W, E; KNOPP, M; HJORT, K; KOSKINIEMI, S; BERG, G. O OTTO G. BERG2 & ANDERSON, D. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. **Nature communications**. v. 9, p.1-12, 2018.

YU. Z.; GUNN .L; WALL . P.; FANNING. S. Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. **Food Microbiol**, v.64. p. 23-32, 2017

ZHANG J, ZHENG B, ZHAO L, WEI Z, JI J, LI L, XIAO Y. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with 35 community-onset infections in Chinese county hospitals. **BMC infectious diseases**. v. 14, n. 1, 2014.

ZHAO, L.; WANG, S.; LI, X.; HE. X.; JIAN, L. Development of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas*. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v.9. p.1-8, 2020.

ZHANG. Z.; ZHANG. X. Evolution of Subfamily I.1 Lipases in *Pseudomonas aeruginosa*, **Current Microbiology** v. 79, p- 3494–3504, 2021.

ZIVKOVI-LI.; RIKALOVIC, M.; CVIJOVI -G.G.; VRVIC, K.M.; BRCESKI, L.; SKOSKI, V.B.; LONCAREVI, B.; GOPCEVI, K.; KARADZIC, I. Cadmium specific proteomic responses of a highly resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. **RSC Adv**, v.16, p. 10549-10560, 2018.

## 9. ANEXO

| Amostras | MER               |      |        | AMI               |      |        | CAZ               |      |        | PPT               |      |        | CIP               |      |        |
|----------|-------------------|------|--------|-------------------|------|--------|-------------------|------|--------|-------------------|------|--------|-------------------|------|--------|
|          | MIC               | CLSI | BRCast | MIC               | CLSI | BRCast | MIC               | CLSI | BRCast | MIC               | CLSI | BRCast | MIC               | CLSI | BRCast |
|          | $\mu\text{g/ ml}$ |      |        | $\mu\text{g/ ml}$ |      |        | $\mu\text{g/ ml}$ |      |        | $\mu\text{g/ ml}$ |      |        | $\mu\text{g/ ml}$ |      |        |
| 2        | $\geq 64$         | R    | R      | 128               | R    | R      | 32                | R    | R      | 128               | R    | R      | 32                | R    | R      |
| 16       | 16                | R    | R      | $\geq 256$        | R    | R      | 2                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 25       | 2                 | S    | S      | 16                | S    | S      | 64                | R    | R      | 128               | R    | R      | 32                | R    | R      |
| 79       | 4                 | I    | I      | 4                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 8                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 97       | 1                 | S    | S      | 4                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 8                 | S    | I      | 0,5               | S    | R      |
| 114      | 2                 | S    | S      | 8                 | S    | S      | 64                | R    | R      | 128               | R    | R      | 32                | R    | R      |
| 121      | 2                 | S    | S      | 1                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 16                | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 195      | 1                 | S    | S      | 4                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 8                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 196      | 0,5               | S    | S      | 2                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 199      | 0,5               | S    | S      | 8                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 8                 | S    | I      | 0,5               | S    | R      |
| 235      | 16                | R    | R      | 8                 | S    | S      | 16                | I    | R      | 64                | I    | R      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 243      | 16                | R    | R      | 128               | R    | R      | 32                | R    | R      | 64                | I    | R      | 32                | R    | R      |
| 246      | 0,5               | S    | S      | 4                 | S    | S      | 2                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 250      | 1                 | S    | S      | 4                 | S    | S      | 2                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 268      | 2                 | S    | S      | 8                 | S    | S      | 128               | R    | R      | 512               | R    | R      | 1                 | I    | R      |
| 283      | 2                 | S    | S      | 2                 | S    | S      | 2                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | 0,5               | S    | R      |
| 292      | 0,5               | S    | S      | 2                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 16                | S    | I      | $< 0,25$          | S    | S      |
| 318      | 4                 | I    | I      | 128               | R    | R      | 2                 | S    | I      | 8                 | S    | I      | 16                | R    | R      |
| 319      | 0,5               | S    | S      | 2                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 2                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 324      | 1                 | S    | S      | 2                 | S    | S      | 2                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | S      |
| 340      | 4                 | I    | I      | 4                 | S    | S      | 2                 | S    | I      | 4                 | S    | I      | $< 0,25$          | S    | S      |
| 353      | $\geq 64$         | R    | R      | $\geq 256$        | R    | R      | $\geq 256$        | R    | R      | $\geq 512$        | R    | R      | 2                 | R    | R      |
| 360      | 1                 | S    | S      | 2                 | S    | S      | 4                 | S    | I      | 8                 | S    | I      | $\leq 0,25$       | S    | R      |

|     |              |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |             |   |   |
|-----|--------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|-------------|---|---|
| 362 | 1            | S | S | 2          | S | S | 8          | S | I | 64         | I | R | $\leq 0,25$ | S | S |
| 368 | 2            | S | S | 4          | S | S | 64         | R | R | 256        | R | R | $\leq 0,25$ | S | S |
| 390 | 1            | S | S | 1          | S | S | 8          | S | I | 8          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 394 | $\leq 0,125$ | S | S | 2          | S | S | 2          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 431 | 1            | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 444 | 0,25         | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 452 | 1            | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 4          | S | I | $< 0,25$    | S | S |
| 454 | 0,5          | S | S | 4          | S | S | 2          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 463 | 1            | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 8          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 480 | 4            | I | I | 4          | S | S | 2          | S | I | 8          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 501 | 4            | I | I | 2          | S | S | 4          | S | I | 16         | S | I | 0,5         | S | R |
| 525 | $\geq 64$    | R | R | $\geq 256$ | R | R | $\geq 256$ | R | R | $\geq 512$ | R | R | 4           | R | R |
| 549 | 1            | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 8          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 550 | 0,25         | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 589 | 2            | S | S | 2          | S | S | 8          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 598 | 1            | S | S | 2          | S | S | 2          | S | I | 4          | S | I | 0,5         | S | R |
| 614 | 1            | S | S | 8          | S | S | 4          | S | I | 8          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 619 | 16           | R | R | 8          | S | S | 16         | I | R | 16         | S | I | 0,5         | S | R |
| 630 | 2            | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 8          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |
| 632 | 16           | R | R | 8          | S | S | 128        | R | R | 512        | R | R | $\leq 0,25$ | S | S |
| 652 | 1            | S | S | 2          | S | S | 4          | S | I | 4          | S | I | $\leq 0,25$ | S | S |