

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**SISTEMAS DE EFLUXO MexAB-OprM E MexXY E PRODUÇÃO DE
CARBAPENEMANSES EM *Pseudomonas aeruginosa*: EFEITO NA RESISTÊNCIA
AOS CARBAPENÊMICOS.**

DARIANE CASTRO PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**SISTEMAS DE EFLUXO MexAB-OprM E MexXY E PRODUÇÃO DE
CARBAPENEMANSES EM *Pseudomonas aeruginosa*: EFEITO NA RESISTÊNCIA
AOS CARBAPENÊMICOS.**

DARIANE CASTRO PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Castro Pereira, Dariane

SISTEMAS DE EFLUXO MexAB-OprM E MexXY E PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES EM *Pseudomonas aeruginosa*: EFEITO NA RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS. / Dariane Castro Pereira. -- 2013.
57 f.

Orientador: Afonso Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. mexAB. 2. carpanemases. 3. mexXY. 4. meropenem. I. Barth, Afonso, orient. II. Título.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos os meus pais
por sempre terem colocado a educação como prioridade.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Afonso Luis Barth pela orientação, oportunidade de trabalhar ao seu lado e por auxiliar no meu desenvolvimento no âmbito acadêmico e profissional.

À Dra. Larissa Lutz por ter possibilitado minha entrada no grupo de pesquisa em resistência bacteriana e por ter viabilizar o meu amadurecimento e crescimento com o aprendizado de diversas técnicas laboratoriais.

À Denise Pires Machado pelo apoio e incentivo durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Leandro Perez pela atenta leitura e por valiosa contribuição ao trabalho.

Aos meus Pais pelo amor e apoio para que o mestrado pudesse ser concretizado.

A todos os colegas do Laboratório de Resistência bacteriana pelo convívio e aprendizado.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo

Aos funcionários da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo convívio e suporte fundamental para que a pesquisa possa ser realizada.

"Happiness is only real when shared..."

Resumo

Introdução. *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno clinicamente importante. Existem diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*, dentre eles a produção de enzimas (β -lactamases) e sistemas de efluxo se destacam, uma vez que são capazes de conferir resistência aos carbapenêmicos. **Objetivo.** Avaliar os sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexXY em isolados clínicos de *P.aeruginosa* de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS e relacionar a expressão destes sistemas com a CIM de meropenem em isolados produtores e não produtores de metalo-beta-lactamases (MBL). **Metodologia.** Um total de 86 isolados de *P. aeruginosa* com suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos foram avaliados. A hiperexpressão dos sistemas MexAB e MexXY foi determinada fenotipicamente utilizando inibidor seletivo da bomba (Pa β N). MBLs foi determinada por PCR utilizando primers específicos. **Resultados.** O fenótipo de hiperexpressão dos sistemas de efluxo estudados foi observado em 34 (47,8%) dos 71 isolados negativos para a produção de MBL e em 14 (93.3%) dos 15 isolados MBL positivos. Na presença de Pa β N, todos os isolados não produtores de MBL apresentaram uma redução da CIM para meropenem para valores na faixa de suscetibilidade. Entretanto, das 13 *P. aeruginosa* produtoras de MBL que diminuíram a CIM, essa redução não foi para valores dentro da faixa de sensibilidade. **Conclusão.** Os isolados de *P. aeruginosa* não produtores de MBL apresentam resistência ao meropenem devido a hiperexpressão de MexAB-OprM. Na presença de Pa β N, independente de apresentarem produção de MBL, o CIM de meropenem reduziu para valores ≤ 8 mg/L. Contudo, quando isolados não apresentavam MBL, a CIM de meropenem reduziu para níveis de sensibilidade.

Palavras-chave: meropenem, carbapenemase, MexAB e MexXY.

Abstract

Introduction. Bacterial efflux pump systems are resistance mechanisms which may lead to therapeutic failure of antibiotic treatment since many antimicrobial agents are substrate for these mechanisms. The aim of the study was to evaluate the expression of the MexAB, MexXY pump efflux and to determine its influence on meropenem MIC in carbapenemase producing and non-producing *P. aeruginosa*. **Methods.** A total of 86 non-repetitive clinical isolates of *P. aeruginosa* with reduced susceptibility to carbapenems were evaluated. Overexpression of MexAB and MexXY efflux systems were evaluated phenotypically using the PA β N selective inhibitor. Metallo- β -lactamases (MBL) were detected by PCR using specific primers. **Results.** The efflux pump-overexpressed phenotype was observed in 34 (47.8%) MBL-negative and in 14 (93.3%) MBL-positive isolates. In the presence of the Pa β N, all non-producers of MBL presented a reduction of meropenem MICs to the range of susceptibility. In contrast, the 13 *P. aeruginosa* MBL-producing isolates decreased meropenem MICs at least 16-fold but this reduction did not reach the range of susceptibility. **Conclusion.** *P. aeruginosa* non-MBL-producing showed resistance to meropenem due to overexpression of MexAB-OprM. In the presence of Pa β N, the isolates harboring or not MBL genes, the meropenem MICs were reduced to values ≤ 8 mg/L. However, when the isolates harbor MBL genes, the meropenem MIC values were reduced to the susceptibility.

Keywords: meropenem, carbapenemase, MexAB e MexXY.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sistemas de efluxo RND envolvidos na resistência a antimicrobianos em diferentes patógenos.....	23
---	----

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura e função de Sistema de efluxo da família RND (resistance-nodulation division)	22
Figura 2. Organização genética dos operons <i>mexR-mexAB-oprM</i> , <i>mexTmexEF-oprN</i> , <i>nfxB-mexCD-oprJ</i> , <i>mexZ-mexXY</i> e <i>mexL-mexJK</i> de <i>P.aeruginosa</i>	27

Lista de abreviaturas

ABC – “ATP-binding cassette”

ATCC – “American Type Culture Collection”

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI – “Clinical Laboratory Standards Institute”

ESBL – Betalactamases de espectro estendido

FC - Fibrose Cística

MATE – “Multidrug and toxic compound extrusion”

MBL - Metalo- β -lactamases

MFS – “Major facilitator superfamily”

Pa β N - “Phe-Arg-naphthylamide”

RND – “Resistance-nodulation division”

SMR – “Small multidrug resistance”

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	15
2.2 <i>P. AERUGINOSA</i> E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	16
2.3 SISTEMAS DE EFLUXO	19
2.4 SISTEMAS DE EFLUXO E RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	20
2.5 FAMÍLIA RND.....	21
2.6. SISTEMAS DE EFLUXO EM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	24
2.7. MÉTODOS PARA AVALIAR EXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO	27
2.7.1 – TÉCNICA DE QRT-PCR.....	27
2.7.2 – INIBIDORES DA BOMBA DE EFLUXO	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. REFERÊNCIAS.....	31
5. ARTIGO.....	40

1. Introdução

Nas últimas décadas as infecções relacionadas à assistência em saúde (infecção hospitalar) tem sido um grande problema provocado por microrganismos multirresistentes (1). O impacto clínico da resistência bacteriana é caracterizado por aumento de custo, tempo de internação e mortalidade dos pacientes infectados. *Pseudomonas aeruginosa* foi descrito como o quinto patógeno mais frequente em infecções da corrente sanguínea e primeiro agente causador de pneumonia na América Latina de acordo com o SENTRY (“Antimicrobial Surveillance Program”) (1,2). A emergência de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes tem sido observada no Brasil e em todo o mundo, limitando as opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções (3).

Diferentes mecanismos de resistência têm sido identificados em *P. aeruginosa*, como hiperexpressão de bombas de efluxo, produção de β -lactamases e a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa. A hiperexpressão de bombas de efluxo, devido à mutação do gene regulador, ou a produção de enzimas β -lactamases, são exemplos importantes de resistência à classe dos agentes β -lactâmicos, em especial aos carbapenêmicos (4).

Os antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados para o tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa*. Inicialmente a resistência aos β -lactâmicos foi atribuída à hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC associada à impermeabilidade da membrana externa pela perda de porinas. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que muito da resistência associada à impermeabilidade é na realidade decorrente da hiperexpressão dos sistemas de efluxo. Estes sistemas expulsam do interior da célula uma grande variedade de substâncias, tais como solventes, pigmentos, desinfetantes e antimicrobianos (5, 6).

Apesar dos mecanismos de efluxo terem sido descritos há algum tempo, é relativamente recente seu reconhecimento como um mecanismo de resistência. Nos últimos anos, numerosos sistemas de efluxo foram caracterizados como sendo envolvidos no transporte de inúmeros fármacos (6) e esses sistemas de efluxo são descritos como importantes mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. (7, 8).

Este trabalho avaliou a hiperexpressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexXY em isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS. O estudo visou determinar a influencia da hiperexpressão de bombas de efluxo na concentração inibitória mínima (CIM) do meropenem em isolados produtores e não produtores de metalo- β -lactamases.

2. Revisão da Literatura

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* foi descrito em 1894 e é um dos gêneros bacterianos mais diversos e onipresentes cujas espécies foram isoladas ao redor do mundo em todos os tipos de ambientes, incluindo em amostras clínicas. *Pseudomonas* é um gênero de bactérias Gram-negativas que inclui espécies com implicações clínicas e ambientais. De forma geral, *Pseudomonas* spp. são microrganismos aeróbios, não-fermentadores da glicose, não esporulados, apresentando-se na forma de bacilos Gram-negativos, oxidase e catalase positivos e, geralmente, móveis com um ou muitos flagelos polares (9).

P. aeruginosa faz parte do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes e produz pioverdina ou fluoresceína, um pigmento amarelo-esverdeado ou amarelo-amarronzado. Outras cepas desta espécie poderão produzir um pigmento de coloração azul, denominado piocianina. Quando piocianina combina com pioverdina, uma coloração verde característica de *P. aeruginosa* é produzida. Nenhum outro bacilo gram-negativo (BGN) não-fermentador produz piocianina, logo sua presença pode ser usada para identificar esta espécie. Somente cerca de 4% das cepas clínicas não produzem piocianina (amostras apiocianogênicas) (9).

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* são β -hemolíticos em meio de ágar sangue e produzem colônias com bordas irregulares. As colônias podem apresentar coloração esverdeada devido à produção de pigmentos em meio de ágar sangue e outros meios seletivos como MacConkey, bem como ter aspecto mucóide devido à produção de alginato (copolímero constituído de unidades de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos) associado à formação de biofilmes, o que é comum em fibrose cística. Muitas cepas produzem um odor semelhante ao de uva, devido à presença da 2-aminoacetofenona, e odor adocicado, devido à produção de trimetilamina. Outras características-chaves na identificação de *P. aeruginosa* incluem teste

positivo para utilização de citrato, produção de arginina-dehidrolase, crescimento a 42°C e utilização da acetamida (10). *P. aeruginosa* pode produzir uma variedade de fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade, tais como a produção de endotoxinas (lipopolissacarídeo - LPS), motilidade, pili, cápsula e diversas exotoxinas: proteases, hemolisinas, lecitinasas, elastase e DNase (11).

Pseudomonas aeruginosa é um dos patógenos mais importante entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores (12, 13). Trata-se de uma bactéria ubiqüitária de metabolismo bastante versátil que pouco coloniza indivíduos saudáveis, sendo raramente causa de infecções comunitárias. *P. aeruginosa* está entre os cinco patógenos mais isolados em infecções de corrente sanguínea e o primeiro agente em pneumonias, segundo dados de programas de vigilância epidemiológica com amostras de países da América Latina (1). Uma grande variedade de doenças tem sido relacionadas à *P. aeruginosa*, incluindo bacteremias, infecções de tecidos moles, doenças pulmonares, especialmente entre indivíduos portadores de fibrose cística, infecções urinárias nosocomiais, endocardites, infecções seguidas de queimaduras ou trauma e, em alguns casos, sistema nervoso central, incluindo meningites (9).

2.2 *P. aeruginosa* e resistência aos antimicrobianos

P. aeruginosa apresenta resistência intrínseca a várias classes de antibióticos e, além disso, tem a habilidade de desenvolver resistência através de mutações em diferentes loci cromossomais ou por aquisição horizontal de genes de resistência através de plasmídios, transposons ou integrons. Assim, *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente à penicilina, ampicilina, cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações, sulfametoxazol-trimetoprima e cloranfenicol. É usualmente sensível aos aminoglicosídeos, penicilinas semi-sintéticas como piperacilina e ticarcilina, cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, carbapenênicos e fluorquinolonas (23). No

entanto, isolados clínicos de *P. aeruginosa* com baixa suscetibilidade aos carbapenêmicos tem sido relatados com frequência. Um estudo multicêntrico na América Latina observou diminuição da sensibilidade ao meropenem em 53,8%, 46,7%, 33,3%, e 28,8% dos isolados da Argentina, Brasil, Chile, e México, respectivamente (1).

Os mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* envolvem a hiperexpressão de bombas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana externa, perda de porina, expressão de enzimas inativadoras de antibióticos, como *AmpC*, betalactamases de espectro estendido (ESBL), e, principalmente, metalo- β -lactamases (MBL) (24-27).

No Brasil, a inativação enzimática de antibióticos, principalmente devido a produção de MBL, é descrita como mecanismo responsável pelos elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* (28, 29). MBLs pertencem à classe B na classificação funcional das β -lactamases e possuem zinco no sítio ativo da enzima (30). Além da inativação por agentes quelantes de metais, como EDTA e ácido mercaptopropiônico, as MBLs tem como características funcionais a potente atividade de hidrólise dos carbapenêmicos, a resistência frente a inibidores de β -lactamase e ausência de atividade contra monobactâmicos (31). O grupo das MBLs já descritas em *P. aeruginosa* incluem: IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German Imipenemase), AIM (Australian imipenemase), KHM (Kyorin health science metallo- β -lactamase), NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), DIM (Dutch Imipenemase) e FIM (Italy metallo- β -lactamase) (32). MBLs em isolados de *P. aeruginosa* tem sido relatadas com frequência crescente em todo o mundo, sendo as enzimas do tipo IMP e VIM as mais prevalentes (33, 34). No entanto, em isolados produtores de MBL no Brasil os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1} são os mais descritos (35-39). Com relação aos isolados de *P. aeruginosa* de Fibrose Cística há apenas relatos esparsos da presença de MBLs (40-42).

Inicialmente a resistência aos β -lactâmicos foi atribuída à hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC em associação com a impermeabilidade da membrana externa pela perda de porinas. A impermeabilidade em bactérias Gram-negativas refere-se à presença de uma membrana externa que fisiologicamente é a primeira linha de defesa contra compostos tóxicos. Porinas de membrana externa (OMP) controlam a entrada de substâncias na bactéria através da formação de canais, os quais permitem a difusão passiva de solutos hidrofílicos através da membrana externa (43). Em *P. aeruginosa*, diferentes porinas podem ser encontradas em sua membrana externa, cada qual com função específica, como OprC, OprD, OprE e OprF. Entre elas, a OprF é a mais abundante e, provavelmente, a mais utilizada para difusão da maioria dos β -lactâmicos no interior da célula bacteriana (44). As porinas OprC e OprE são canais inespecíficos, utilizados por alguns antimicrobianos (45). A presença de OprD tem sido amplamente investigada, uma vez que a ausência ou mesmo a expressão reduzida do gene *oprD* tem contribuído para a resistência aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem (46-49). Fisiologicamente, a função de OprD é permitir a captação dos aminoácidos básicos através da membrana externa. Sabe-se que é capaz de permitir a entrada de carbapenêmicos, ainda que não de outros agentes betalactâmicos (50). A afinidade e a capacidade de difusão do imipenem por meio dessa porina são muito mais elevadas que as observadas para o meropenem (51).

Entretanto, estudos posteriores demonstraram que muito da resistência associada à impermeabilidade é na realidade decorrente da hiperexpressão dos sistemas de bomba de efluxo (5, 6). Apesar dos mecanismos de efluxo serem reconhecidos há algum tempo, é relativamente recente o reconhecimento da sua importância em conferir resistência aos antimicrobianos (52), sendo de particular interesse entre microrganismos multirresistentes, principalmente em âmbito hospitalar (7, 8).

2.3 Sistemas de efluxo

Os sistemas de efluxo atuam limitando a concentração intracelular de substâncias, incluindo antimicrobianos, e tem sido descritos tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas (43, 53, 54). As bactérias devem proteger-se de compostos tóxicos provenientes do ambiente, e para evitar a acumulação intracelular desses compostos tóxicos desenvolveram sistemas dependentes de energia para ejetar essas moléculas para fora da célula, em um processo que não envolve a alteração ou a degradação dos compostos. Sendo assim, as bombas de efluxo, estão presentes nas bactérias como mecanismo de defesa, uma vez que auxiliam na extrusão de compostos tóxicos. As bombas de efluxo possuem papel importante na fisiologia bacteriana, uma vez que estão relacionadas com a tolerância a bile em bactérias entéricas, assim como desempenham função importante no metabolismo e na patogenicidade bacteriana (55, 56).

De uma maneira geral, os sistemas de efluxo são divididos em 5 famílias: MFS ("major facilitator superfamily"), SMR ("small multidrug resistance"), MATE ("multidrug and toxic compound extrusion"), ABC ("ATP-binding cassette transporter") e RND ("resistance-nodulation division") (57). A principal diferença entre as famílias é a fonte de energia utilizada para realizar o transporte de substâncias para fora da célula. O sistema do tipo ABC é uma bomba dependente de ATP, pois utiliza a energia derivada da hidrólise de ATP para ejetar substâncias para fora da célula. Apesar de descritos em bactérias Gram-negativas (54), o sistema de efluxo ABC está raramente envolvido na resistência aos antimicrobianos neste grupo de bactérias, desempenhando, contudo, um papel importante na resistência de bactérias Gram-positivas (52). Os sistemas RND, SMR e MFS utilizam a força motriz por prótons como energia para o efluxo, enquanto os transportadores do tipo MATE utilizam a energia de gradiente de H^+ ou Na^+ (27).

Enquanto alguns sistemas de efluxo como TetA e CmlA seletivamente expulsam da célula bacteriana tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente, outros sistemas de efluxo, como MexAB-OprM (*P. aeruginosa*), NorA (*S. aureus*) e BmrA (*Bacillus subtilis*) tem como substrato uma variedade de compostos não relacionados, desde detergentes, desinfetantes, biocidas até antimicrobianos (58-60). Por esse motivo, os sistemas de efluxo tem sido relacionados com a multirresistência antimicrobiana, uma vez que podem transportar múltiplos substratos (6). A maioria desses sistemas de efluxo está localizada no cromossomo, conferindo resistência intrínseca, porém alguns sistemas podem ser adquiridos através de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons), proporcionando assim um meio de transferência de resistência (61).

Apesar da análise da sequência do genoma de *P. aeruginosa* ter revelado a presença dos sistemas de efluxo das cinco famílias descritas acima, a grande maioria dos sistemas nesse microrganismo pertence à família RND, compreendendo um total de 12 sistemas (24, 62). Dessa forma, em *P. aeruginosa* os sistemas de efluxo da família RND é um dos mais relevantes clinicamente, uma vez que antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, dentre outros, são substratos para sistemas das bombas de efluxo dessa família. Além disso, sistemas da família RND tem sido mais bem caracterizados em bactérias gram-negativas, sendo AcrAB-TolC de *E. coli* (63) e MexAB-OprM de *P. aeruginosa* os mais estudados (5).

2.4 Sistemas de efluxo e resistência bacteriana

A resistência aos antimicrobianos pode ser atribuída a um aumento da expressão de bombas de efluxo. Uma permanente falha na regulação da expressão desses sistemas de efluxo pode ocorrer por diferentes mecanismos como: i) mutação no gene regulador proximal; ii) mutação em genes do mecanismo global de regulação da expressão gênica; iii) mutação na região promotora dos genes que codificam bombas de efluxo e iv) inserção de seqüências de

DNA na região adjacente aos genes que codificam os sistemas de efluxo levando ao aumento da sua expressão (44). A resistência de cepas mutantes em que se observa um aumento da CIM de três ou mais antimicrobianos quando comparada a CIM da cepa de origem pode sugerir expressão aumentada ou hiperexpressão de sistemas de efluxo. As CIMs dos agentes antimicrobianos observada em mutantes clínicos que hiperexpressam sistemas de efluxo são, geralmente, duas a oito vezes maiores que aquelas observadas entre as cepas sensíveis. Um aumento de até 100 vezes na CIM pode ser observado em cepas que hiperexpressam os sistemas de efluxo e que possuem outros mecanismos de resistência associados, como a produção de enzimas que inativam os agentes antimicrobianos ou alteração no sítio de ação dos antimicrobianos, o que ressalta a importância dos sistemas de efluxo de droga e da sua associação com outros mecanismos de resistência bacteriana. Todavia, há exemplos de que a CIM de antimicrobianos pode ultrapassar os pontos de corte para resistência como resultado somente da expressão de sistemas de efluxo. Esse fenômeno é frequentemente observado na resistência as fluoroquinolonas. Os substratos que são ejetados por sistemas de efluxo como resultado de sua hiperexpressão em bactérias incluem uma ampla variedade de moléculas estruturalmente distintas. Porém, os substratos de cada sistema variam de acordo com o tipo de bomba. Estudos adicionais têm sido conduzidos com o intuito de se conhecer melhor a regulação da sua expressão gênica, a interação de seus componentes e as suas funções fisiológicas das bombas de efluxo.

2.5 Família RND

Estes sistemas, também chamados de bombas, são compostos por três elementos: o transportador citoplasmático dependente de energia localizado na membrana citoplasmática, uma proteína que facilita a passagem do substrato pela membrana externa e a proteína de fusão com a membrana localizada no espaço periplasmático e que une os outros dois

componentes (24) (Fig. 1). Esse sistema de efluxo é um trímero e funciona de forma rotativa. Cada um desses três elementos é essencial para o funcionamento do sistema de efluxo, e a ausência de uma das proteínas torna a bomba não funcional.

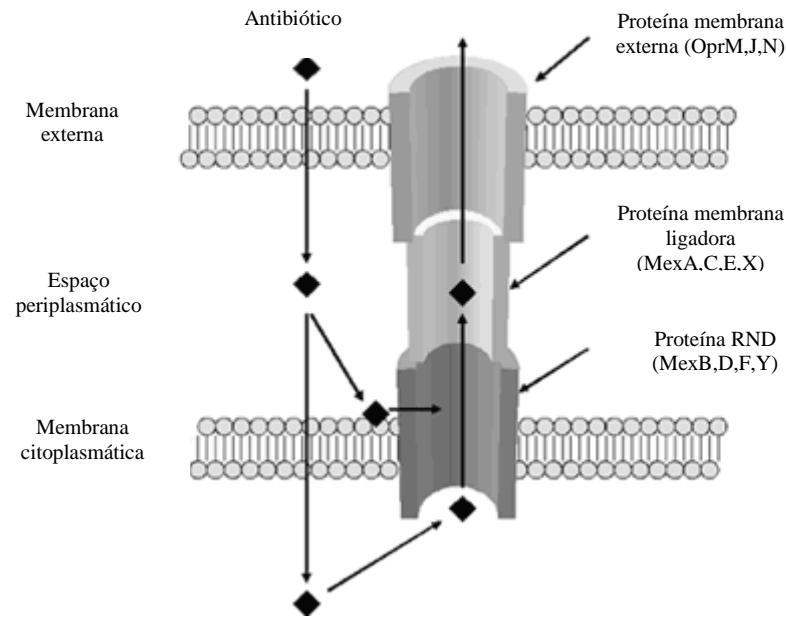


Figura 1. Estrutura e função de Sistema de efluxo da família RND. (64)

O sistema de efluxo da família RND possui especificidade para diversos substratos, os quais englobam antimicrobianos de relevância clínica e desempenha um importante papel na resistência intrínseca e adquirida em diversas bactérias Gram-negativas (24). Embora a bomba do tipo RND crie uma passagem do meio citoplasmático para o meio extracelular para a remoção de substratos, a arquitetura da bomba também permite a retirada de compostos do espaço periplasmático, sítio de ação dos β -lactâmicos. Apesar das bombas de efluxo RND, caracterizadas em *P. aeruginosa*, possuírem organização estrutural comum, elas são muito diferentes umas das outras em muitos aspectos, incluindo os antimicrobianos que são substratos para as bombas de efluxo bem como a regulação do operon (65) (Tabela 1).

Tabela 1. Sistemas de efluxo RND envolvidos na resistência a antimicrobianos em diferentes patógenos.

Microorganismo	Sistema de efluxo	Regulador	Substratos (antimicrobianos)^a
<i>A.baumannii</i>	AdeABC	AdeT, AdeRS	AG, BL, CM, EM, TC, FQ
<i>A.baumannii</i>	AdeFGH	adeL	FQ, TC, TI, CM, CL, TM, SM
<i>A.baumannii</i>	AdeIJK		BL, CM, EM, FQ, FU, NB, RF, TC, TM
<i>B.cenocepacia</i>	CeoAb-OpcM	CeoR	CM, FQ, TM
<i>B.pseudomallei</i>	AmrAB-OprA	AmrR	AG, ML
<i>E. aerogenes</i>	AcrAB-TolC	AcrR	CM, FQ, NB, TC
<i>E. aerogenes</i>	EefABC		CM, CI, EM, TC
<i>E. cloacae</i>	AcrAB-TolC		BL, AG, CM, FQ, EM, TC, TI
<i>E. coli</i>	AcrAB-TolC	AcrR, MarA, RobA, SoxS, MarR, SdiA	BL, NB, EM, CM, TC, FQ
<i>E. coli</i>	AcrAD-TolC		AG, FU, NB
<i>E. coli</i>	AcrEF-TolC	AcrS	BL, NB, EM, CM, TC, FQ
<i>E. coli</i>	MdtABC-TolC	BaeSR	NB
<i>E. coli</i>	YhiUV-TolC	EvaAS	NB
<i>K. pneumoniae</i>	AcrAB	AcrR	FQ
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM	mexR, ArmR, PA3574	AG, BL, CM, ML, NB, TC, TM
<i>P. aeruginosa</i>	MexCD-OprJ	NfxB	CM, CP, FQ, TC
<i>P. aeruginosa</i>	MexEF-oprN	MexT	CM, FQ
<i>P. aeruginosa</i>	MexXY	MexZ	AG, FQ, ML, TC, TI
<i>P. aeruginosa</i>	MexJk-OprM	MexL	AG, CI, EM, TC
<i>P. aeruginosa</i>	MexVW-OprM		CM, RM, FQ, TC
<i>P. mirabilis</i>	AcrAB-TolC		AP, CI, CM, TC, TI, TM

^aAG, aminoglicosídeos; AP, ampicilina; BL, β -lactâmicos; CI, ciprofloxacino; CM, cloranfenicol; CL, clindamicina; CP, cefalosporinas; CT, cefotaxime; EM, eritromicina; FQ, fluoroquinolonas; FU, ácido fusídico; ML, macrolídeos; NB, novobiocina; SM, sulfametoxazol; TC, tetraciclina; TM, trimetropim. Adaptado de Fernandez *et al* 2011 (27).

2.6. Sistemas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*

A família RND apresenta o maior número de bombas descritas no cromossomo de *P. aeruginosa*. No total, 12 sistemas de efluxo da família RND denominados Mex (“multidrug efflux pump”), de expressão constitutiva, foram descritos. Desses sistemas foram caracterizados até o momento: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK-OprM, MexGHI-OpmD, MexVW-OprM, MexPQ-OpmE, MexMNOprM e TriABC-OpmH (66). De todos os sistemas de efluxo da família RND caracterizados em *P. aeruginosa*, somente MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM tem sido relacionados, até o momento, com resistência a uma variedade de antimicrobianos de importância clínica (5, 24).

Os genes codificadores desse sistema de efluxo se organizam em operons (Fig 2.) no cromossomo de *P. aeruginosa*. Cada um dos sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY possui um gene que codifica para a proteína de fusão com a membrana – MFP - (mexA, mexC e mexX) além do gene que codifica o transportador RND (mexB, mexD e mexY). Os sistemas MexAB-OprM e MexCD-OprJ possuem ainda um gene que codifica a porina (OMF) (oprM e oprJ), cujo produto completa a formação do sistema de efluxo tripártide. Genes regulatórios mexR, nfxB e mexZ encontram-se a montante aos operons MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY, respectivamente (5).

O sistema MexAB-OprM foi o primeiro caracterizado em *P. aeruginosa*. Essa bomba de efluxo é expressa de forma constitutiva e contribui para a resistência intrínseca desse microrganismo a diversos antimicrobianos entre os quais: fluoroquinolonas, tetraciclina, macrolídeos, novobiocina, cloranfenicol e β -lactâmicos (aztreonam, ceftazidima e meropenem), além de substâncias como detergentes, solventes orgânicos e corantes (43, 57, 66-68). Imipenem, devido às características hidrofóbicas da sua cadeia lateral, não é substrato para este sistema de efluxo. A expressão do sistema MexAB-OprM é regulada pela proteína MexR, a qual é codificada pelo gene *mexR*, que está localizado a montante à *mexA-mexB* e essa proteína atua como repressor da expressão do sistema MexAB-OprM (69). A perda da regulação mediada por MexR ocasiona a hiperexpressão em cepas mutantes de *P. aeruginosa* do tipo *nalB* e *nalC* (70).

O sistema MexCD-OprJ, em comparação com o sistema MexAB-OprM tem um perfil mais restrito de substratos. MexCD-OprJ é capaz de limitar a quantidade intracelular de fluoroquinolonas, cloranfenicol, macrolídeos e β -lactâmicos, como por exemplo, meropenem (mas não ceftazidima, aztreonam e imipenem). Contudo, preferencialmente extrai das células cefalosporinas de 4ª geração (cefepime). A expressão constitutiva de MexCD-OprJ pode ser detectada em cepas selvagens de *P. aeruginosa*, porém estudos que realizaram a deleção de *mexCD-orpJ* demonstraram que não houve impacto na sensibilidade de cepas selvagens. O sistema MexEF-oprN reconhece como substrato fluoroquinolonas, trimetropim e cloranfenicol, porém essa bomba de efluxo não possui afinidade para os antibióticos β -lactâmicos (5).

O sistema de efluxo MexXY é expresso de forma constitutiva, porém é induzido por tetraciclina e aminoglicosídeos. MexXY pode contribuir para resistência a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e alguns antibióticos β -lactâmicos (piperacilina, cefepime e meropenem),

não sendo substratos desde sistema de efluxo a ceftazidima e o imipenem (71). Cepas com deleção do gene *mexXY* são mais suscetíveis aos aminoglicosídeos, tetraciclina e eritromicina, indicando que esse sistema de efluxo contribui para a resistência intrínseca de *P. aeruginosa* a esses agentes. O gene *mexZ*, localizado a montante *mexXY*, codifica um repressor da expressão do sistema MexXY. A deleção desse gene regulador aumenta a transcrição de MexXY, contudo cepas Δ *mexZ* não são resistentes aos aminoglicosídeos, isso se deve ao fato que a OprM, necessária para formar o complexo, não é hiperexpressa (5).

Em *P. aeruginosa* três sistemas de efluxo com importante papel na resistência aos carbapenêmicos foram descritos: MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY (71, 72). Numerosos estudos têm observado a hiperexpressão dos sistemas de efluxo do tipo RND em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos β -lactâmicos, sugerindo a participação dos sistemas de efluxo no fenótipo resistente. Recente trabalho realizado com isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes provenientes de hospitais na Tailândia revelou que 92,06% de isolados clínicos de *P. aeruginosa* hiperexpressavam o sistema MexAB-OprM e 63,49% hiperexpressavam o sistema MexXY (74). No Brasil, um estudo avaliou a hiperexpressão em isolados clínicos de *P. aeruginosa* de hemoculturas e observou a hiperexpressão de MexAB-OprM e MexXY em 27,1% e 50,8% dos isolados, respectivamente (7).

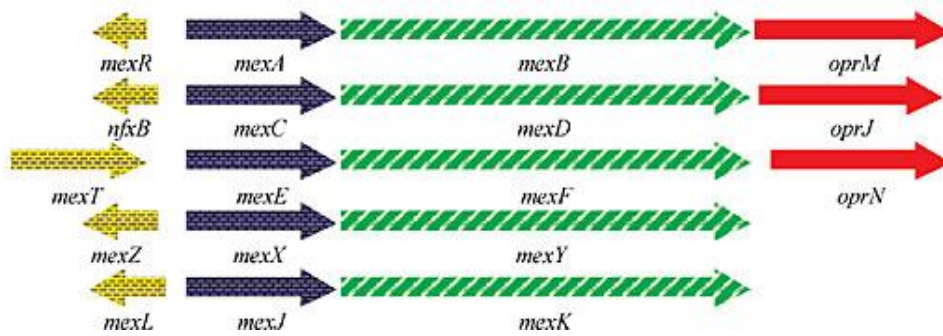


Figura 2: Organização genética dos operons *mexR-mexAB-oprM*, *mexTmexEF-oprN*, *nfxB-mexCD-oprJ*, *mexZ-mexXY* e *mexL-mexJK* de *P. aeruginosa*. (75).

2.7. Métodos para avaliar Expressão de Bombas de Efluxo

2.7.1 – Técnica de qRT-PCR

Os estudos sobre a função gênica podem ser executados por meio de técnicas simples, como “Northern blot”, ou altamente sofisticadas, como bibliotecas genômicas, bibliotecas de cDNA, microarranjos de DNA e pela análise da transcrição reversa em tempo real por PCR (qRT-PCR), dentre outras. Dentre as técnicas citadas acima, o uso da análise da transcrição reversa em tempo real por PCR (qRT-PCR) é uma metodologia que vem ganhando espaço nos diferentes tipos de diagnósticos da expressão gênica pelo fato de apresentar resultados quantitativos, não apenas qualitativos, como na maioria das demais técnicas descritas..

A qRT-PCR permite a quantificação da expressão gênica de modo exato e reprodutível baseado na emissão de fluorescência. Dentre os compostos fluorescentes mais utilizados destacam-se o sistema “SYBR® Green” e o “TaqMan®” . O sistema “SYBR® Green” tem como vantagem frente ao sistema “TaqMan®” o menor custo e a facilidade na manipulação. No entanto, por ser um corante intercalante de DNA apresenta menor especificidade, podendo proporcionar resultados incorretos. Contudo, com uma análise cuidadosa dos resultados é

possível detectar caso ocorra anelamento inespecífico com o uso do sistema “SYBR® Green”. O sistema “TaqMan®” possui, além do par de oligonucleotídeos iniciadores, mais uma sequência de nucleotídeos, chamada de sonda. Desse modo, uma molécula de DNA somente será contabilizada se os oligonucleotídeos e sonda se ligarem a ela tornando esse sistema muito mais específico.

Devido a sua alta especificidade e sensibilidade qRT-PCR permite realizar uma quantificação absoluta onde é determinado o número exato de moléculas, ou então, uma quantificação relativa, onde a expressão gênica pode ser comparada entres genes. A quantificação absoluta possibilita uma fácil interpretação dos resultados, porém oferece maior dificuldade em se desenvolver os padrões experimentais, enquanto que a quantificação relativa proporciona baixa dificuldade em se desenvolver os padrões experimentais, porém exige análise criteriosa dos dados obtidos.

Para obter resultados confiáveis com o uso de qRT-PCR é necessário a obtenção de RNA de interesse, síntese de cDNA, um conjunto de oligonucleotídeos com alta qualidade e especificidade, uma reação de PCR com alta eficiência e, principalmente, a escolha de apropriados genes de referência para a normalização dos dados. Os genes de referência devem ser genes que manifestam o mesmo padrão de expressão entre diferentes tecidos ou células.

Para o cálculo da expressão gênica por qRT-PCR os valores do Ct (ciclo threshold; número do ciclo no qual a fluorescência passa pelo crescimento exponencial) são normalizados com o corante de referência passiva ROX, que compensa pequenas variações do sinal, resultando em melhor precisão. Para a quantificação relativa da expressão gênica o método CT Comparativo ($\Delta\Delta\text{CT}$) é o mais utilizado. Esse método de $\Delta\Delta\text{CT}$ fundamenta-se na fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, em que o $\Delta\Delta\text{CT} = \text{média do } \Delta\text{CT (amostras)} - \text{média do } \Delta\text{CT (amostra de referência)}$. O ΔCT é a diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene

endógeno. Para cada amostra deve ser realizada uma quantificação relativa (QR) em comparação à amostra controle calibradora.

2.7.2 – Inibidores da Bomba de Efluxo

Fenotipicamente é possível avaliar a presença da hiperexpressão de bombas de efluxo através da utilização de agentes inibidores da bomba de efluxo. Os inibidores diferem no mecanismo pelo qual atuam inibindo a funcionalidade da bomba de efluxo. Além disso, as diferentes substâncias inibidoras diferem também na especificidade sobre determinado sistema de efluxo. Dentre as substâncias mais utilizadas estão a carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP) e phenyl-arginine-b-naphthylamide (PaβN).

O mecanismo pelo qual CCCP inibe as bombas de efluxo é pela interrupção do gradiente de prótons na membrana o que acarreta na diminuição da energia disponível para o transporte das substâncias. Dessa maneira os antibióticos não podem ser expulsos. Contudo esse mecanismo não é específico e mais de uma classe de sistemas de efluxo pode ser afetada. Já a substância PaβN inibe a bomba através da competição com o antibiótico pelo sítio de ligação com a bomba. Com isso, essa substância é um inibidor específico e possui afinidade pelo sistema RND em *P. aeruginosa* (46).

A determinação fenotípica da expressão dos sistemas de efluxo deve ser realizada através da comparação das CIMs dos antibióticos na presença e na ausência do inibidor da bomba. Amostras positivas para a expressão das bombas de efluxo irão apresentar uma diminuição da CIM na presença das substâncias inibidoras.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de sistemas de efluxo Mex-mediado em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e comparar com o perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos e/ou aminoglicosídeos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima dos antibióticos aminoglicosídeos (amicacina, tobramicina, gentamicina) e carbapenêmicos (imipenem, meropenem) pela técnica de microdiluição em caldo em isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- Identificar a presença dos genes que codificam para as carbapenemases: SPM, IMP, VIM, SIM, GIM, OXA-48, KPC, GES e NDM;
- Avaliar a expressão dos sistemas de efluxo Mex-mediado em *P. aeruginosa* com a utilização do inibidor de bomba de efluxo Pa β N;
- Investigar a transcrição dos genes *mexB*, *mexY* em isolados clínicos de *P. aeruginosa* com perfis de resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* – PCR) em tempo real.
- Investigar a influência da hiperexpressão das bombas de efluxo MexAB e MexXY nas CIM de meropenem em *P. aeruginosa* produtoras e não produtoras de carbapenemases.

4. Referências

1. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):354-60.
2. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro AL, Martino MD, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis.* 2013;17(6):672-81.
3. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011;52(9):1138-43.
4. Li XZ, Barre N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(6):885-93.
5. Wolter DJ, Lister PD. Mechanisms of beta-lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Pharm Des.* 2013;19(2):209-22.
6. Nikaido H, Pages JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):340-63.
7. Xavier DE, Picao RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol.* 2010;10:217.
8. Fehlberg LC, Xavier DE, Peraro PP, Marra AR, Edmond MB, Gales AC. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections:

19. Lutz L, de-Paris F, Vieira MI, Marques EA, Barth AL. Bacteriologia da Fibrose Cística. *Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. 2011.
20. Rudkjobing VB, Thomsen TR, Alhede M, Kragh KN, Nielsen PH, Johansen UR, et al. The microorganisms in chronically infected end-stage and non-end-stage cystic fibrosis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):236-44.
21. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(12):841-51.
22. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol*. 2010;5(11):1663-74.
23. Tavares, W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. 3 ed. São Paulo: Ateneu; 2001.
24. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;(22):582-610.
25. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011;19(8):419-26.
26. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*. 2011;2:65.
27. Fernandez L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):661-81.
28. Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques EA. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist*. 2006;12(2):103-8.

29. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother.* 2003;(52):140-1.
30. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.
31. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.*2001;(32):1085-9.
32. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.*2011;(11):381-93.
33. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 2005;352(4):380-91.
34. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):306-25.
35. Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T. Detection of SPM and IMP metallo-beta-lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(5):478-81.
36. Furtado GH, Gales AC, Perdiz LB, Santos AF, Medeiros EA. Prevalence and clinical outcomes of episodes of ventilator-associated pneumonia caused by SPM-1-producing and non-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(5):604-6.
37. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics.* 2010;65(9):825-9.

38. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection*. 2007;35(6):457-60.
39. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Goncalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2005;(56):1148-51.
40. Paixao VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, Reis JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(4):406-9.
41. Juan Nicolau C, Oliver A. [Carbapenemases in *Pseudomonas* spp]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Suppl 1:19-28.
42. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, Konig C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2008;7(2):123-7.
43. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004;(64): 159-204.
44. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40.
45. Vila J, Marco F. [Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20(6):304-10.
46. Lister PD. Chromosomally-encoded resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*: therapeutic implications. *Am J Pharmacogenomics*. 2002;2(4):235-43.
47. Fuste E, Lopez-Jimenez L, Segura C, Gainza E, Vinuesa T, Vinas M. Carbapenem-resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2013;62(9):1317-25.

48. Moya B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan-beta-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4771-8.
49. Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40(2):168-72.
50. Yoshihara E, Gotoh N, Nishino T, Nakae T. Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity. *FEBS Lett.* 1996;394(2):179-82.
51. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 1991;266(2):770-9.
52. Lubelski J, Konings WN, Driessen AJ. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(3):463-76.
53. Doleans-Jordheim A, Michalet S, Bergeron E, Boisset S, Souard F, Dumontet C, et al. Efflux pumps: their role in *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance. *Ann Biol Clin.* 2008;66(5):499-508.
54. Cattoir V. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol (Paris).* 2004;52(10):607-16.
55. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):629-36.
56. Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun.* 2008;76(8):3595-605.

57. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* 2007;(32):162-76.
58. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3(2):255-64.
59. Kosmidis C, Schindler BD, Jacinto PL, Patel D, Bains K, Seo SM, et al. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40(3):204-9.
60. Steinfels E, Orelle C, Fantino JR, Dalmas O, Rigaud JL, Denizot F, et al. Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* 2004;43(23):7491-502.
61. Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(3):205-10.
62. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(4):457-70.
63. Blair JM, Piddock LJ. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12(5):512-9.
64. Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy.* 2003;23(7):916-24.
65. Murata T, Kuwagaki M, Shin T, Gotoh N, Nishino T. The substrate specificity of tripartite efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* is determined by the RND component. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(2):247-51.

66. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959-64.
67. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(1):65-71.
68. Srikumar R, Li XZ, Poole K. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1997;179(24):7875-81.
69. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1486-513.
70. Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol*. 2002;184(15):4308-12.
71. Poole K, Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(1):59-71.
72. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2696-9.
73. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;(50):1633-41.
74. Khuntayaporn P, Montakantikul P, Santanirand P, Kiratisin P, Chomnawang MT. Molecular investigation of carbapenem resistance among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated clinically in Thailand. *Microbiol Immunol*. 2013;57(3):170-8.

75. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003;2(1):48-62.

5. Artigo

Artigo a ser submetido para *Journal of Medical Microbiology*.

Article title: Inhibition of Mex-efflux pumps reduces the meropenem MIC to the susceptibility level in non-carbapenemase producing *P. aeruginosa*

Running title: Multidrug efflux pumps expression

Keywords: meropenem, carbapenemase, MexAB e MexXY

Dariane Castro Pereira¹, Leandro Reus Rodrigues Perez¹, Larissa Lutz^{1,2}, Afonso Luis Barth^{1,3*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Unidade de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

³Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

*Correspondence Author:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS, Brazil, Zip Code: 90.035-003

Phone: (+51) 3359 8607 FAX: (+51) 3359 8310

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Bacterial efflux pump systems may lead to therapeutic failure since many antimicrobial agents are substrate for them. The aim of the study was to evaluate the expression of the MexAB, MexXY pump efflux and to determine its influence on meropenem MIC in carbapenemase producing and non-producing *P. aeruginosa*. A total of 86 non-repetitive clinical isolates of *P. aeruginosa* with reduced susceptibility to carbapenems were evaluated. Overexpression of MexAB and MexXY efflux systems were evaluated phenotypically using the PA β N selective inhibitor. Metallo- β -lactamases (MBL) were detected by PCR using specific primers. The efflux pump-overexpressed phenotype was observed in 34 (47.8%) MBL-non-producing and in 14 (93.3%) MBL-producing- isolates. Our results demonstrate that in the presence of efflux pump inhibitor, the isolates producing or not MBL genes, the meropenem MICs were reduced to values ≤ 8 mg/L. However, in MBL non-producing isolates, meropenem MIC values were reduced to the susceptibility level. Therapeutic approaches using inhibitors of efflux pump can be useful as an auxiliary tool to reduce the meropenem MIC at susceptible level in non-carbapenemase producing *P. aeruginosa*.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that exhibits intrinsic and acquired mechanisms of resistance for a great variety of antimicrobial agents. Bacterial multidrug efflux systems may lead to therapeutic failure since many clinically relevant antimicrobials are substrate for efflux pumps (Nikaido, 2009).

Efflux pumps have been categorized into five super-families, based upon the source of energy that is required. Four of these efflux pump systems belonging to the Resistance-Nodulation Division (RND) family, have been better described in *P. aeruginosa*: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY, being MexAB-OprM and MexXY constitutively expressed in wild-type *P. aeruginosa* isolates (Lister *et al.*, Wolter e Hanson, 2009; Strateva & Yordanov, 2009). Betalactamic agents (except imipenem), fluoroquinolones, tetracyclines, macrolides, chloranphenicol, novobiocin, trimethoprim and sulfametoxazole are substrates for the MexAB-OprM system (Cattoir, 2004).

Carbapenemases are enzymes with wide spectrum of activity, including on carbapenems. In *P. aeruginosa*, metallo- β -lactamase production is the main mechanism for carbapenem resistance. (Poole, 2011). (Bush e Jacoby, 2010). Metallo- β -lactamases in *P. aeruginosa* have emerged worldwide and bla_{SPM-1} and bla_{IMP-1} genes were described as more common among Brazilian isolates (Zavascki *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2010).

The aim of the study was to evaluate the expression of the MexAB, MexXY pump efflux and to determine its influence on meropenem MIC in MBL producing and non-producing *P. aeruginosa*.

Materials and Methods

Bacterial isolates, susceptibility testing and detection of β -lactamase genes

A total of 86 non-repetitive *P. aeruginosa* clinical isolates were collected between July 2011 and April 2012 from patients hospitalized at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary teaching hospital located in Porto Alegre, Brazil. This study included isolates from cystic fibrosis (n=34, 39.5%) and non-cystic fibrosis patients (n=52, 60.5%) and only one isolate per patient was included in the study. The isolates were selected according their reduced susceptibility to carbapenems (resistant or intermediate to imipenem or meropenem) and aminoglycoside (resistant or intermediate to amikacin, gentamicin or tobramycin) according to CLSI (2013).

Isolates were identified according to the conventional tests (Murray PR, 2007) or using API 20NE System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Antimicrobial susceptibility profile for amikacin, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, meropenem, ticarcilin and tobramycin (Oxoid®, Basingstoke, UK) was established using the disk diffusion method (CLSI, 2013). Minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by broth microdilution assay for ceftazidime, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin and tobramycin and interpreted according to the CLSI (2013). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control strains.

The presence of carbapenemase genes was investigated by real-time PCR using the StepOne™ equipment (Applied Biosystems®, Foster City, USA). The consensus primers used were specific for KPC, GES, OXA-48, NDM-1, SPM-1, GIM, VIM and IMP types according to the protocol previously described (Mendes *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2012).

Efflux pumps overexpression

Phenotypic assay

The activity of the MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps was determined by broth microdilution using meropenem and gentamicin as substrates with and without the efflux pump inhibitor Phe-Arg-naphthylamide (PaβN) at 50 mg/L as previously described (Mesaros *et al.*, 2007). The antimicrobial agents were tested in two-fold dilution at concentrations ranging from 0.5mg/L to 256mg/L for each clinical *P. aeruginosa* isolate.

An efflux pump- overexpressed phenotype was defined as a decrease of at least $\geq 2\log_2$ in the MIC value in the presence of the PaβN, in relation to the MIC established in the absence of the inhibitor (Mesaros *et al.*, 2007). Isolates were evaluated in quadruplicate and results were read visually after overnight incubation at 35°C.

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR).

Transcriptional levels of *mexB* and *mexY* were determined by qRT-PCR (StepOne™, Applied Biosystems®, Foster City, USA) with specific primers as reported previously (Dumas *et al.*, 2006; Quale *et al.*, 2006). Briefly, total RNA was extracted using TRIzol® Reagent (Life technologies, USA), following manufacturer recommendations, and residual DNA was eliminated by DNase treatment using RQ1 RNase-free DNase (Promega). For synthesis of cDNA, 1µg of RNA was used for reverse transcriptase reaction (ImProm II reverse transcriptase, Promega). Quantification of *mexB* and *mexY* transcripts was performed using SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems®, Foster City, USA) and the assay was done in triplicate. The gene *rpsL* was chosen as housekeeping reference

gene to normalize the transcriptional levels of target genes. The results are presented as ratios of gene expression between the target gene (*mexB* and *mexY*) and the reference gene.

Isolates were considered positive for *mexY* overexpression when the corresponding mRNA level was at least 10-fold higher than PAO1 levels; results were considered negative with mRNA levels less than 5-fold in relation to PAO1 levels. Results between 5- fold and 10-fold mRNA levels were interpreted as borderline. Isolates were considered positive for *mexB* overexpression when the corresponding mRNA level was at least 3-fold higher than PAO1 levels; results were considered negative with mRNA levels less than 2-fold in relation to PAO1 levels. Results between 2- fold and 3-fold mRNA levels were interpreted as borderline (Cabot *et al.*, 2011).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using 2×2 table contingency , and P values were calculated using χ^2 or Fisher's exact test.

Results

Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility and β -lactamase genes

A total of 86 non-repetitive *P. aeruginosa* isolates were collected from sputum (n=58); urine (n=11); endotracheal aspirate (n=6) and others clinical samples (n= 11). Tobramycin proved to be the agent with higher rate of sensitivity (84.9%) followed by ciprofloxacin (50.6%), cefepime (50%) and amikacin (47.7%).

Of the 86 *P. aeruginosa* isolates evaluated, 15 (17.4%) were MBL producers: 10 (66.6%) were positive for *bla*_{SPM-1} and 5 (33.3%) were positive for *bla*_{IMP}. Among MBL producers, 6 isolates (40%) were recovered from cystic fibrosis patients.

Efflux pumps

Phenotypic analysis

Eight-six isolates were evaluated for expression of MexAB-OprM multidrug efflux systems and 74 isolates for MexXY. The efflux pump-overexpressed phenotype was observed in 59 (68.7%) isolates. All isolates harboring *bla*_{SPM-1} gene (n=10) showed pump-overexpression while 4 out of 5 isolates (80%) harboring *bla*_{IMP-1} gene showed this profile. Most (93.3%) MBL positive isolates presented MexAB-efflux pump overexpression in contrast to MBL negative isolates (47.8%) ($p=0.0002$).

Isolates with efflux pump-overexpressed phenotype displayed higher MIC values for meropenem (33.8%; MIC ≥ 32 mg/L), while none isolate without efflux pump overexpression presented a MIC value of ≥ 32 mg/L. Moreover, MICs values for meropenem were higher for MBL-producers (≥ 256 mg/L) in comparison with isolates non-MBL-producing (MICs ≤ 64 mg/L), despite the resistance rates to be similar in both groups (100% and 92.7%, respectively).

In the presence of the Pa β N, all *P. aeruginosa* MBL-producing isolates, except one *bla*_{IMP}, decreased meropenem MIC at least 16-fold. However, this reduction was observed only into the range of the “non-susceptible” profile. On the other hand, among non-producers of MBL, decrease in the meropenem MICs led to the susceptibility profile in the presence of the efflux pump inhibitor (Figure 1).

Expression analysis of *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump genes

Eight isolates non-MBL producers were selected. MexAB-OprM and MexXY up regulated efflux systems was assessed by determining the transcription levels of *mexB* and *mexY* using the quantitative real-time reverse transcription PCR methodology.

When determining the expression level of efflux pump genes overexpressed *mexB* gene isolate appear to be expressed 63.2- to 1566-fold more than PAO1 isolate in those isolates with efflux pump-overexpressed phenotype. On the other hand, *mexY* overexpression was detected in 2 isolates of *P. aeruginosa* isolates ranging from 712 to 2420-fold compared with PAO1 isolate (Table 1). Two unlike *P. aeruginosa* isolates showed borderline *mexB* (2.3-fold compared with PAO1 isolate) and *mexY* (5.9-fold compared with PAO1 isolate) overexpression. *Pseudomonas aeruginosa* isolates positives for *mexB* overexpression by qRT-PCR showed, phenotypically, a decrease in MIC values for meropenem achieving sensitivity levels. These results by qRT-PCR support the results obtained by phenotypic assay and demonstrate that MexAB-OprM overexpression was present in these isolates evaluated.

Discussion

Efflux pumps play an important role in multidrug resistant microorganisms (Nikaido, 2009). The application of PaβN has been reported as a potent inhibitor of the resistance–nodulation–cell division (RND) efflux systems and it is particularly active on MexAB–OprM (Lomovskaya & Bostian, 2006; Pages & Amaral, 2009). Additionally, in many species of bacteria, such as *P. aeruginosa* and Enterobacteriaceae, the presence of carbapenemases has emerged as an important mechanism of resistance and with considerable capacity to

disseminate. This study investigated the presence of MBL genes and efflux pump overexpression as mechanisms responsible for meropenem resistance and their influence on meropenem MICs using an inhibitor agent for the Mex-efflux pump.

Among metallo- β -lactamase genes investigated, *bla*_{SPM-1} was the most prevalent type detected in the isolates. Similarly to others studies, our results showed that the prevalence of *P. aeruginosa* harboring MBL is low among carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients (Perez *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013). The Mex-efflux pump overexpression was noted in 59 of the 86 (68.7%) isolates evaluated. In a study performed by Riera *et al.*, (2011) with *P. aeruginosa* isolates recovered from blood, MexAB-OprM expression rate was 32% among 175 non-susceptible-carbapenem isolates from 16 hospitals in Spain. Cabot *et al.*, (2011) detected overexpression in 25% of 29 meropenem resistant *P. aeruginosa* isolates. In Brazil, a study with 59 non-susceptible-carbapenem *P. aeruginosa* the overexpression of Mex-efflux pump was observed in 59.3% of the isolates evaluated (Xavier *et al.*, 2010).

It is of note that, in this study, the inhibition of efflux systems in meropenem-resistant *P. aeruginosa* lead to prominent reduction in the MIC values, independently of the presence of MBL enzymes. Interestingly, the inhibition of efflux systems in non-MBL producers restored the susceptibility profile in all isolates positive for MexAB-OprM in the phenotypic assay. So, it is reasonable to speculate that the efflux pump inhibitor may increase the activity of meropenem in *P. aeruginosa* isolates with reduced susceptibility (isolates presenting MIC in the intermediate range). Nevertheless, studies have shown that efflux pump inhibitors can restore the activity of antibiotics (Hiraiwa *et al.*, 2009; Zhang e Ma, 2010; Mahamoud *et al.*, 2011). Mahamoud *et al.* (2011) demonstrated the restoration of the activities for chloramphenicol and nalidix acid in resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*

aerogenes and *P. aeruginosa* in the presence of efflux pump inhibitor. In study conducted with *P. aeruginosa* presenting fluoroquinolone resistance, 37% of isolates were restored to the susceptibility profile when efflux pump inhibitor was used (Kriengkauykiat *et al.*, 2005). On the other hand, the concept of restoring and enhancing the utility of antimicrobials by using efflux pump inhibitor although attractive was not considered for use with therapeutic purposes yet, specially because the toxicity of these kind of compounds (Lomovskaya e Bostian, 2006). However, because there are potentially benefices of the inhibition of efflux pumps on improving the clinical performance of antibiotics, research laboratories have initiated programs to discover and develop efflux pump inhibitors (Lomovskaya *et al.*, 2001; Tegos *et al.*, 2002).

Isolates harboring efflux pump overexpression and MBL genes showed highest rate of resistance to meropenem (Figure 1). Studies have shown the overexpression of an RND efflux pump in multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates and illustrating the success of bacteria when distinct mechanisms are involved (Riera *et al.*, 2011; Fuste *et al.*, 2013; Rumbo *et al.*, 2013; Vatcheva-Dobrevska *et al.*, 2013). Overexpression of MexAB-OprM system (from 63.2 to 1566-fold higher when compared to *P. aeruginosa* PAO1 activity) was associated with resistance to meropenem in *P. aeruginosa* isolates non-MBL producers. Co-overexpression of two efflux pumps (MexAB-OprM and MexXY) was observed in this study, similarly as detected in other studies with meropenem-resistant *P. aeruginosa* isolates (Yoneda *et al.*, 2005; Hocquet *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2010; Lee e Ko, 2012; Picao *et al.*, 2012). Overlap of mechanisms (distinct or not) plays an important role in the multidrug-resistant profile among *P. aeruginosa* (Hocquet *et al.*, 2007; Fuste *et al.*, 2013). However, the contribution of MBL production play an important role in the carbapenem resistance when compared to isolates that have only efflux pump overexpressed as mandatory mechanism of carbapenem resistance. In our study, PA β N was able to restore the susceptibility for all non-MBL

producing, but did not have the same performance for MBL-producing isolates, suggesting that MBL production solely is able to keep the meropenem MIC at the resistance level.

In conclusion, *P. aeruginosa* non-MBL-producing showed resistance to meropenem due to overexpression of MexAB-OprM. Our findings demonstrate that in the presence of efflux pump inhibitor, the isolates harboring or not MBL genes, the meropenem MICs were reduced to values ≤ 8 mg/L. However, when the isolates did not harbor MBL genes, the meropenem MIC values were reduced to the susceptibility level. Therefore, one could speculate that therapeutic approaches using efflux pump inhibition may be useful to improve the treatment either with monotherapy (when meropenem MIC is reduced to susceptibility range) or by combined therapy (when the meropenem MIC is reduced but not to the range of susceptibility).

Acknowledgements and Funding

This work was supported by FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010).** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 969-976.
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Tubau, F., Macia, M.D., Rodriguez, C., Moya, B., Zamorano, L., Suarez, C., Pena, C., Martinez-Martinez, L., et al. (2011).** Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1906-1911.
- Cattoir, V. (2004).** Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol (Paris)* **52**, 607-616.
- CLSI (2013).** Clinical and Laboratory Standards Institute. In Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (Wayne, PA: CLSI).
- Dumas, J.L., van Delden, C., Perron, K., and Kohler, T. (2006).** Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* (Netherlands), 217-225.
- Franco, M.R., Caiaffa-Filho, H.H., Burattini, M.N., and Rossi, F. (2010).** Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)* **65**, 825-829.
- Fuste, E., Lopez-Jimenez, L., Segura, C., Gainza, E., Vinuesa, T., and Vinas, M. (2013).** Carbapenem-resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **62**, 1317-1325.
- Hiraiwa, Y., Morinaka, A., Fukushima, T., and Kudo, T. (2009).** Metallo-beta-lactamase inhibitory activity of phthalic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 5162-5165.
- Hocquet, D., Berthelot, P., Roussel-Delvallez, M., Favre, R., Jeannot, K., Bajolet, O., Marty, N., Grattard, F., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., et al. (2007).** *Pseudomonas*

aeruginosa may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3531-3536.

Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O., and Wong-Beringer, A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 565-570.

Lee, J.Y., and Ko, K.S. (2012). OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* **40**, 168-172.

Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 582-610.

Lomovskaya, O., and Bostian, K.A. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol* **71**, 910-918.

Lomovskaya, O., Warren, M.S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., et al. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 105-116.

Lutz, L., Leao, R.S., Ferreira, A.G., Pereira, D.C., Raupp, C., Pitt, T., Marques, E.A., and Barth, A.L. (2013). Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. *J Clin Microbiol* **51**, 927-930.

Mahamoud, A., Chevalier, J., Baitiche, M., Adam, E., and Pages, J.M. (2011). An alkylaminoquinazoline restores antibiotic activity in Gram-negative resistant isolates. *Microbiology* **157**, 566-571.

- Martins, A.F., Zavascki, A.P., Gaspareto, P.B., and Barth, A.L. (2007).** Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* **35**, 457-460.
- Mendes, R.E., Kiyota, K.A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S.S., Gales, A.C., Pignatari, A.C., and Tufik, S. (2007).** Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* **45**, 544-547.
- Mesaros, N., Glupczynski, Y., Avrain, L., Caceres, N.E., Tulkens, P.M., and Van Bambeke, F. (2007).** A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 378-386.
- Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C., Kubasek, C., and Silbert, S. (2012).** Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* **67**, 906-909.
- Murray PR, B.E., Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (2007).** Manual of clinical microbiology. In (Washington, D.C: ASM-press).
- Nikaido, H. (2009).** Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**, 119-146.
- Pages, J.M., and Amaral, L. (2009).** Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 826-833.
- Perez, L.R., Antunes, A.L., Freitas, A.L., and Barth, A.L. (2012).** When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo-beta-lactamase gene shows high ability to produce biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 711-714.
- Picao, R.C., Carrara-Marroni, F.E., Gales, A.C., Venancio, E.J., Xavier, D.E., Tognim, M.C., and Pelayo, J.S. (2012).** Metallo-beta-lactamase-production in meropenem-susceptible

Pseudomonas aeruginosa isolates: risk for silent spread. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 747-751.

Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* **2**, 65.

Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., and Landman, D. (2006). Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 1633-1641.

Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., Garcia-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., Canton, R., and Oliver, A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother*, 2022-2027.

Rumbo, C., Gato, E., Lopez, M., Ruiz de Alegria, C., Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Vila, J., Pachon, J., Cisneros, J.M., Rodriguez-Bano, J., et al. (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 5247-5257.

Strateva, T., and Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*, 1133-1148.

Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., and Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3133-3141.

Vatcheva-Dobrevska, R., Mulet, X., Ivanov, I., Zamorano, L., Dobрева, E., Velinov, T., Kantardjiev, T., and Oliver, A. (2013). Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist* **19**, 355-361.

Xavier, D.E., Picao, R.C., Girardello, R., Fehlberg, L.C., and Gales, A.C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase

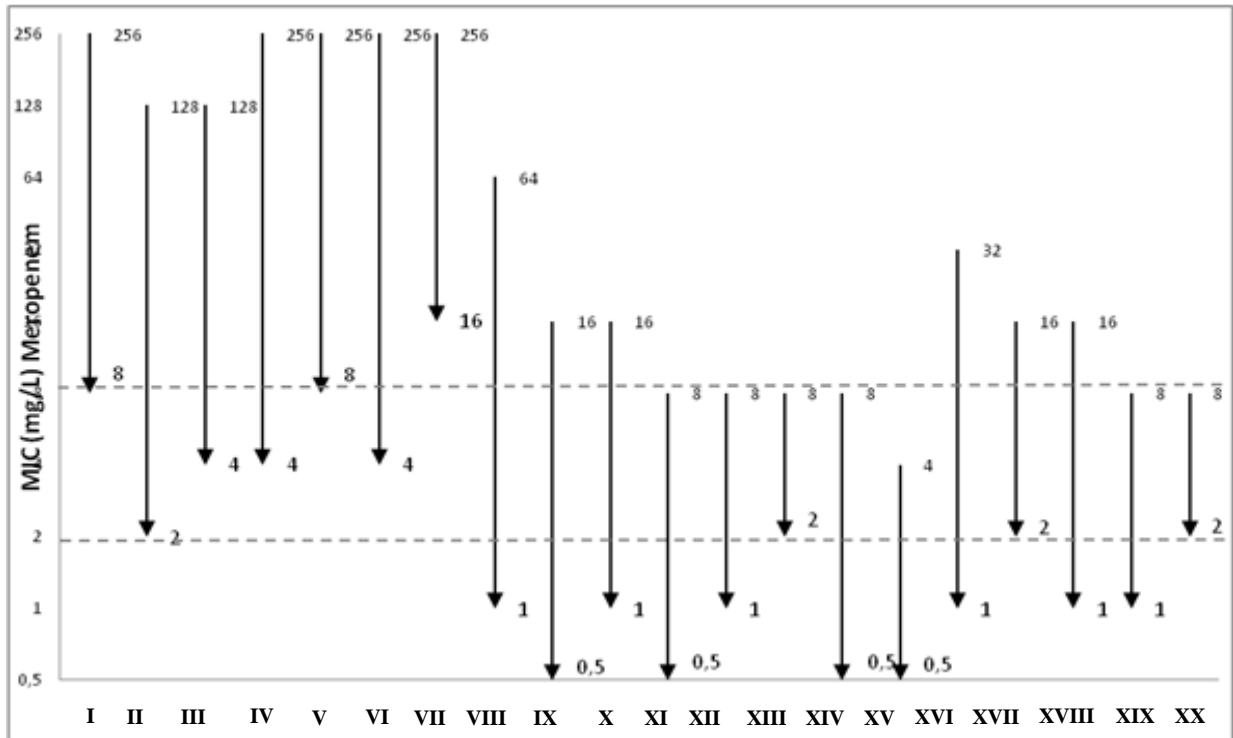
production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol* **10**, 217.

Yoneda, K., Chikumi, H., Murata, T., Gotoh, N., Yamamoto, H., Fujiwara, H., Nishino, T., and Shimizu, E. (2005). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*, 125-131.

Zavascki, A.P., Gaspareto, P.B., Martins, A.F., Goncalves, A.L., and Barth, A.L. (2005). Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 1148-1151.

Zhang, L., and Ma, S. (2010). Efflux pump inhibitors: a strategy to combat P-glycoprotein and the NorA multidrug resistance pump. *Chem Med Chem* **5**, 811-822.

Figure 1. Effect of efflux pump inhibitor on meropenem MICs among MBL producing and non-producing *Pseudomonas aeruginosa*



I – III: Isolates (n=4) harboring MexAB-XY pumps and *bla*_{IMP}; IV-V: Isolates (n=9) harboring MexAB-XY pumps and *bla*_{SPM-1}; VI: One isolate harboring MexAB pump and *bla*_{SPM-1}; VIII-XV: Isolates (n=22) harboring MexAB-XY pumps; XVI-XX: Isolates (n=18) harboring only MexAB pump.

Table 1. Relative expression levels of MexAB-OprM and MexXY in non-MBL producing *P. aeruginosa* as determined by qRT-PCR and correspondent antimicrobial susceptibility for antimicrobials agents. Values represent fold change in comparison with the transcription level in PAO1.

Isolate	Resistance profile					Relative Gene Expression		MIC Reduction in no of dilutions PaβN	
	AK	CN	TOB	IMI	MEM	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>
1	R	R	R	R	R	945.5	2420	6	6
2	S	R	S	R	S	0.76	1.12	1	1
3	R	R	S	S	R	63.2	5.9	3	3
4	R	R	S	R	I	2.93	1.89	1	1
5	R	R	I	R	R	1036	2.48	5	1
6	R	R	R	R	R	1566	712	6	6
7	I	I	I	R	I	0.67	1.79	0	1
8	R	R	S	R	R	0,48	1,51	1	1