

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

RESISTÊNCIA E TIPAGEM DE *Pseudomonas aeruginosa*
ISOLADA DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM PORTO ALEGRE

Ana Lúcia Peixoto de Freitas

Orientador: Prof. Dr Afonso Luís Barth

Tese de Doutorado.

Fevereiro de 2003.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

RESISTÊNCIA E TIPAGEM DE *Pseudomonas aeruginosa*
ISOLADA DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM PORTO ALEGRE

Ana Lúcia Peixoto de Freitas

Orientador: Prof. Dr Afonso Luís Barth

Tese de Doutorado.

Fevereiro de 2003.

Ana Lúcia Peixoto de Freitas

Resistência e tipagem de *Pseudomonas aeruginosa*
isolada de pacientes hospitalizados em Porto Alegre / Ana Lúcia
Peixoto de Freitas. Porto Alegre, 2003.

Tese (Doutorado – Ciência Médicas) Faculdade de
Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1. *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Resistência bacteriana.
3. Tipagem bacteriana.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Afonso Luís Barth, que, além da orientação segura, propiciou o crescimento profissional através da parceria neste e em outros trabalhos. Ao colega e amigo, pelo apoio em todos os momentos.

Às colegas da Unidade de Pesquisa Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Larissa, Kátia e Jaqueline, pela amizade e auxílio técnico.

Aos colegas dos laboratórios do Hospital de Clínicas, Hospital São Lucas e Santa Casa pela presteza na coleta das amostras.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia e do Instituto de Cardiologia pelo incentivo.

A meus pais, que estimularam a busca pelo conhecimento, e com seu amor tornaram mais fáceis os caminhos da vida.

A minha família pelo estímulo constante, pelo apoio e amor irrestritos.

A todos que auxiliaram na realização deste trabalho: obrigada.

Instituições que contribuíram para execução deste trabalho: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Católica de Pelotas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
REVISÃO DA LITERATURA	8
1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.1 Histórico	8
1.2 Características	9
1.3 Fatores de virulência	11
1.4 Epidemiologia	13
2 Tipagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.1 Tipagem fenotípica	19
2.2 Tipagem genotípica	21
3 Resistência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.1 Mecanismos de resistência	26
3.2 Determinação da resistência	35
3.3 Taxas de resistência	38
4 Testes laboratoriais	43
4.1 Testes de Identificação	43
4.2 Testes de susceptibilidade	44
4.3 Pesquisa de Metalo-beta-lactamase	46
4.4 Tipagem fenotípica	48
4.4 Tipagem molecular	50
OBJETIVOS	56
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	57
ARTIGOS	71
1 Antibiotic resistance and molecular typing of <i>P. aeruginosa</i> : focus on imipenem. Publicado: The Brazillian Journal of Infectious Disease 2002;6:1-7.	71
2 Typing of <i>P. aeruginosa</i> from hospitalized patients: critical analysis of susceptibility and biochemical profiles compared to genotype.	83
3 <i>P. aeruginosa</i> : evolution of resistance and screening for M-βla	112
ANEXOS	132
ANEXO 1 –Testes de Identificação	132
ANEXO 2 –Testes de Susceptibilidade	140
ANEXO 3 –Pesquisa de M-βla	147
ANEXO 4 –Testes de Biotipagem	149
ANEXO 5 –Tipagem molecular	153

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram negativo capaz de utilizar vários substratos como fonte de carbono, o que facilita sua presença no meio ambiente e em praticamente qualquer equipamento hospitalar (Cross et al., 1983; Widmer et al., 1993). *P. aeruginosa* é capaz de produzir uma série de fatores de virulência potencialmente ligados a capacidade de produzir doença e possui diversos mecanismos de transferência genética que auxiliam na adaptação da bactéria ao meio. No entanto, na ausência de diminuição das defesas do hospedeiro, a bactéria tem pouca virulência intrínseca para o homem. A patogênese das infecções é multifatorial, o que explica o amplo espectro de infecções onde a bactéria é isolada (Vasil, 1986; Mansi et al., 1995).

Apesar dos avanços na terapia antibiótica, *P. aeruginosa* continua sendo agente causador de grande número de infecções hospitalares (Sader et al., 1993; Carmeli et al., 1998; Jones, 2001), correspondendo a cerca de 10% de todas as espécies bacterianas isoladas (Poh et al., 1993; Sader et al., 2001). O isolamento de uma mesma cepa em diversos grupos de pacientes, caracterizando surtos, foi descrito em vários trabalhos, muitos deles causados por bactérias multiresistentes (Sader et al., 1993; Römling et al., 1994b; Mansi et al., 1995; Bert et al., 1998; Tassios et al., 1998; Panzig et al., 1999; Bertrand et al., 2001; Douglas et al., 2001; Gulay et al., 2001). Por outro lado, estudos realizados em distintos momentos e várias partes do mundo observaram a existência de cepas particulares a um paciente (Bingen et al., 1996; Jones et al., 1997; Speijer et al., 1999; Silbert et al., 2001; Slama et al., 2001).

A tipagem bacteriana é fundamental para o entendimento da epidemiologia das infecções hospitalares, tanto para determinar a existência de surtos como para estabelecer a fonte da infecção. A tipagem por métodos fenotípicos pode utilizar o perfil bioquímico ou de susceptibilidade da bactéria, que, embora tenham a vantagem de serem realizados de rotina, são muitas vezes incapazes de estabelecer diferenças entre cepas não relacionadas.

As principais limitações destes métodos são a instabilidade dos padrões gerados devido a plasticidade da bactéria e o aparecimento cada vez mais freqüente de isolados clínicos multiresistentes (Mifsud et al., 1997; Williams, 1997).

Entre as técnicas de tipagem molecular, a restrição do DNA com enzimas de ação rara seguida de eletroforese pulsada parece ser a mais adequada para *P. aeruginosa*, devido a seu alto poder discriminatório (Poh et al., 1992; Struelens et al., 1993; Speert et al., 1994; Grundmann et al., 1995; Bennekov et al., 1996). A análise dos perfis de restrição permite determinar se duas bactérias possuem uma origem comum (mesmo clone). Quando os perfis obtidos pela macrorestrição do DNA são idênticos, a interpretação é fácil. Amostras de perfis diferentes podem ser comparadas pela observação do número e posição das bandas de DNA (Grothues et al., 1988), com determinação do percentual de similaridade entre duas amostras (Grundmann et al., 1995). A proximidade clonal entre dois perfis de restrição pode ser avaliada pelo número de fragmentos distintos (Tenover et al., 1995).

O significado de *P. aeruginosa* como patógeno hospitalar, associado a aumento de morbidade, mortalidade e custo de tratamento está diretamente relacionado com sua resistência a agentes antimicrobianos (Carmeli et al., 1998). Resistência intrínseca é expressa em graus variáveis por *P. aeruginosa*, que é menos susceptível que enterobactérias para a maioria dos antibióticos (Livermore, 2001). Além disso, atualmente ocorre resistência a agentes aos quais a bactéria era originalmente sensível. A resistência está relacionada a diversos mecanismos, que podem atuar independentemente ou em conjunto, incluindo produção de enzimas inativadoras de antibióticos (Arakawa et al., 2000; Bradford, 2001; Aubert et al., 2001; Carsenti-Etesse et al., 2001), expressão de sistemas de efluxo que eliminam o antibiótico (Livermore, 2001; Lomovskaya et al., 2001) e alteração da permeabilidade de membrana (Hancock, 1998; Lister, 2000; Livermore, 2001).

Testes de susceptibilidade são excelentes auxiliares para escolha do tratamento de uma infecção específica, mas no caso de *P. aeruginosa*, além da notável capacidade de

adquirir resistência durante a terapia, existe risco considerável de seleção de mutantes resistentes (Livermore et al., 2001). Estas características devem ser avaliadas na interpretação dos resultados do antibiograma, pois mesmo agentes aparentemente eficazes podem levar a falha terapêutica.

Embora isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentem resistência a vários antimicrobianos, as taxas variam bastante conforme a localização geográfica, sendo alguns mecanismos de resistência praticamente restritos a algumas áreas, pelo menos no momento. Assim, a seleção apropriada de antimicrobianos, sistema efetivo de vigilância e controle de infecção, bem como monitoração constante de taxas e perfis de resistência, e a determinação da existência de clones locais, são fundamentais para limitar a ocorrência e disseminação de resistência (Jones, 2001).

REVISÃO DA LITERATURA

1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1 Histórico

Evidências de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* remontam a 1850, quando Sédillot demonstrou a presença de secreções verde-azuladas em tecidos cirúrgicos; logo após foram visualizados elementos bacilares nos fluidos e sua relação com a infecção foi demonstrada. Conforme relatado por Villavicencio (1998), em 1882 Carle Gessard isolou o bacilo (por ele denominado *Bacillus pyocyaneus*) em cultura pura do pus de dois pacientes com feridas superficiais, tendo descrito este evento em sua tese de doutorado intitulada "*De la pyocianine et son microbe*". Em 1894 Robb, no livro "*Aseptic Surgical Techniques*", observa que epidemias do "pus azul" não são raras em hospitais. A partir daí o bacilo foi descrito em diversas publicações como agente causal de septicemia, infecções urinárias, lesões cutâneas em queimados, infecções respiratórias e oculares. Em 1916 o Dr. Freeman publica artigo contendo significativos avanços sobre o entendimento da patogênese do bacilo, tendo descrito uma leucocidina responsável pela diminuição da contagem de leucócitos no sangue. Devido a falta de métodos de cultura o diagnóstico era feito unicamente pela detecção de pus verde-azulado nos tecidos. Artigo de revisão publicado em 1947 relata *P. aeruginosa* como responsável por 31,9% dos casos de bacteremia em adultos pós instrumentação urológica. Nas décadas de 1950 e 1960 a preocupação com a bactéria cresceu devido ao aumento de incidência em pacientes queimados e a ausência de antibióticos eficazes para o tratamento (Villavicencio, 1998).

O nome inicial da bactéria deriva de sua forma e coloração características: *Bacillus* (bacilo), *pyo* (pus) *cyaneus* (azul). A partir de 1957 houve unificação da nomenclatura como *Pseudomonas aeruginosa*: "pseudomonas" (*gr.* falsa unidade) e "aeruginosa" (*lat.* coberto por ferrugem de ferro ou verde-acinzentado).

1.2 Características

A partir de 1973 o gênero *Pseudomonas* foi dividido em 5 sub-grupos conforme a homologia do RNA ribossomal (rRNA). Somente o grupo rRNA I é atualmente reconhecido como gênero *Pseudomonas*, tendo os demais sido classificados nos gêneros *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Brevundimonas* e *Comamonas*. A constante evolução dos estudos de taxonomia tem levado a novas sub-divisões e re-classificações destes gêneros (Schreckenberger, 1996).

Atualmente, o gênero *Pseudomonas* compreende 10 espécies, sendo *P. aeruginosa* o patógeno mais importante, tanto em relação ao número e tipos de infecções como pela morbidade e mortalidade a ela associadas. *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. stutzeri* são também patógenos reconhecidos, enquanto as demais espécies raramente são isoladas a partir de material clínico (Kiska et al., 1999).

P. aeruginosa mede aproximadamente 1,5-3,0 μm de comprimento e 0,5 μm de largura, aparecendo ao microscópio como um bacilo fino, reto ou levemente curvo e móvel graças a presença de um único flagelo polar. É uma bactéria mesófila, com temperatura ótima de crescimento de 37° C, mas pode crescer em temperaturas entre 5° C a 42° C. Seu conteúdo CG é de 67 mol % (Kiska et al., 1999).

A parede celular e membrana citoplasmática da *P. aeruginosa* são estruturalmente semelhantes aos demais bastonetes Gram negativos: uma membrana externa constituída principalmente por fosfolipídios e lipopolissacarídios (LPS), uma camada de peptidoglicano e a membrana citoplasmática composta de fosfolipídios intercalada por moléculas de proteína. O LPS é formado pelo lipídio A (ácidos graxos e glicosamina) covalentemente ligado um núcleo polissacarídeo (core), em cuja extremidade se encontram cadeias de oligossacarídeos que conferem especificidade sorológica (Pitt et al., 1997). A bactéria forma uma proteína monomérica (OprF) que funciona como canal para passagem de solutos. Como esta proteína confere baixa permeabilidade, muitos solutos penetram por canais específicos (Nikaido, 1998). A maioria das amostras forma fímbria (pili), filamentos flexíveis

que atuam como receptores de fagos e medeiam aderência à membrana celular de mamíferos (Pitt 1998).

O gênero inclui bactérias nutricionalmente versáteis, capazes de utilizar ampla variedade de substratos, incluindo carboidratos, álcoois e aminoácidos. Sua atividade proteolítica permite liberar aminoácidos e pequenos peptídeos de proteínas externas, facilitando o transporte para o interior da célula. O bacilo pode utilizar óleo combustível e querosene como fonte de carbono, sendo também capaz de se multiplicar em água destilada pela utilização de compostos orgânicos absorvidos durante a estocagem (Favero et al., 1971).

P. aeruginosa cresce em meios de cultura usuais em laboratório, geralmente após 24 horas de incubação. Muitas vezes causam hemólise no agar-sangue e formam uma película de crescimento na superfície de meios líquidos, devido ao seu caráter aeróbio. A bactéria também cresce em meios seletivos como MacConkey e Cetrimida, graças a sua resistência a sais biliares e a compostos de amônio quaternário. Algumas cepas, isoladas de pacientes com fibrose cística ou mais raramente de pacientes com bronquiectasia, podem apresentar requerimentos nutricionais específicos. Estes isolados, chamados de auxotróficos, são incapazes de sintetizar fatores de crescimento específicos, geralmente aminoácidos (Barth et al., 1995).

P. aeruginosa pertence ao grupo dos bacilos Gram negativos não fermentadores, que são caracterizados por não utilizar carboidratos como fonte de energia ou, quando o fazem se servem de vias metabólicas não fermentativas (Forbes et al., 1998; Kiska et al., 1999). A bactéria utiliza glicose e outros carboidratos pela via oxidativa ou via de Entner-Doudoroff. São aeróbios estritos, utilizando o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons, ainda que em condições de anaerobiose o nitrato possa substituí-lo. Embora este sistema receptor inorgânico seja sintetizado constitutivamente ele permanece inativo em presença de oxigênio, tornando-se funcional apenas em condições anaeróbicas (Koneman et al., 1997).

P. aeruginosa produz pelo menos quatro pigmentos distintos: piocianina (azul), pioverdina (verde-amarelado), piorrubrina (vermelho) e piomelanina (marrom escuro). Piocianina está presente em cerca de 80% dos isolados clínicos e sua coloração azul muda para amarelo e posteriormente vermelho com a acidificação, sendo incolor em pH alcalino. Este pigmento é solúvel em água e clorofórmio e sua produção é estimulada em meios contendo glicerol, magnésio, potássio e ferro. O pigmento pioverdina ou fluoresceína é solúvel em água, mas não em clorofórmio, e também é encontrado em outras espécies de *Pseudomonas*. Sua coloração verde-amarelado ou marrom se torna verde quando combinado com piocianina. Pioverdina atua como sideróforo, permitindo que a bactéria cresça em meios com quantidade limitada de ferro (Visca et al., 1992). Piorrubrina é um pigmento solúvel em água e insolúvel em clorofórmio, produzido principalmente por isolados de pacientes com fibrose cística. Finalmente, a piomelanina é um pigmento sem relação com a melanina humana, produzido por pequeno número de isolados (menos de 1%) (Pitt, 1998).

1.3 Fatores de virulência

P. aeruginosa é capaz de produzir uma série de fatores de virulência potencialmente ligados a capacidade de produzir doença. No entanto, na ausência de diminuição das defesas do hospedeiro, a espécie tem pouca virulência intrínseca para o homem, o que provavelmente explica o conflito de evidências experimentais sobre o papel dos diferentes fatores de virulência (Pitt et al., 1997).

Diversos mecanismos de transferência genética auxiliam a adaptação da bactéria às alterações de condições do meio. A patogênese das infecções é multifatorial, como revelado pela multiplicidade de toxinas e fatores de virulência que o bacilo produz e pela variedade de doenças que causa. A infecção parece ocorrer em estágios bem definidos: aderência, colonização, invasão e disseminação e os diversos fatores de virulência podem contribuir em um ou vários destes estágios (Vasil, 1986). Mansi e colaboradores (1995) relataram

grande variedade na expressão de fatores de virulência em isolados hospitalares e do ambiente, concluindo que a capacidade de invasão não pode ser predita apenas em base dos níveis de exoenzimas.

Os principais fatores relacionados com a virulência da *P. aeruginosa* estão listados na tabela 1. Entre os mais importantes aparece a exotoxina A, produzida principalmente em condições limitadas de ferro. A camada de alginato, formada por cepas mucóides, presente principalmente em isolados de pacientes com fibrose cística, tem importante papel na resistência a antibióticos. A ausência de leucocitose em alguns casos de sepse por *P. aeruginosa* pode ser explicada pelo efeito da leucocidina.

A expressão de muitos dos fatores extracelulares de virulência é controlada através do sistema "quorum-sensing" (QS), que determina que alguns genes bacterianos se expressem principalmente quando a população bacteriana é elevada. Dois sistemas QS foram descritos como reguladores da expressão de fatores de virulência em *P. aeruginosa*, tendo sido demonstrado que mutantes desprovidos destes sistemas apresentavam menor virulência para pneumonia e bacteremia em animais (Pearson et al., 2000).

Tabela 1 – Fatores de virulência de *P. aeruginosa*

Fator de virulência	Atividade biológica
Pili ¹	Aderência aos receptores gangliosídeos das células epiteliais
Lipopolissacarídeo ²	Endotoxina responsável pela síndrome séptica
Alginato ^{2,3}	Adesão à superfície pulmonar e formação de biofilmes que protegem contra fagocitose e ação de antibióticos
Exotoxina A ⁴	Inibição da síntese protéica, destruição tecidual
Exotoxina S ⁵	Inibição da síntese protéica, aderência
Fosfolipase C (PLC) ⁴	Destruição da membrana citoplasmática e do surfatante pulmonar
Elastase ¹	Degradação de imunoglobulinas e componentes do complemento
Leucocidina ⁶	Inibição da função de neutrófilos
Piocianina ⁶	Citotóxico; produz danos oxidativos ao tecido pulmonar

¹ Pitt & Barth, 1997. ² Barth & Pitt., 1998.

³ Mai et al., 1993; Hentzer et al., 2001; Pier et al., 2001; Hoiby et al., 2001.

⁴ Vasil et al., 1986 ⁵ Barker et al., 1991. ⁶ Pitt 1998; Visca et al., 1992.

1.4 Epidemiologia

A capacidade de crescimento de *P. aeruginosa* utilizando vários substratos como fonte de carbono constitui uma situação ambiental especial, facilitando sua presença em praticamente todo o meio ambiente e na superfície de frutas e vegetais (Cross et al., 1983). Acredita-se que a permanência no solo é devido a sua contínua introdução através da água, plantas ou trato intestinal de animais. A água não parece ser seu habitat principal, mas antes um veículo de transmissão, pois sua presença no ambiente aquático está associada a detritos, tendo sido encontrada em grande número de esgotos comunitários (Römling et al., 1994a). As bactérias provenientes do meio ambiente parecem sobreviver melhor a agentes físicos e químicos do que o mesmo organismo após seu cultivo (Favero et al., 1971).

A taxa de portadores intestinais em pessoas saudáveis varia de 2-10%, e a colonização parece ser transitória. No entanto, pode aumentar significativamente com a estadia hospitalar, chegando a atingir 60% em pacientes de algumas unidades de internação (Stoodley et al., 1970). A colonização intestinal destes pacientes pode estar relacionada ao uso de antibióticos, e conseqüente alteração da microbiota intestinal (Pitt et al., 1997).

Praticamente qualquer equipamento ou utensílio hospitalar pode ser um reservatório de *P. aeruginosa*. A bactéria tem sido isolada de uma variedade de soluções aquosas, incluindo desinfetantes, sabões, soluções oculares e fluidos de irrigação ou diálise (Widmer et al., 1993; Piit & Barth, 1997), e pode estar presente nestes líquidos sem ser detectada, pois não ocorre turvação visual em concentrações menores que 10^5 células/ml. Vários surtos de *P. aeruginosa* foram associados com sua presença na água de respiradores (Kiska et al., 1999), de tanques (Bennett et al., 1992), e de banheiras (Hollyoak et al., 1995).

Embora *P. aeruginosa* produza uma série de fatores de virulência, e tenha ampla distribuição na natureza, sua incidência em pacientes sem redução das defesas imunológicas é baixa. Entretanto, no ambiente hospitalar, especialmente em pacientes debilitados, a incidência pode ser bastante alta. O espectro de doenças varia desde infecções superficiais até sepse fulminante. As infecções mais graves adquiridas na

comunidade são a endocardite decorrente do uso de drogas injetáveis misturadas com água contaminada e infecções oculares devido ao uso de lentes de contato contaminadas, que podem causar úlcera de córnea e evoluir para perda de visão (Kiska et al., 1999).

Apesar dos avanços na terapia antibiótica, *P. aeruginosa* continua sendo agente causador de grande número de infecções hospitalares e fonte importante de morbidade e mortalidade, especialmente em unidades de tratamento intensivo (Sader et al., 1993). Entre os grupos de pacientes mais atingidos estão aqueles com câncer, transplantados e pacientes com cateter urinário, além de ser causa comum de infecção em queimados e feridas cirúrgicas, pela facilidade de colonização do tecido danificado. O trato respiratório de pacientes sob uso de respiradores é freqüentemente colonizado por *P. aeruginosa*, podendo ocorrer infecção transitória ou pneumonia severa, que associada a bacteremia determina taxas de mortalidade de 30 a 80% (Griffith et al., 1989).

Pacientes com fibrose cística constituem um grupo freqüentemente colonizados por *P. aeruginosa*. O desequilíbrio no transporte de íons na mucosa pulmonar destes pacientes afeta a viscosidade do muco, o que favorece a colonização bacteriana. A infecção pulmonar é refratária ao tratamento (Boukadia et al., 1993) e pode levar a falência respiratória progressiva sendo causa maior de mortalidade de pacientes fibrocísticos (Struelens et al., 1993).

Em infecções hospitalares, *P. aeruginosa* corresponde a cerca de 10% de todas as espécies bacterianas isoladas (Poh et al., 1993; Sader et al., 2001). Segundo relatório do NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance, 1991) *P. aeruginosa* foi o quinto patógeno isolado, sendo a causa mais freqüente de pneumonia hospitalar (17%). A proporção de pacientes infectados está relacionada a permanência em UTI (Cross et al., 1983; Bertrand et al., 2001).

A ocorrência de *P. aeruginosa* varia conforme a localização anatômica e geográfica. O trato respiratório é sítio mais comum de isolamento da bactéria (16,3 a 26,9%), seguido

de infecções de tecidos (11,5 a 14%), urina (6,7 a 11%) e sangue (4,3 a 6,5%). Estudo multicêntrico observou, no geral, maior incidência na América Latina (6,5 a 25 %) e menor incidência no Canadá (4,3 a 17,6%), embora na Ásia tenha sido observada maior incidência no trato urinário e na Europa em tecidos (Gales et al., 2001).

Na Europa, segundo dados coletados pelo EPIC (European Prevalence of Infection in Intensive Care), *P. aeruginosa* foi o 3º patógeno hospitalar, responsável por 28,7% das infecções (Carsenti-Etesse et al., 2001).

Dados do programa SENTRY relatam *P. aeruginosa* como o 4º isolado (6,9%) de infecções da corrente circulatória na América Latina em 1997 (Sader et al., 1999a). No Brasil, foi o 3º patógeno isolado em pacientes hospitalizados, sendo o mais freqüente causador de pneumonia hospitalar (25,2%), a segunda causa de infecção urinária (13,1%) e infecção de ferida cirúrgica (15,4%), e o sétimo patógeno (6,0%) isolado em infecções da corrente circulatória (Sader et al., 1999b). Dados do estudo MYSTIC, do mesmo período, apontam a bactéria como responsável por 11,4% das infecções em pacientes internados em UTI (Mendes et al., 2000). No período de 1997 a 1999 *P. aeruginosa* foi a 3ª bactéria (13,3%) isolada em 4 hospitais brasileiros, sendo a mais freqüente no trato respiratório inferior (Sader et al., 2001).

A aquisição de *P. aeruginosa* pode ocorrer por transmissão horizontal entre pacientes, com ou sem envolvimento do meio ambiente, ou de forma endógena, sendo bactérias que colonizam o intestino e o trato respiratório as principais fontes (Griffith et al., 1989; Boukadida et al., 1993). Pacientes com fibrose cística, queimados ou com outras infecções podem representar fonte importante já que a bactéria pode permanecer por semanas ou meses colonizando estes pacientes (Bennekov et al., 1996; Hsueh et al., 1998; Pujana et al., 1999).

A contribuição de bactérias do ambiente foi estabelecida pelo isolamento do mesmo clone em pacientes com fibrose cística e em ambientes aquáticos de amplas áreas geográficas (Römling et al., 1994a). Evidências da existência de um clone europeu de

origem comum já haviam sido observadas (Pitt, 1988). Por outro lado, a presença da bactéria no ar, mesmo em grande número, não implica em aumento de infecção (Bennett et al., 1992).

Embora o ambiente seja fonte para colonização de pacientes com fibrose cística, as clínicas e centros de reabilitação também parecem ser locais de risco, contribuindo significativamente no aumento de incidência de *P. aeruginosa* nestes pacientes (Grothues et al., 1988; Tümmler et al., 1991; Jones et al., 2001). É aceito que, uma vez colonizados a maioria dos pacientes fibrocísticos tende a conservar o mesmo clone durante toda a doença, embora possam existir variantes associadas (Ogle et al., 1987; Speert et al., 1994).

O isolamento de uma mesma cepa em diversos grupos de pacientes, sugerindo transmissão cruzada foi descrita em vários trabalhos (Sader et al., 1993; Römling et al., 1994b; Mansi et al., 1995; Gulay et al., 2001). Em centros de tratamento intensivo a colonização cruzada parece ter papel especialmente importante na transmissão da bactéria (Speijer et al., 1999; Bertrand et al., 2001). Surtos por *P. aeruginosa* são comuns, muitos deles causados por cepas multiresistentes (Tassios et al., 1998; Panzig et al., 1999; Douglas et al., 2000;), sendo vários relacionados a cepas ambientais, presentes na água ou líquidos contaminados (Bert et al., 1998), embora o envolvimento do grupo de enfermagem também seja considerado significativo (Widmer et al., 1993; Corona-Nakamura et al., 2001). Embora a contaminação horizontal seja freqüente, estudos realizados em distintos momentos e em várias partes do mundo observaram a existência de isolados particulares a um paciente, excluindo este modo de transmissão (Bingen et al., 1996; Jones et al., 1997; Pujana et al., 1999; Slama et al., 2001).

Finalmente, é importante ressaltar que o conhecimento da epidemiologia hospitalar de *P. aeruginosa* tem grande importância, tanto devido a sua ampla distribuição como porque é praticamente impossível erradicar a bactéria do ambiente hospitalar (Widmer et al., 1993).

2 Tipagem de *Pseudomonas aeruginosa*

A tipagem de agentes infecciosos é fundamental para o entendimento da epidemiologia das infecções hospitalares e comunitárias. O estabelecimento do grau de similaridade entre isolados clínicos auxilia no reconhecimento de surtos, na detecção de transmissão cruzada, na determinação da fonte de infecção e no monitoramento de programas de controle de infecção hospitalar. Permite ainda detectar microrganismos que apresentam características especiais de resistência e virulência e estabelecer as cepas prevalentes em determinada unidade, hospital ou região (Sader et al., 1995). Métodos adequados de tipagem também revelam se amostras resistentes, isoladas após terapia antibiótica, são variantes da bactéria original ou se decorrem da aquisição de uma nova cepa (Poh et al., 1993).

Embora possuam muitas características comuns, microrganismos de uma mesma espécie geralmente apresentam alguma diversidade, o que permite que isolados de distintas origens, épocas e regiões sejam classificados em cepas ou clones diferentes. Ao contrário, surtos resultam da exposição a uma fonte infecciosa comum e portanto os microrganismos envolvidos pertencem ao mesmo clone¹.

Existem muitos métodos de tipagem descritos para *P. aeruginosa*. A escolha do método mais adequado para uma situação leva em conta características como reprodutibilidade, poder discriminatório e facilidade de execução do método. Poder discriminatório pode ser definido como "habilidade de distinguir", e é determinado pelo número de tipos que o método é capaz de identificar e a frequência relativa destes tipos. O poder discriminatório é considerado adequado quando a probabilidade que duas amostras não relacionadas estejam no mesmo grupo for menor que 5% (Blanc et al., 1993).

¹ clone é "um conjunto de células ou organismos originários de outros por algum tipo de multiplicação assexual; todos os membros de um clone têm o mesmo patrimônio genético" (Dicionário Aurélio Século XXI). Pertencem ao mesmo clone bactérias tão semelhantes que são presumivelmente derivados de um ancestral comum (Faber, 1996).

No caso de *P. aeruginosa*, métodos tradicionais de tipagem apresentam dificuldade em estabelecer claramente diferenças entre isolados relacionados e não relacionados. Isto ocorre devido a existência de características comuns em grande número de isolados, mesmo não relacionados, como a existência de um sorotipo predominante na Europa. A distinção é ainda mais difícil nos casos em que a bactéria exibe resistência múltipla a antibióticos (Mifsud et al., 1997). Alguns métodos podem ser utilizados como triagem, realizando uma seleção inicial para reduzir o número de isolados que deverão ser analisados por métodos mais sofisticados. Por exemplo, sorotipos distintos sempre pertencem a clones não relacionados, mas o mesmo sorotipo pode compreender clones distintos (Bergmans et al., 1997).

Os métodos de tipagem podem ser classificados em dois grupos: métodos fenotípicos, que avaliam características expressas pela bactéria, e métodos genotípicos, que se baseiam na análise molecular do material genético. Os últimos apresentam maior poder discriminatório e reprodutibilidade, mas, ainda assim, "nenhum método garante total singularidade clonal entre isolados, já que plasticidade fenotípica e genotípica são características de *P. aeruginosa*" (Speert et al., 1994). A classificação apresentada na tabela 2 não se aplica integralmente a nenhuma bactéria, incluindo *P. aeruginosa*, para a qual antibiograma fornece resultados inadequados.

Tabela 2- Características dos principais métodos de tipagem de *P. aeruginosa*

Método	Poder discriminatório	Reprodutibilidade	Facilidade de Execução
Fenotípicos			
Antibiograma	regular	muito bom	ótimo
Biotipagem	regular	regular	ótimo
Serotipagem	regular	muito bom	bom
Fagotipagem	regular	muito bom	bom
Genotípicos			
Ribotipagem	muito bom	ótimo	bom
Macrorestrição	ótimo	ótimo	bom

Adaptada de Farber, 1996.

2.1 Tipagem fenotípica

A epidemiologia das infecções por *P. aeruginosa* foi tradicionalmente estudada através de marcadores fenotípicos, entre os quais o estudo de propriedades bioquímicas (biotipagem), a especificidade sorológica do componente polissacarídeos da membrana externa (LPS), a produção de piocianinas e a susceptibilidade a fagos e a agentes antibacterianos (Sader et al., 1993; Darini 1994). No entanto, a identificação de cepas com base em métodos fenotípicos é imprecisa, porque somente marcadores estáveis tem reprodutibilidade e poucos métodos tem poder discriminatório suficiente (Poh et al., 1993).

Características bioquímicas permitem a identificação de uma bactéria quando a espécie é descrita por um número suficiente de provas, mas sua utilidade epidemiológica é limitada (Grimont et al., 1986). Testes para os quais a maioria das cepas tem o mesmo comportamento raramente são úteis na investigação epidemiológica, enquanto aqueles que apresentam variabilidade de resposta podem ser úteis, pois diferenças na atividade bioquímica permitem distinguir biótipos. No entanto, sua estabilidade precisa ser levada em conta, e uma única diferença não deve ser considerada como evidência de distinção (Pitt, 1988). Apenas em casos especiais, quando o microrganismo tem características pouco comuns, a biotipagem fornece evidências suficientes, e ainda assim não definitivas, pois o método é considerado muito variável (Sader et al., 1995).

Os componentes do "core" do LPS de *P. aeruginosa* são conservados, mas as unidades da cadeia lateral são variáveis, determinando a especificidade antigênica "O", que pode ser determinada por teste de aglutinação em lâmina. Embora a freqüência dos sorotipos varie com o país e a fonte do isolado, o sorotipo O11 é um dos mais freqüentes e associado a infecções hospitalares (Pitt, 1988). A sorotipagem tem bom poder discriminatório e reprodutibilidade, e permite classificar 90% das amostras de *P. aeruginosa* (Speert et al., 1994).

A fagotipagem se baseia na lise da bactéria por ação de vírus que as infectam (bacteriófagos). A técnica utiliza diferentes fagos em uma placa, verificando a ação lítica de

cada um, o que determina o padrão da bactéria. Este método tem baixa reprodutibilidade porque o padrão final é influenciado por muitas variáveis, incluindo o meio de cultura e a leitura dos testes. Além disso, a capacidade discriminatória em isolados de pacientes com fibrose cística é baixa, pois mais da metade deles são lisados por um único fago (Pitt, 1988).

Piocinas são proteínas com atividade antibacteriana produzidas por *P. aeruginosa*, cuja atividade pode ser testada frente a uma coleção de bactérias indicadoras. Existem três tipos de piocinas: R, F e S; as duas primeiras são produzidas por 90% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, enquanto apenas 70% produzem a última. Esta técnica é trabalhosa e sua implantação requer tempo considerável, mas parece ser o método não molecular mais adequado para tipagem de *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (Pitt, 1988).

Os testes de sensibilidade fornecerem o padrão de susceptibilidade de um microrganismo a uma série de antimicrobianos que permite distinguir antibiotipos. Este método é atrativo por ser executado de rotina para fins terapêuticos, e portanto não requer acréscimo de tempo, equipamento ou custo para sua execução. No entanto tem limitações, tanto no caso de bactérias multiresistentes quando os resultados pouco ou nada esclarecem, como também devido a instabilidade do padrão de susceptibilidade. Além disso, *P. aeruginosa* pode desenvolver resistência durante o tratamento (Sader et al., 1993), de modo que padrões de sensibilidade são pouco úteis na detecção de similaridade entre cepas de *P. aeruginosa* (Williams, 1997).

2.2 Tipagem genotípica

O genoma bacteriano consiste, em média, de 6 milhões de pares de bases, e embora o cromossomo seja uma molécula relativamente estável, o DNA pode sofrer uma série de alterações que incluem mutações, rearranjos, inserção ou deleção de uma ou mais bases, ou ainda substituição de bases em determinados locais (Sader et al., 1995). Estas mudanças podem ser detectadas através de métodos moleculares com sensibilidade para identificar a cepa e especificidade para discriminar entre variantes clonais (Grundmann et al., 1995). Em geral métodos os genotípicos são mais exatos e reprodutíveis porque a composição do DNA independe das condições de cultivo (Stull et al., 1988).

Os métodos moleculares incluem determinação do perfil de plasmídios, amplificação inespecífica de segmentos do DNA utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), ribotipagem e macrorestrição do DNA. A análise do gene da exotoxina A e região contígua através de hibridização também já foi utilizado com bons resultados (Ogle et al., 1987).

As técnicas moleculares mais empregadas se baseiam na clivagem do DNA por endonucleases de restrição² e posterior separação dos fragmentos gerados por eletroforese. Para facilitar a comparação de perfis de restrição, alguns fragmentos podem ser ressaltados através de hibridização com sondas genéticas³.

Devido a alta especificidade das enzimas de restrição, a digestão do DNA por uma determinada enzima, fornece um padrão de fragmentos que será idêntico ou muito semelhante em todos os isolados que constituem um clone, independentemente da técnica de análise utilizada (Grothues et al., 1988; Gruner et al., 1993). A capacidade de discriminação depende da enzima de restrição utilizada; para *P. aeruginosa* melhores resultados foram observados com o uso das endonucleases de restrição *SpeI*, *XbaI* e *DraI* (Bennekov et al., 1996; Grattard et al., 1994; Grundmann et al., 1995; Poh et al., 1993; Sader et al., 1995).

² Enzimas que clivam o DNA em posições específicas.

³ Sondas são seqüências de DNA que reconhecem e se ligam a uma seqüência complementar de bases.

O número e o tamanho dos fragmentos gerados pela ação de uma enzima dependem de seu sítio de reconhecimento. Endonucleases de alta frequência clivam o DNA em muitos locais, enquanto enzimas de baixa frequência o fazem apenas em poucos sítios. As primeiras produzem grande número de fragmentos de baixo peso molecular (1.000 a 20.000 pares de bases), e formam um perfil complexo e difícil de ser analisado. O uso de endonucleases que atuam em sítios pouco comuns gera um número menor de fragmentos de alto peso molecular (10^3 pares de bases), e facilita comparações, mas reduz a capacidade de demonstrar diferenças pequenas (Sader et al., 1993).

Fragmentos pequenos de DNA podem ser separados através de eletroforese convencional, porém fragmentos maiores não são eficazmente deslocados nestas condições. Em 1982 Schwartz e colaboradores demonstraram que moléculas de DNA maiores que 50 Kb podem ser efetivamente separadas usando campos elétricos alternados. Na técnica de PFGE ("pulsed field gel electrophoresis" ou eletroforese em campo pulsado) os fragmentos de DNA migram continuamente, como na técnica convencional, mas sofrem reorientação na direção de migração a cada mudança no campo elétrico. O sistema CHEF ("contour-clamped homogeneous electric field") utiliza pulsos elétricos alternados com diferentes durações, favorecendo a reorientação e melhorando a resolução (Grundmann et al., 1995).

A ribotipagem tem como base o fato das moléculas de RNA ribossomal (r-RNA) serem extremamente conservadas (Grimont et al., 1986). Os genes do r-RNA (16 S, 23 S e 5 S) se encontram distribuídos por todo o cromossomo, ocorrendo em múltiplas cópias no genoma bacteriano. Embora estes genes sejam altamente conservados, as regiões dos espaços intergênicos não o são, e as variações nestas regiões determinam diferentes sítios de restrição. Sondas genéticas, homólogas aos genes r-RNA, são utilizadas para distinguir os fragmentos do DNA complementar ao r-RNA, fornecendo padrões fáceis de comparar já que o número de bandas varia entre 2 e 10 (Bennekow et al., 1996; Stull et al., 1988). Por outro lado, o reduzido número de bandas diminui a capacidade discriminatória do método

(Blanc et al., 1993). Devido a complexidade da técnica, atualmente são utilizados métodos automatizados, que apresentam a vantagem de armazenar dados e permitir comparações com isolados em diferentes momentos de várias regiões. Assim, podem auxiliar na formação de uma biblioteca para monitoramento epidemiológico futuro (Brisse et al. 2000).

Para *P. aeruginosa*, o método de macrorestrição do DNA seguido por eletroforese pulsada tem maior poder discriminatório que a ribotipagem que é menos capaz de determinar pequenas diferenças no cromossomo (Grundmann et al., 1995). Assim, a macrorestrição é mais indicada quando for necessária uma distinção mais detalhada, o que é o caso quando se estuda um mesmo sorotipo (Poh et al., 1992), ou quando se quer distinguir variantes de uma mesma linhagem clonal que seja prevalente em determinada área geográfica (Bennekov et al., 1996). Também na análise de amostras de pacientes com fibrose cística os métodos de macrorestrição por PFGE são mais indicados pois permitem discriminar entre variantes clonais e clones de origens distintas (Struelens et al., 1993; Speert et al., 1994). Por outro lado genes ribossomais não são facilmente perdidos, e os padrões de ribotipagem não são influenciados por pressão do antibiótico (Grattard et al., 1994) e esta estabilidade determina alta reprodutibilidade da técnica (Blanc et al., 1993). O método de ribotipagem é considerado adequado para triagem na tipagem molecular, devendo ser associado a outros métodos mais discriminatórios (Bennekov et al., 1996; Brisse et al. 2000).

A comparação quantitativa da macrorestrição do DNA entre as cepas de *P. aeruginosa* permite determinar "graus de similaridade". Diversos índices podem ser empregados para verificar se isolados bacterianos são distintos ou relacionados. A análise do padrão de bandas formado pode ser feita através de aquisição da imagem e posterior comparação das bandas utilizando "software" que fornece o percentual de similaridade, ou pode ser realizada através de análise de fotografia do gel, comparando visualmente o número e posição das bandas das amostras (Struelens et al., 1993; Römling et al., 1994a; Tenover et al., 1995).

3 Resistência em *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa apresenta resistência intrínseca, em graus variáveis, a diversos antibióticos, incluindo tetraciclinas, cloranfenicol e parte das fluoroquinolonas e beta-lactâmicos, sendo mais resistentes que enterobactérias para a maioria dos antibióticos (Livermore, 2001; Masuda et al., 1999). Além da resistência inerente, atualmente a bactéria apresenta resistência a agentes aos quais era originalmente sensível, o que determina crescente significado como patógeno hospitalar, associado a aumento de morbidade, mortalidade e custo de tratamento (Carmeli et al., 1998). De certa forma o aumento de resistência não surpreende pois microrganismos resistentes são facilmente encontrados no ambiente hospitalar onde há constante uso de antimicrobianos (Nikaido et al., 1998; Tassios et al., 1998; Jones, 2001). O amplo uso de antibióticos, somado à capacidade da bactéria de anular a atividade anti-bacteriana e à possibilidade de transmissão de informações conduz ao processo de emergência e disseminação de resistência.

Embora *P. aeruginosa* desenvolva resistência mutacional menos freqüentemente que algumas enterobactérias e tenha menor resistência intrínseca que outros bastonetes Gram negativos não fermentadores, como *Stenotrophomonas*, a combinação de resistência inerente com capacidade de adquirir resistência, somados à sua alta freqüência em infecções sérias torna esta bactéria especialmente problemática. O número de isolados resistentes a todos os agentes disponíveis é restrito, mas o aparecimento de cassetes de genes codificadores de resistência de carbapenemases e de amicacina-acetil transferases, parece tornar a questão relevante para um futuro próximo (Livermore, 2002).

P. aeruginosa é capaz de desenvolver resistência durante o tratamento com aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e imipenem (Ogle et al., 1988). Foi demonstrada indução de resistência em *P. aeruginosa* por pressão seletiva (Carsenti-Etesse et al., 2001; Harris et al., 2002), inclusive resistência induzida em vigência de tratamento causada por diminuição da produção de proteínas da membrana externa (Vurma-Rapp et

al., 1990). Este último caso ocorre com o imipenem, que seleciona mutantes resistentes que não apresentam a porina OprD, determinando aumento dos níveis de concentração inibitória mínima (MIC) e conferindo resistência clínica (Livermore, 2001).

Estudos em pacientes com fibrose cística constataram o aparecimento de resistência em etapas, causado pela exposição a antibióticos anti-pseudomonas (Harris et al., 1999). Embora exista grande variabilidade, a frequência de mutações espontâneas para cefotaxima e piperacilina tende a ser maior que para cefepime e imipenem. A passagem seriada de colônias de *P. aeruginosa* encontradas perto na zona de inibição de placas com gradientes do antibiótico permitem aquisição progressiva de resistência. Resistência a cefepime requer mais passagens em meio com antibiótico do que outras cefalosporinas, pois a primeira apresenta baixa frequência de aparecimento resistência por mutações únicas. Amostras que já exibiam mecanismos de resistência (enzimático ou não), geralmente desenvolveram resistência mais rapidamente que aquelas que não apresentavam nenhum mecanismo, pois provavelmente, já teriam progredido ao menos uma etapa na resistência (Carsenti-Etesse et al.; 2001).

As opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacim e levofloxacim), penicilinas (carbenicilina, ticarcilina e piperacilina), monobactâmicos (aztreonam), cefalosporinas (ceftazidime e cefepime) e carbapenens (imipenem e meropenem). A combinação de aminoglicosídeo com beta-lactâmico é considerada efetiva no tratamento da maioria dos casos (Quinn, 1998). Nas amostras produtoras de beta-lactamase podem ser utilizadas combinações contendo inibidor da enzima (ticarcilina-clavulanato e piperacilina-tazobactam), sendo a farmacocinética do tratamento com tazobactam mais favorável ao tratamento de infecções por *P. aeruginosa* (Lister, 2000).

3.1 Mecanismos de resistência

Mecanismos de resistência são parte da evolução da bactéria como modo de sobreviver entre outras bactérias produtoras de substâncias antibióticas; bactérias de relevância clínica utilizam estes mecanismos como estratégia de sobrevivência.

Resistência é codificada por um ou mais genes, que podem ser compartilhados por cepas da mesma espécie, entre diferentes espécies de um gênero e mesmo entre bactérias pouco relacionadas. Quando um mecanismo de resistência é expresso há uma propensão de passagem deste mecanismo para outras bactérias utilizando os modos comuns de transferência genética. A resistência pode se espalhar por ampla variedade de bactérias e cada uma delas pode adquirir múltiplos genes, o que as torna resistente a amplo espectro de agentes antimicrobianos. Resistência múltipla também pode ser mediada por único gene que codifique um mecanismo muito potente de resistência. Assim, resistência a vários agentes é comum porque pode depender de um mesmo mecanismo, como o caso de produção da enzima metalo-beta-lactamase, que confere resistência a todos os beta-lactâmicos com exceção do aztreonam (Bush, 1998).

Resistência a antibióticos pode ser dividida em duas classes: intrínseca e adquirida (Hancock et al., 1998). A primeira resulta de estado estrutural, fisiológico ou genético normais do microrganismo, sendo assim considerada uma característica natural, associada à vasta maioria das cepas que constituem um determinado grupo, gênero ou espécie bacteriana. Deste modo, resistência intrínseca é predizível e não necessita de testes laboratoriais especiais para sua determinação. Resistência adquirida, por sua vez, resulta de alteração da fisiologia e/ou estrutura da bactéria e pode ocorrer devido a mutações, aquisição de genes ou pela combinação de vários eventos. Pode envolver indução de resistência instável determinada pela exposição a certas condições, sem que ocorram alterações genéticas, sendo reversível quando as condições são removidas. Resistência

genética envolve aquisição estável de informações, seja por mutações de um gene ou de seus mecanismos de controle, ou através da aquisição de plasmídeo de resistência. Este tipo de resistência necessita ser determinada para cada isolado clínico (Forbes et al., 1998).

Entre os mecanismos responsáveis pela marcante resistência intrínseca de *P. aeruginosa* destacam-se: a baixa permeabilidade da membrana externa; existência de sistema ativo de efluxo que elimina os agentes e produção de enzimas que hidrolisam os beta-lactâmicos no espaço peri-plasmático e enzimas inativadoras de aminoglicosídeos (Köhler et al., 1999; Lister, 2000; Livermore, 2001).

* Diminuição da permeabilidade da membrana externa

A membrana externa constitui uma barreira semi permeável. A entrada de moléculas hidrofílicas é restrita e ocorre principalmente através de um grupo de proteínas existentes na membrana, as porinas. A ausência de porinas de alta permeabilidade em *P. aeruginosa* determina uma menor permeabilidade em comparação com outras bactérias Gram-negativas (Nikaido, 1998). Isto dificulta significativamente que agentes hidrofílicos, como a maioria dos beta-lactâmicos, alcance seus alvos, as proteínas ligadoras de penicilina - PBPs (Livermore, 1996; Lister, 2000). Existem rotas alternativas de penetração, como a passagem direta de antibióticos policatiônicos (gentamicina e tobramicina) por sistema complexo (Hancock et al., 1998).

A porina OprD da membrana de *P. aeruginosa* constitui um canal específico para a entrada de aminoácidos básicos e análogos estruturais, mas os poros formados também são permeáveis aos carbapenens (Livermore, 2001). A resistência devido a perda desta porina é um importante mecanismo para perda de eficácia clínica de carbapenens (Ochs et al., 1999; Quinn, 1998). Outra porina descrita em *P. aeruginosa*, a OprF, presente em grande número de cepas, parece ter papel principal na estabilidade da membrana, não sendo um canal eficiente como rota de entrada de antibióticos. Outras porinas que permitem a difusão de pequenos solutos hidrofílicos, incluindo antibióticos, são OprC, OprE e OprB (Hancock et al., 1998).

* Sistemas de efluxo

Efluxo é o processo pelo qual bactérias transportam componentes potencialmente tóxicos para fora da célula. Genes que codificam bombas de efluxo são habituais do cromossoma bacteriano, e quando expressos de forma constitutiva conferem resistência intrínseca a antimicrobianos sendo um dos mecanismos mais importantes de resistência em *P. aeruginosa* (Lomovskaya et al., 2001; Livermore, 2001).

O importante papel dos sistemas de efluxo na resistência bacteriana é confirmado pelo efeito de inibidores (EPIs – efflux pump inhibitors), de natureza não antibiótica, capazes de restaurar a atividade de um antibiótico sujeito ao efluxo, como acontece com o uso de inibidores de beta-lactamase sobre bactérias produtoras da enzima. Foi demonstrado que a inibição das bombas de efluxo diminui significativamente o nível de resistência intrínseca e reverte resistência adquirida. A exequibilidade desta abordagem terapêutica foi experimentalmente confirmada pela restauração da atividade de fluoroquinolonas “in vitro” e “in vivo” (Ryan et al., 2001; Lomovskaya et al., 2001).

A inativação dos genes codificadores de qualquer componente do sistema de efluxo torna o mutante susceptível a vários antibióticos. Ao contrário, quando expressos em altos níveis, seja como consequência de regulação fisiológica ou de alteração genética, podem conferir resistência a ampla variedade de antimicrobianos, pois a droga é excretada diretamente no meio, e sua reentrada através da membrana é relativamente lenta (Nikaido, 1998).

Os sistemas de efluxo constituem vários tipos de bombas, envolvem várias proteínas e atuam sobre diferentes substratos. Cada sistema consiste de um componente proteico de membrana citoplasmática que funciona como transportador, um componente proteico de membrana externa que forma canais e uma proteína de ligação. *P. aeruginosa* contém genes estruturais de pelo menos 12 sistemas de efluxo, alguns caracterizados e nomeados, como os sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (Nikaido, 1998).

Somente MexAB-OprM é expresso em nível suficiente para conferir resistência intrínseca em *P. aeruginosa*, enquanto os demais desempenham papel importante somente nos mutantes que tem sua produção aumentada (Masuda et al., 1999). Neste sistema, MexB é uma bomba proteica de largo espectro localizada na membrana citoplasmática; OprM é uma proteína formadora de poro que fornece a porta de entrada através da membrana externa e MexA é a proteína de ligação (Livermore, 2001). Esta bomba atua sobre amplo espectro de substratos, incluindo tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico e ciprofloxacim além da maioria dos beta-lactâmicos com notável exceção do imipenem. Este mecanismo parece explicar a resistência de isolados que, embora produzam apenas quantidades baixas de beta-lactamases, são intrinsecamente resistentes a carbenicilina (Ziha-Zarifi et al., 1999). O sistema MexAB-OprM envolve componentes anfifáticos ou com carga positiva, o que torna sua atuação no efluxo de beta-lactâmicos (compostos com carga negativa) controversa (Hancock et al., 1998). A falta de atividade contra imipenem parece ser devido à falta de anel lipofílico ou de cadeia lateral heterocíclica neste composto (Livermore, 2001).

O sistema MexCD-OprJ, quando desreprimido, elimina quinolonas, eritromicina e cloranfenicol, mas no grupo dos beta-lactâmicos é ativo apenas para cefens. Já o sistema MexEF-OprN é ativo sobre cloranfenicol e quinolonas, e, embora não contribua para o efluxo de beta-lactâmicos, sua expressão afeta indiretamente a eficácia de carbapenêmicos através da redução simultânea da porina OprD (Köhler et al., 1999). Finalmente, o sistema MexXY-OprM é ativo contra aminoglicosídeos, tetraciclina e eritromicina (Masuda et al., 1999).

* Beta-lactamases

As beta-lactamases periplásmicas hidrolisam os compostos beta-lactâmicos, podendo atuar independentemente ou somando-se a outros mecanismos de resistência. Vários tipos de beta-lactamases podem ocorrer em *P. aeruginosa* (Livermore, 1996). Estas enzimas podem ser classificadas por características fenotípicas como espectro de hidrólise,

susceptibilidade a inibidores e se são codificadas pelo cromossoma ou por plasmídios. O esquema de Bush revisado classifica as beta-lactamases pelo seu substrato preferencial e inibição pelo clavulanato. Embora amplamente usada, esta classificação não é estável, já que mutações pontuais podem alterar a especificidade do substrato e o espectro de inibição. A classificação por classes estruturais (Ambler) reconhece quatro classes designadas de A a D (tabela 3), e é bastante utilizada por ser mais simples, mais estável a mutações além de ter boa correlação com as demais classificações (Livermore, 1995).

Tabela 3 - Classificação das beta-lactamases: correspondência entre a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush (adaptado de Livermore, 1995)

Classe estrutural (Ambler)	Grupo funcional (Bush)	Substratos preferenciais	Inibição por clavulanato	Inibição por EDTA
A	2a	Penicilinas	+	-
	2b	Penicilinas, cefalosporinas	+	-
	2be	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactams	+	-
	2br	Penicilinas	+	-
	2c	Penicilinas (carbenicilina)	+	-
	2e	Cefalosporinas	+	-
	2f	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenems	+	-
C	1	Cefalosporinas	-	-
D	2d	Penicilinas (oxacilina)	+/-	-
Indeterminado	4	Penicilinas	-	?
B	3	Maioria dos beta-lactâmicos, carbapenems.	-	+

+ = positivo; - = negativo; ? = não determinado

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* produz uma beta-lactamase cromossômica de classe C induzível (AmpC), normalmente expressa em baixos níveis, que contribui para resistência intrínseca a beta-lactâmicos (Hancock, 1998; Masuda et al., 1999). Quando sintetizada em abundância esta enzima confere resistência à maioria dos beta-lactâmicos, com exceção do imipenem e por vezes da carbenicilina (Carsenti-Etesse et al., 2001). A

produção permanente da enzima é decorrente de mutação e ocorre em alta frequência (10^{-5} a 10^{-8}), enquanto a produção reversível ocorre por exposição da bactéria à droga indutora.

O aparecimento de resistência por indução de AmpC depende tanto da capacidade indutora do composto como da ação da enzima sobre o substrato (Livermore et al., 1987). Imipenem é forte indutor de produção da enzima, porém é lentamente hidrolisado, enquanto carbenicilina é estável à hidrólise e é pouco indutor quando em baixas concentrações. Já cefalosporinas de primeira geração são forte indutores e ao mesmo tempo tão sensíveis, que a presença da enzima causa resistência, mesmo quando em baixas concentrações. A maioria das outras cefalosporinas e ureidopenicilinas, embora susceptíveis à ação da AmpC, são fracos indutores de sua produção, de modo que não ocorre resistência clínica, a menos que um indutor secundário esteja presente (Livermore, 1987). Seleção de mutantes total ou parcialmente desreprimidos pode ocorrer durante terapia com indutores. No entanto, esta seleção parece ser menos freqüente em *P. aeruginosa* do que em *Enterobacter* spp e *Citrobacter freundii*, exceto em condições pulmonares especiais ou pacientes com fibrose cística. Tem sido relatada a evolução em etapas da forma induzível para forma parcialmente desreprimida e posteriormente desreprimida durante terapia, mas não está claro se este é o padrão normal ou se desrepressão pode aparecer diretamente por indução (Livermore, 1995).

A proteção do agente antimicrobiano pela combinação com inibidor de beta-lactamase é limitada, tanto porque induzem produção de AmpC, como pela inexistência de bons inibidores de todas as classes de beta-lactamases (Livermore, 1996). Entre os inibidores de beta-lactamase, clavulanato é mais indutor de AmpC em *P. aeruginosa*, que tazobactam e sulbactam (Livermore et al., 1987; Weber et al., 1990; Lister, 2000). Clavulanato, em combinação com ticarcilina, é capaz de induzir expressão de AmpC em *P. aeruginosa* em concentração clinicamente relevante (Lister et al., 1999), o que torna a eficácia dos inibidores de beta-lactamase, especialmente clavulanato, incerta (Weber et al., 1990).

Beta-lactamases que conferem resistência a cefalosporinas de espectro ampliado de várias classes ocorrem em *P. aeruginosa*, e sua produção está relacionada com mau prognóstico clínico (Vahaboglu et al., 2001). Devido a capacidade de transmissão de plasmídios entre enterobactérias e *P. aeruginosa* existe preocupação que ela possa se tornar um reservatório de tais enzimas (Nordmann et al., 1998; Marchandin et al., 2000). A maioria das beta-lactamases de espectro ampliado descritas em *P. aeruginosa* são localizadas em plasmídios e/ou integrons. Estas enzimas são derivadas de penicilinas (classe A), metalo-enzimas (classe B) ou oxacilinas (classe D) (Marchandin et al., 2000).

Beta-lactamases de espectro ampliado de classe A foram descritas em *P. aeruginosa*, e apresentam grande diversidade. A predominância das variantes PSE-1 e PSE-4 se deve sobretudo a seleção e menos pela transmissão de plasmídios (Livermore, 1995). Estas enzimas conferem padrões de resistência semelhantes as ESBL clássicas TEM, comprometendo penicilinas, ticarcilina mesmo em combinação com inibidores, piperacilina e cefoperazona, mas com pouca ou nenhuma ação sobre cefalosporinas de últimas gerações. Sua presença pode ser suspeitada com base no perfil de resistência e confirmada por teste de sinergismo pelo método de disco difusão. Derivados de TEM e SHV em *P. aeruginosa*, tem ocorrência mais limitada (Nordmann et al., 1998). Produção de ESBL foi recentemente descrita no Brasil (Pellegrino et al., 2002).

Outro grupo de beta-lactamases importantes em *P. aeruginosa* é composto de enzimas de classe B, incluídas nas variantes IMP-1, VIM-1 e VIM-2 de metalo-beta-lactamases (M-βla). Estas enzimas tem grande espectro de ação, podendo hidrolisar a maioria dos beta-lactâmicos, exceto monobactams e são caracterizadas por serem inibidas por quelantes de íons metálicos e pela falta de inibição por inibidores comerciais de beta-lactamases (Nordmann et al., 1998). Como hidrolisam imipenem e meropenem são freqüentemente denominadas carbapenemases. A enzima IMP-1 tem maior atividade contra carbapenems, e embora sua produção geralmente seja mediada por plasmídio, foram descritos genes cromossômicos em *P. aeruginosa* (Bush, 1998; Arakawa et al., 2000). As

beta-lactamases do tipo VIM possuem pouca homologia na seqüência de aminoácidos quando comparada com o grupo IMP.

Devido a natureza transferível do gene *bla_{IMP}*, seria esperado grande aumento da prevalência de Gram-negativos produtores de IMP-1, mas a produção de M-βla permanece restrita até o momento, embora mais recentemente tenham sido descritos casos de *P. aeruginosa* produtora da enzima em vários locais (Watanabe et al., 1991; Stunt et al., 1998; Pellegrino et al., 2002). A prevalência relativamente baixa de M-βla pode ser explicada considerando seu ambiente ecológico. Segundo Bush (1998), uma vez que sua produção ocorre quase sempre em combinação com outras beta-lactamases, a produção de múltiplas enzimas determina que enzimas individuais provavelmente serão mantidas somente se preencherem um nicho especializado. Assim, a menos que a resistência aos carbapenens seja indispensável para a sobrevivência da bactéria sua produção não ocorrerá, o que determina que o controle de bactérias produtoras da enzima pode ser feito pela limitação do uso de carbapenens. Além disso, níveis elevados de resistência aos carbapenens muitas vezes não são devido a produção de M-βla, e podem ser atribuídos a outros mecanismos, como produção de AmpC, diminuição de permeabilidade e mecanismos de efluxo.

As enzimas de classe D geralmente são difíceis de detectar por métodos laboratoriais, porque são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, quando o são (exceto OXA-18, que tem comportamento mais próximo as enzimas de classe A). O comportamento das enzimas deste grupo é variado, sendo alguns mutantes mais ativos contra ceftazidime (OXA-10, OXA-11, OXA-14 e OXA-19), enquanto outros degradam principalmente cefotaxime (OXA-17) (Bradford et al., 2001; Danel et al., 1999b). Resistência a cefepime e sensibilidade a ceftazidime, por outro lado, é consequência da produção de OXA-1 ou OXA-31 (Aubert et al., 2001). O aparecimento de variantes com maior resistência a cefotaxima (agente não é terapêuticamente usado para *P. aeruginosa*) do que a outras cefalosporinas pode ter ocorrido por transferência plasmidial, seleção por exposição a baixos níveis de ceftazidime ou por mutações ao acaso (Danel et al., 1999a).

* Resistência a aminoglicosídeos

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é a produção de enzimas, que geralmente determinam altos níveis de resistência, embora específico para determinado agente. As enzimas alteram o antibiótico através de acetilação, fosforilação e/ou adenilação, levando a redução de sua entrada na célula e/ou redução da interação com o ribossomo. Quase todas as cepas de *P. aeruginosa* possuem em seu cromossoma um gene de resistência a aminoglicosídeos (*aphA*) que pode ser ativado por mutação. Resistência a aminoglicosídeos também pode ocorrer devido a alteração de uma proteína ribossomal, embora este mecanismo seja pouco freqüente em *P. aeruginosa*, enquanto resistência em baixos níveis é causada por alterações celulares que levam a diminuição da passagem do antibiótico pela membrana (Hancock et al., 1998).

* Resistência a Quinolonas

A resistência a quinolonas pode ocorrer por dois mecanismos: mutação dos genes que codificam a DNA girase, como ocorre com outras espécies bacterianas, e por efluxo ativo da droga (Speciale et al., 2000). Pode ocorrer resistência a ciprofloxacim durante o tratamento de infecções crônicas. Aumento da expressão das bombas de efluxo pode determinar resistência cruzada com outras classes de antimicrobianos, com aparecimento de mutantes com resistência múltipla (Hancock et al., 1998; Kohler et al., 1999).

* Resistência a carbapenens

Os carbapenens estão entre os beta-lactâmicos com alta potência e ação contra *P. aeruginosa*. Resistência a este grupo é mais freqüentemente associada com diminuição de penetração, principalmente perda da porina OprD (Iaconis et al., 1997; Vurma-Rapp et al., 1990; Pai et al., 2001), mas pode co-depender da expressão de beta-lactamase cromossomal e de sistemas de efluxo (Tsakris et al., 2000). A resistência parece não estar relacionada a baixa afinidade com as proteínas de ligação (Okamoto et al., 2001). Embora menos freqüente, a produção de metalo-beta-lactamases é uma fonte crescente de

resistência e estas enzimas podem conferir alto nível de resistência a todos os beta-lactâmicos (Livermore, 2001).

Embora exista forte relação entre as concentrações inibitórias mínimas (MIC) das penicilinas e cefalosporinas, o MIC do imipenem não está relacionado ao dos demais beta-lactâmicos, tanto porque inibição pelo imipenem não depende da desrepressão da AmpC (Livermore, 2001), como porque está relacionada a diminuição da permeabilidade pela perda de porinas que não constituem a via de penetração de cefalosporinas na célula bacteriana (Bonfiglio et al., 2000).

O aparecimento de isolados resistentes aos carbapenens tem sido relacionado ao amplo uso de beta-lactâmicos anti-pseudomonas (Minami et al., 1996). Tratamento com imipenem, especificamente, parece ser fator de risco importante para aquisição de cepas resistentes (Troillet et al., 1997; Carmeli et al., 1998).

3.2 Determinação de resistência

Os testes rotineiros de determinação de resistência a agentes antimicrobianos fornecem resultados categorizados de sensibilidade ou resistência, ou de concentração inibitória mínima (MIC). No entanto, estes testes não determinam os mecanismos de resistência, que são importantes tanto individualmente, para escolha do agente mais adequado (resistência nem sempre é expressa em níveis detectáveis pelos testes de susceptibilidade), como coletivamente, para estimar a expansão de mecanismos específicos de resistência e possibilitar seu controle (Livermore et al., 2001).

Algumas drogas são capazes de revelar a presença de um mecanismo que confere resistência não somente ao agente mas a outros relacionados, como o caso da meticilina (oxacilina), que é utilizada para triagem de resistência de *S. aureus* a todos os beta lactâmicos, ou uso de ceftazidime para triagem de enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL). Infelizmente não são conhecidos agentes capazes de realizar tal alerta em *P. aeruginosa* (Livermore et al., 2001).

Testes de susceptibilidade são excelentes auxiliares para escolha do tratamento de uma infecção específica, no entanto, existe risco significativo de seleção de mutantes resistentes durante a terapia, especialmente quando a resistência para este agente emerge por mutações de alta frequência. O risco de selecionar mutantes resistentes depende do sítio de infecção, sendo maior em locais onde é difícil atingir altas concentrações da droga e menor em sítios de concentração. Estes agentes devem ser evitados, a menos que não haja outra alternativa ou quando, como acontece em *P. aeruginosa*, existe risco de seleção com o uso de qualquer agente ativo contra a espécie, exceto colistina e possivelmente meropenem (Livermore et al., 2001). No entanto, é possível que esta situação não se mantenha caso aumente a utilização clínica de colistina e meropenem.

Testes de determinação de mecanismos de resistência não são rotineiros, mas, quando se testa um número suficiente de agentes, frequentemente é possível inferir os mecanismos ocultos a partir do perfil de resistência. Beta lactâmicos são as drogas ideais para isso, devido a ampla variedade de mecanismos de resistência e porque diferentes mecanismos resultam em fenótipos bastante diferentes (Livermore et al., 2001).

Alguns mecanismos de resistência que podem ser inferidos pela observação de determinados fenótipos são listados na tabela 4. No entanto, nem sempre as interpretações são fáceis, porque *P. aeruginosa* pode apresentar múltiplos mecanismos, ocorrendo superposição dos perfis de cada um deles.

Tabela 4 – Fenótipos e interpretação do mecanismo de resistência em *P. aeruginosa*.
(adaptado de Livermore et al., 2001; Livermore, 2001).

Interpretação	Efeito na sensibilidade ou resistência					
	CAZ	IMI	MERO	QUINO	TIC	ATM
Desrepressão da AmpC						
Parcial ^a	r	N	N	N/r	r	r/R
Total ^b	R	N	N	r	r/R	R
Perda de OprD ^c	N	R	r	N	N	N
Aumento MexAB-OprM ^a	r/R	N	r	R	R	r/R
Perda de OprD + aumento de efluxo (MexAB-OprM)	R	R	R	R	R	R
Aumento Mex EF- OprN	N	r/R	r	R	N	r/R

a – comum; b – rara, c – esporádica

CAZ = ceftazidime, IMI = imipenem, MERO = meropenem, QUINO = quinolonas,

TIC = ticarcilina, ATM = aztreonam

r = susceptibilidade diminuída, geralmente sem franca resistência

R = resistência geralmente conferida

N = sem efeito na concentração inibitória mínima, pode aparecer como sensível.

3.3 Taxas de resistência

Isolados clínicos de *P. aeruginosa*, quando comparados a bastonetes Gram negativos da família Enterobacteriaceae, apresentam taxas elevadas de resistência aos antimicrobianos. Seleção apropriada de antimicrobianos, sistema efetivo de vigilância e controle de infecção, bem como monitoração constante de taxas e perfis de resistência são fundamentais para limitar a ocorrência e disseminação de resistência na espécie (Jones, 2001).

As taxas de resistência variam bastante conforme a localização geográfica, sendo alguns mecanismos de resistência praticamente restritos a algumas áreas, pelo menos no momento. Assim, isolados de infecções da corrente circulatória na América Latina se mostraram uniformemente mais resistentes a todas as classes de antibióticos que os isolados do Canadá e Estados Unidos (Diekema et al., 1999). Elevação significativa de resistência devido ao aumento de expressão de AmpC ocorreu na Inglaterra (Livermore, 1995; Chen et al., 1995), enquanto na mesma época o aumento foi pequeno em hospitais norte americanos (Quinn, 1998). Um mecanismo de resistência mais recentemente descrito para beta-lactâmicos, a produção de metalo-beta-lactamase, parece ocorrer principalmente em algumas partes do mundo: a enzima IMP-1 é mais freqüente no Japão (Bush, 1998; Livermore, 2001), enquanto isolados produtores de VIM foram relatados na Grécia (Tsakris et al., 2000).

Clones de isolados multiresistentes tem causado surtos, especialmente em unidades de tratamento intensivo. Isolados resistentes ao imipenem tem sido descritos em vários locais do mundo, muitas vezes causando surtos (Tsakris et al., 2000; Gulay et al., 2001; Pellegrino et al., 2002). Talvez mais preocupante, no entanto, seja o aparecimento cada vez mais freqüente de amostras que, embora apresentem o mesmo mecanismo de resistência, não apresentam relação epidemiológica (Sader et al., 1993; Tassios et al., 1998; Bert et al., 1998; Panzig et al., 1999; Douglas et al., 2001). A presença destas bactérias constitui uma

fonte mais difícil de eliminar, tornando-as fonte de futuras infecções. A produção de beta-lactamases de espectro estendido tem sido responsabilizada pelo aumento de resistência em pacientes hospitalizados em UTI (Kocazeybek, 2001).

A eficácia da ação dos agentes anti-pseudomonas pode ser expressa em taxas de susceptibilidade ou de resistência, esta última categoria incluindo apenas isolados com resistência plena ou abrangendo também os isolados com sensibilidade intermediária. A tabela 5 permite uma visão das taxas de resistência de *P. aeruginosa* no mundo. Todos os dados foram uniformizados para taxas de não sensibilidade, ou seja, resistência plena ou intermediária e listados por ordem cronológica do isolamento da bactéria (independentemente do ano de publicação), e por localização. Chama a atenção a grande variação nas taxas de resistência, dependendo do local de estudo.

Entre os aminoglicosídeos parece haver maior número de isolados resistentes a gentamicina, independentemente do período ou local. Resistência para amicacina é baixa nos Estados Unidos, Canadá, Ásia e Reino Unido, enquanto na França e Grécia foram observadas taxas de até 38%. Esta diferença independe do ano do estudo, e não pode ser atribuída a aumento de resistência no decorrer do tempo (tabela 5).

Embora tenham sido descritas taxas crescentes de resistência ao imipenem, este aumento parece não ser uma constante no mundo, pois mesmo amostras recentes apresentam baixo percentual de resistência em alguns locais como Inglaterra e Japão.

Tabela 5 - Taxas de resistência (plena + intermediária) de isolados de *P. aeruginosa* (em %), classificados por país e data de isolamento das amostras.

Autor, Local, Período dos isolados	AMI	GE	CIP	CEF	CAZ	ATM	IMI
Gales et al. (2001), 1997/99 - USA	5	NR	27	23	26	45	16
- Canadá	5	NR	22	11	18	28	12
- Europa	16	NR	29	21	22	35	18
- Ásia	5	NR	16	16	20	24	11
Iaconis et al. (1997), USA - 1988/92	NR	52	20	NR	21	NR	17
Quinn (1998), USA - 1990/93	11	35	11	NR	14	23	13
Jones et al. (1997), USA - 1996	NR	NR	NR	3	9	NR	5
Christenson et al. (2000), USA - 1996/97	NR	NR	NR	12	12	NR	7
Jones (2001), USA - 1998	6	19	26	18	22	NR	21
Blondeau et al. (1998) - Canadá - 1997	NR	NR	16	NR	10	NR	10
Chen et al. (1995), Reino Unido - 1993	NR	NR	NR	NR	10	NR	3
Henwood et al. (2001), Reino Unido - 2000	6	11	8	NR	2	NR	8
Tassios et al. (1998), Grécia - 1994/95	35	47	31	NR	15	33	21
Tsakris et al. (2000), Grécia - 1996/98	20	25	35	NR	27	24	3
Fluit et al. (2000), Europa - 1997/98	13	NR	27	NR	NR	NR	NR
Bonfiglio et al. (1998;2000), Itália - 1995	11	NR	32	23	13	NR	19
Bouza et al. (1999), Espanha - 1998	9	31	23	17	15	23	14
Cavallo et al. (2001), França - 1999	38	NR	40	47	24	42	19
Kato et al. (2001), Japão - 1998	NR	NR	NR	NR	45	NR	8

AMI = amicacina; GE = gentamicina; ATM = aztreonam; CEF = cefepime; CAZ = ceftazidime; CIP = ciprofloxacim; IMI = imipenem; NR = não relatado.

Na América Latina, dados do estudo SENTRY relativos a *P. aeruginosa* isolada de sangue em 1997, indicaram meropenem e amicacina como os agentes com melhor atividade "in vitro" (Sader et al., 1999a). Este trabalho ainda observou que as altas taxas de resistência da *P. aeruginosa* ao imipenem podem ser resultado do uso freqüente de carbapenems para tratamento de infecções por enterobactérias produtoras de ESBL, amplamente distribuídas nos locais do estudo. Também em isolados de hospitais brasileiros resistência ao imipenem é um dos principais problemas de resistência observados (Sader et al., 2001; Pellegrino et al., 2002).

A tabela 6 resume as taxas de resistência observadas na América Latina e no Brasil. Levantamento realizado pelo SENTRY em 1997 em amostras de distintas origens, em hospitais de São Paulo, Rio de Janeiro e Florianópolis, revelou que *P. aeruginosa* isolada de pacientes com pneumonia demonstravam altos índices de resistência, quase sempre superiores aos observados em isolados da América Latina (Sader et al., 1999b). As taxas de resistência deste estudo foram, em geral, maiores que as relatadas nos demais continentes. Dados do programa MYSTIC para isolados hospitalares de São Paulo e Florianópolis, nos anos de 1998 e 1999 mostraram em geral taxas de resistência mais baixas, o que surpreende pois as amostras eram provenientes de pacientes internados em UTI (Mendes et al., 2000).

Foi observado aumento significativo de resistência ao imipenem em São Paulo, sendo cefepime a cefalosporina mais efetiva contra estes isolados, embora 35,6% das amostras fossem resistentes a ambos os agentes (Sader et al., 1999c).

Em pacientes com fibrose cística, amostras coletadas entre 1996 e 1997 em Porto Alegre, mostraram taxas de resistência distintas para isolados mucóides e não mucóides de *P. aeruginosa*, sendo os primeiros mais resistentes. Neste grupo de pacientes as taxas de resistência observadas foram em geral menores que de outros estudos (Saiman et al., 1996). Nos isolados não mucóides as taxas de resistência também foram menores que as

observadas nos demais centros brasileiros e mais semelhante àquelas descritas em outras partes do mundo (Silbert et al., 2001).

Amostras de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro mostraram, em geral, taxas de resistência menores em isolados de um hospital universitário do que em hospitais privados. Foi também observada resistência múltipla em mais de 32% dos isolados, relacionada com um mesmo genótipo (Pellegrino et al. 2002).

As razões das diferenças regionais são difíceis de esclarecer, e parecem ligadas às políticas de controle de antimicrobianos. Uma vez que as taxas e os perfis de resistência variam conforme a localização geográfica, e mesmo em cada centro hospitalar na mesma cidade e muitas vezes nas diversas unidades do hospital, as políticas de controle serão mais eficazes quando direcionadas por estudo locais.

Tabela 6 - Taxas de resistência plena ou intermediária de isolados de *P. aeruginosa* na América Latina (AL) e Brasil (Br) (em %)

Autor, Local, Período de obtenção dos isolados	AMI	GE	ATM	CEF	CAZ	CIP	IMI
Sader et al. (1999a), AL - 1997	13	29	31	29	29	27	20
Gales et al. (2001), AL - 1997-99	22-41	NR	45-52	31-35	31-35	33-39	33-36
Sader et al. (1999b), Br - 1997							
Sangue	18	32	35	26	32	29	12
Trato respiratório	40	46	56	32	40	47	32
Cutâneo	23	23	41	36	36	18	36
Trato urinário	37	68	73	68	53	63	27
Mendes et al., (2000), Br - 1998-99	NR	36	NR	16	21	30	18
Silbert et al., (2001), Br -							
Mucóides	NR	NR	50	57	30	50	10
Não mucóides	NR	NR	16	17	10	14	3
Freitas & Barth (2002), Br - 1998/99	33	NR	30	14	12	31	16
Pellegrino et al. (2002), Br - 1999-2000	36-45	48-61	43-58	41-62	36-49	43-68	38-42

AMI = amicacina; GE = gentamicina; ATM = aztreonam; CEF = cefepime;

CAZ = ceftazidime; CIP = ciprofloxacim; IMI = imipenem; NR = não relatado.

4 Testes laboratoriais

4.1 Testes de Identificação

P. aeruginosa é facilmente reconhecida nos meios de isolamento primário devido a sua morfologia colonial, pigmento e odor característicos (Kiska et al., 1999).

P. aeruginosa pode apresentar 3 tipos básicos de morfologia colonial. As colônias típicas (tipo 1) medem 2-3 mm de diâmetro, são planas, foscas e com aparência metálica; as colônias do tipo 2 são menores e elevadas, enquanto colônias rugosas constituem o tipo 3. Em uma mesma cultura pode ocorrer qualquer combinação destes tipos. Variantes mucóides são particularmente freqüentes em pacientes com fibrose cística (Phillips, 1968).

A produção de pigmento verde-azulado que difunde no meio é suficiente para confirmar, de forma definitiva, a identificação de *P. aeruginosa*, pois esta é a única espécie que produz este pigmento, a piocianina (presente em cerca de 80% dos isolados). Algumas culturas só produzem piocianina em meios especiais, como meio de King A que contém altas concentrações de sais de potássio e magnésio, enquanto outras não produzem pigmento de modo algum, pois a capacidade de produzir piocianina pode ser perdida de modo irreversível em cultura (Pitt, 1998). Ocasionalmente, ocorre apenas produção de pioverdina (pigmento de coloração amarelada), que também pode ocorrer em *P. fluorescences* e *P. putida*, e neste caso é necessário verificar outras características, como a capacidade de crescimento a 42°C, para distinguir *P. aeruginosa* das outras espécies (Kiska et al., 1999).

Amostras não pigmentadas devem ser caracterizadas através de um número maior de testes que incluem as provas de oxidase, crescimento a 42° C, hidrólise da arginina, redução do nitrato com produção de gás e crescimento em meio contendo cetrimida e em MacConkey (anexo 1 – testes de identificação). Mais de 97 % dos isolados de *P. aeruginosa* tem resposta positiva para estes testes, o que permite identificação da grande maioria dos isolados clínicos (Koneman et al., 1997; Forbes et al. 1998; Kiska et al., 1999).

4.2 Testes de susceptibilidade

O método usual de determinação da sensibilidade de uma bactéria é o antibiograma, que pode ser realizado fundamentalmente de duas maneiras: o método de diluição e o método da difusão em agar. O método de aproximação de discos também permite verificar indução de Amp C e produção de M- β la em amostras de *P. aeruginosa*, quando determinados discos (indutor e substrato) são colocados a distâncias adequadas (figura 1).

Testes de difusão tem como vantagens a universalidade de sua utilização, a flexibilidade na escolha dos agentes antimicrobianos a serem testados, e a constante atualização dos procedimentos fornecida pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS 2002). Além disso, a interpretação qualitativa nas categorias sensível, intermediário e resistente é facilmente entendida. Estudos com isolados clínicos de *P. aeruginosa* comparando sistemas para realização de testes de sensibilidade evidenciaram resultados adequados com testes de difusão, inclusive para isolados de pacientes com fibrose cística (Jones et al., 1998; Burns et al., 2000).

Os testes de diluição, por sua vez, fornecem resultados quantitativos através do MIC (concentração mínima inibitória). Para a maioria dos antibióticos não há evidências definitivas de que a determinação do MIC seja mais relevante que resultados categóricos na seleção de terapia antibacteriana apropriada (Turnidge et al., 1999).

O método do E-teste (AB Biodisk, Solna, Suécia) é semelhante ao método de difusão, porém ao invés de discos com concentrações fixas, são utilizadas fitas impregnadas com gradiente do antibiótico, o que possibilita leitura do MIC diretamente, determinado pela concentração do antibiótico no ponto de interseção do crescimento bacteriano com a fita.

Testes de sensibilidade pelo método da difusão utilizam discos de papel de filtro impregnados com quantidades fixas dos agentes antibacterianos (anexo 2 – testes de susceptibilidade). A escolha dos agentes a serem testados é feita levando em conta a bactéria, o sítio da infecção e padronização da instituição. As medidas dos halos de inibição, em mm, é realizada após incubação por 16-18 horas em estufa bacteriológica (NCCLS).

Os resultados "sensível", "intermediário" e "resistente", para cada agente antibacteriano, são obtidos utilizando tabelas de interpretação das medidas dos halos de inibição (NCCLS, 2002). A categoria "sensível" informa que a infecção causada por aquela bactéria pode ser adequadamente tratada com a dose recomendada do agente. São considerados resistentes a um agente os isolados que não são inibidos pelas concentrações sistêmicas que a droga atinge nos esquemas terapêuticos usuais ou que tem mecanismos de resistência específica. A categoria "intermediário" inclui isolados que apresentam MIC próximo do atingido na corrente circulatória e tecidos, para os quais a resposta pode ser menor que para isolados susceptíveis. Neste último caso pode haver aplicabilidade clínica em sítios onde ocorre concentração fisiológica da droga ou quando dosagens maiores que as usuais podem ser utilizadas. Esta categoria também inclui uma zona para prevenir que pequenas variações técnicas causem grande discrepância de interpretação, especialmente para drogas com limites estreitos de ação farmacológica (NCCLS, 2002). Na determinação de taxas de resistência, resultados da categoria intermediária podem ser considerados isoladamente ou em conjunto com resultados resistentes, criando uma categoria "não sensível" (Bouza et al., 1999).

Para controle de qualidade do teste de difusão para *P. aeruginosa* é recomendado testar cepas padrão *P. aeruginosa* ATCC® 21853 e *E. coli* ATCC® 25922 bem como *P. aeruginosa* ATCC® 35218 (NCCLS, 2002).

Outras padronizações para realização de testes de susceptibilidade por disco difusão incluem as elaborados pela Sociedade Britânica para Terapia Antimicrobiana e utilizam metodologia semelhante, embora pouco utilizadas no Brasil (Andrews, 2001).

Embora testes "in vitro" sejam adequados para determinação da susceptibilidade de *P. aeruginosa* aos agentes antibacterianos, estes testes devem ser interpretados com atenção para reconhecimento de resultados não usuais, que devem sempre ser confirmados, de preferência através de método distinto. Por exemplo, embora seja cada vez mais freqüente resistência ao imipenem, este resultado deve ser confirmado porque a droga

facilmente sofre degradação (Carmeli et al., 1998). Além disso, deve ser observado que resistência a algumas drogas implica em resistência para outros agentes, mesmo que quando não expressa de modo óbvio no teste de rotina (Livermore et al., 2001).

Uma vez que os testes de rotina não são capazes de determinar todos os mecanismos de resistência, testes específicos podem ser realizados para detecção de enzimas como metalo-beta-lactamases, AmpC e ESBL.

4.3 Pesquisa de metalo-beta-lactamase

Metallo-beta-lactamases (M- β la) são enzimas que contém zinco em seu sítio ativo e conseqüentemente sofrem inibição por quelantes de íons metálicos (Nordmann et al., 1998). Estas enzimas são ativas contra a maioria dos beta-lactâmicos, exceto monobactams, embora os níveis de resistência ao imipenem sejam variáveis, podendo ocorrer produção de M- β la em isolados classificados como intermediários e até sensíveis pelos critérios do NCCLS (Walsh et al., 2002).

Análise da enzima por PCR fornece bons resultados, mas não é conveniente para testes de rotina. Devido ao aumento de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M- β la foi desenvolvido um método para distinguir bactérias produtoras da enzima de outras com perfis fenotípicos de resistência semelhantes, porém devido a outros mecanismos. O método de aproximação de discos, descrito por Arakawa et al. (2000), é de fácil realização e tem sensibilidade e especificidade comparáveis ao PCR.

O método de aproximação de discos consiste em verificar a ação inibidora de um agente quelante, como o ácido 2-mercapto etanol, sobre a enzima, permitindo ação do substrato (ceftazidime ou imipenem), sobre a bactéria (anexo 3 – pesquisa de metalo-beta-lactamase). O aparecimento de halo de inibição, ou seu aumento, ao redor do disco de ceftazidime pela ação do 2-MPA é considerado indicativo de produção de M- β la (figura 2).



Figura 1 – Teste de sensibilidade pelo método de difusão em agar. Indução de AmpC pelo imipenem (IMI) pode ser observada pelo achatamento dos halos de cefotaxima (CTX) e ticarcilina (TIC).

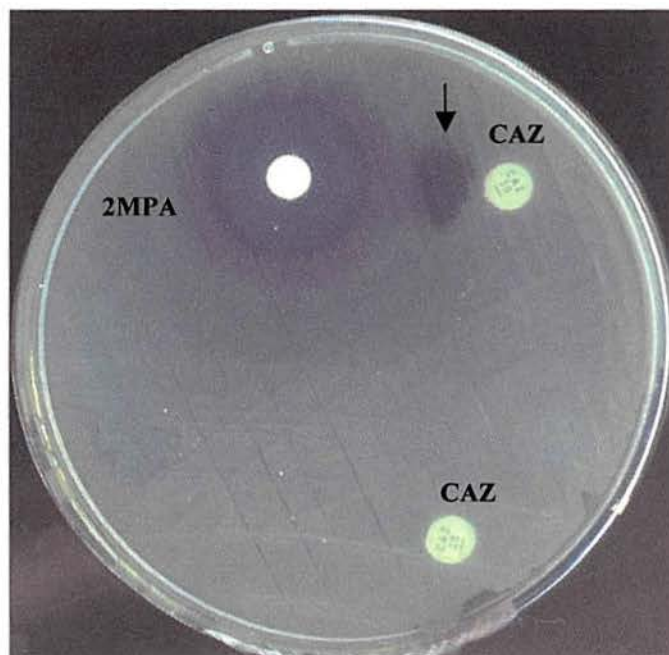


Figura 2 – Teste positivo para metalo-beta-lactamase (M-bla) em *P. aeruginosa*, evidenciando formação de halo de inibição entre os discos de ceftazidima 30 μ g (CAZ) e disco com 3 μ l de ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA).

4.4 Tipagem fenotípica de *P. aeruginosa*

* Antibiotipo

O padrão de sensibilidade permite a classificação de isolados bacterianos em grupos distintos - antibiótipos. Amostras que apresentam resposta igual a todos os agentes são considerados pertencentes ao mesmo antibiótipo, enquanto diferença em pelo menos um resultado de sensível para resistente, ou ao contrário, caracteriza um tipo diferente. Alterações menores, de sensível para intermediário, ou vice-versa, determinam subtipos. Os resultados do antibiograma são utilizados como método de tipagem por sua disponibilidade, uma vez que estes testes são realizados como rotina em laboratórios clínicos, embora, como já foi discutido, não seja um bom método de tipagem para *P. aeruginosa*.

* Biótipo

Para classificação em biótipos são utilizadas provas para as quais bactérias de uma mesma espécie não apresentam comportamento homogêneo, permitindo a divisão em grupos de comportamento bioquímico distinto. Para *P. aeruginosa* estes testes incluem: produção de pigmento, hidrólise da uréia, positivo em 48-66% dos isolados e utilização de alguns carboidratos. Mais da metade dos isolados de *P. aeruginosa* são capazes de degradar a galactose (79-81%), a manose (68-79%) o manitol (68-70%), enquanto menor número utiliza ramnose (22%) (Koneman et al., 1997; Forbes et al. 1998; Kiska et al., 1999). Além disso, a capacidade hemolítica, presente em cerca de 38% dos isolados, também pode ser utilizada com finalidade de tipagem (anexo 3 – testes de biotipagem).

Uma vez que *P. aeruginosa* realiza metabolismo oxidativo, que gera ácidos fracos como produto da utilização de carboidratos, os testes devem ser realizados em meio apropriado para que sua detecção não seja mascarada (neutralizada), o que pode ocorrer em meios contendo peptona, cuja utilização gera álcalis. No meio de Hugh-Leifson (meio de OF) a concentração de peptona, que na maioria dos meios é em torno de 1%, diminui para 0,2% e a concentração de carboidrato é 1%. A diminuição da proporção entre proteína e

carboidrato reduz a formação de amins alcalinas, e a maior concentração de carboidrato aumenta a quantidade de ácidos que podem ser formados. Além disso este meio é semi-sólido (agar 0.2 a 0.3%), o que permite que os ácidos formados na superfície penetrem no meio, facilitando a visualização. A via de utilização do carboidrato pode ser determinada pela utilização de dois tubos, sendo um coberto com óleo mineral (apenas fermentação) e um segundo tubo aberto. Este meio é adequado para verificar consumo de glicose, no entanto, para outros açúcares a acidificação é melhor detectada em meios contendo sais de amônio (ASS medium), nos quais o carboidrato em estudo é a única fonte carbono (Cowan, 1974).

Inicialmente deve ser determinada a via de utilização da glicose, em meio de OF. Uma vez que a bactéria seja caracterizada como não fermentadora não é necessário testar a via de utilização dos demais carboidratos, pois sua degradação só poderá ocorrer pela mesma rota metabólica. Os testes de utilização dos demais carboidratos podem ser realizados em meio de ASS ou meio de OF (anexo 3 – testes de biotipagem).

A utilização da uréia pode ser adequadamente verificada em meio de Christensen, enquanto hemólise pode ser observada em agar sangue. Observação de pigmentos é melhor visualizada em meios sem corantes.

O conjunto de resultados destes testes permite classificar a bactéria em biótipos, sendo cada biótipo constituído de amostras com idêntico comportamento.

4.4 Tipagem molecular de *P. aeruginosa*

Análise do DNA cromossômico através da técnica de macrorestrição seguida por eletroforese pulsada é considerado o melhor método para tipagem de *P. aeruginosa* (Sader et al., 1993; Struelens et al., 1993; Römling et al., 1994b; Tenover et al., 1995). Como já discutido em 2.2 (tipagem genotípica) este método analisa o cromossoma bacteriano após sua digestão com enzima de restrição de ação rara.

O primeiro passo da técnica é a incorporação da bactéria em gel de agarose para evitar quebras inespecíficas do cromossoma; seguida da lise da parede celular por ação da proteinase K, de origem fúngica, não específica, que atua em temperatura alta. O cromossoma, no bloco de agarose, é então digerido com enzima de restrição (*SpeI* reconhece a seqüência ACTAGT e gera 17 a 37 fragmentos de DNA em *P. aeruginosa*). Os blocos digeridos são colocados em gel de agarose, juntamente com marcador de peso molecular (48,5 Kb), e separados através de eletroforese pulsada durante um período adequado de tempo (22 horas). O gel é visualizado sob luz uv após ter sido corado com brometo de etídio. A imagem pode ser fotografada ou adquirida através de transiluminador (figura 3). A técnica, segundo Kaufmann et al. (1994), consta do anexo 4 – Tipagem molecular.

Todas as fases do método influenciam o resultado final. Os parâmetros que mais afetam os resultados são a concentração da agarose, a voltagem, o tempo dos pulsos, a temperatura da eletroforese e principalmente a qualidade e a concentração do DNA. A concentração da agarose tem efeito indireto sobre a mobilidade dos fragmentos, de modo que maior concentração retarda os movimentos. Talvez o fator que mais influa na separação dos fragmentos seja o pulso: acréscimo de tempo aumenta o tamanho do fragmento que pode ser separado. A troca de pulsos durante a corrida permite separação de fragmentos com maior variedade de tamanho. A eletroforese deve ser realizada em temperaturas baixas (10-14° C), pois fragmentos grandes são sensíveis a temperaturas mais altas (Kaufmann,

1998). A quantidade de DNA é controlada pelo número de bactérias na suspensão colocada no bloco de agarose. Acima de 70µg/ml de DNA a mobilidade é reduzida, tornando as bandas difusas e dificultando comparações.

Embora a maioria dos isolados de *P. aeruginosa* possam ser tipados por PFGE, alguns isolados podem apresentar dificuldade de interpretação. Os problemas técnicos mais freqüentes estão relacionados com o preparo ou lise do DNA. Diferenças entre amostras podem ser resultado de variação nas condições de restrição do DNA, altamente influenciada pela ação da proteinase K e remoção de seus produtos. O tamanho aparente das bandas pode ser reflexo da quantidade de DNA presente. Falta de resolução do DNA, com aparecimento de bandas difusas ou "smearing" pode ser consequência da falta de lise pela proteinase K, devido a degradação do DNA por ação de nucleases bacterianas não totalmente inativadas, ou mais raramente por falha do tampão de eletroforese. Tal efeito não permite interpretação do perfil de restrição na amostra. O problema pode ser solucionado por aumento da concentração e do tempo de ação da proteinase ou por adição de dimetil sulfóxido para inativá-la (Birren et al., 1993). A adição de 50µM de tiouréia ao tampão de eletroforese também foi recomendada para prevenir a degradação do DNA (Römling et al., 2000).

Idealmente, tipagem molecular fornece uma base clara e objetiva para identificação de surtos e distinção de isolados não relacionados. Na prática, diferenças reais devem ser distinguidas de variações genéticas naturais que ocorrem em um cepa. Os critérios de interpretação devem ser bem definidos para fornecer guias objetivos para estimar o significado das variações observadas.

Análise comparativa dos perfis através de sistemas de análise computadorizada com geração de dendrograma fornece dados mais facilmente interpretáveis que os obtidos por comparação visual das bandas, embora para amostras em um mesmo gel a comparação visual forneça bons resultados (figura 3).

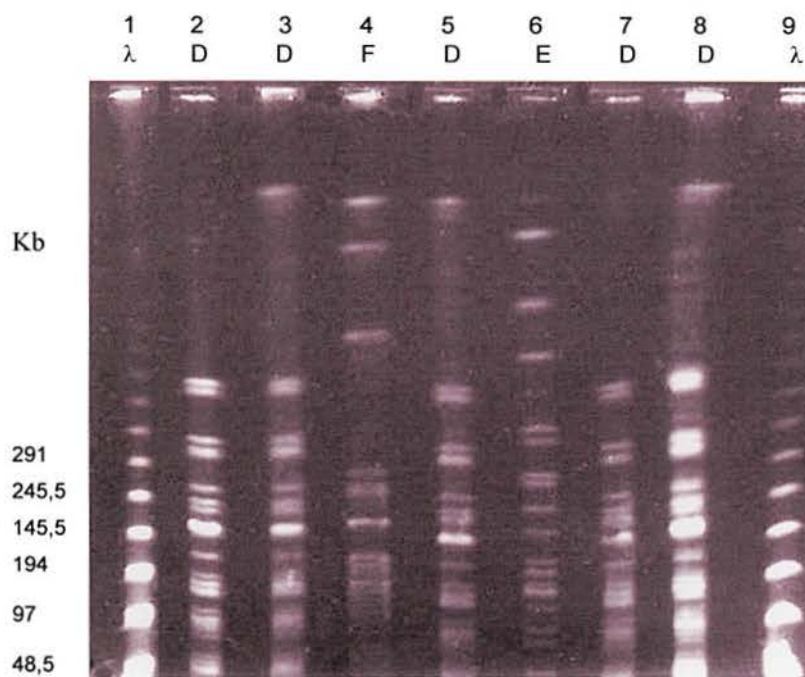


Figura 3 – Perfis de macrorestrição do DNA de amostras de *P. aeruginosa* em um mesmo gel de agarose.

Linhas 1 e 9: padrão de peso molecular (48,5 kb).

Linhas 2, 3, 5, 7 e 8: amostras pertencentes ao clone D.

Linhas 4 e 6: amostras pertencentes a clones distintos.

O coeficiente de Dice, proposto para estudo de evolução e genética de populações, foi utilizado por Struelens e colaboradores (1993) que consideraram "variantes clonais" isolados que apresentavam entre 80% e 100% de similaridade. De forma similar Römbling e colaboradores (1994a) propuseram que isolados com mais de 75% de similaridade fossem descritos como pertencentes a mesma linhagem.

Finalmente, Tenover e colaboradores (1995) estabeleceram critérios baseados no número de eventos genéticos necessários para gerar alteração de bandas. Isolados com resultados iguais não foram denominados de idênticos, mas de "indistinguíveis", porque nenhum método analisa a totalidade do conteúdo genético. São considerados subtipos os isolados com diferenças ocasionadas por um ou dois eventos genéticos e como isolados distintos aqueles com mais diferenças genéticas (figura 4). Assim, isolados relacionados apresentam 2 a 6 bandas distintas e podem ser classificados como subtipos.

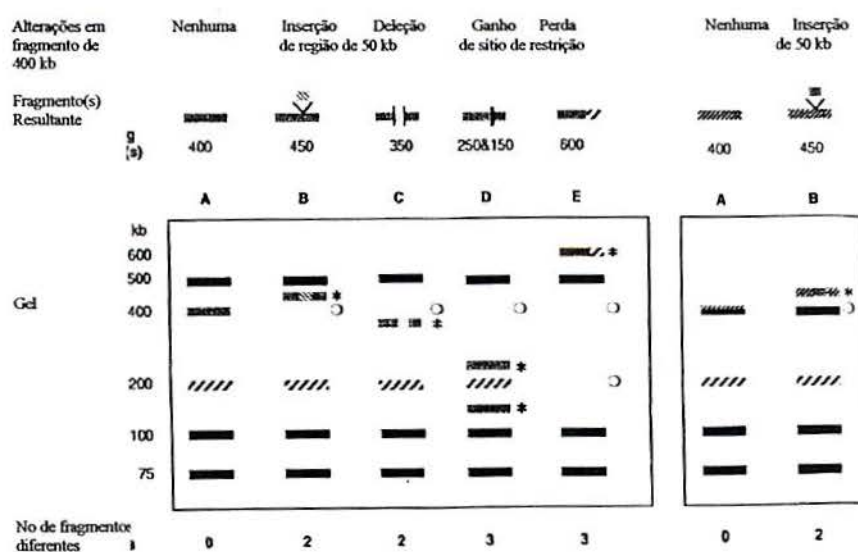


Figura 4. Alterações nos padrões de PFGE como resultado de diferentes classes de eventos únicos (extraído de Tenover et al, 1995).

Devido a variações não controláveis da técnica, que podem resultar em pequenas diferenças, nem sempre é fácil aplicar os critérios usuais para traçar paralelos entre amostras de diferentes géis, especialmente quando se utiliza observação visual. Para auxiliar, recentemente foi descrito um método que utiliza as bandas formadas pelo marcador de peso molecular para definir faixas de observação e o número de bandas em cada faixa permite criar escores para utilizados calcular a distância genética entre os isolados (Samarrai et al., 2000).

Outros aspectos, não relacionados à técnica são importantes para garantir interpretações adequadas, especialmente quando se estuda espécies freqüentes no local. A observação de um clone predominante pode não determinar a existência de um surto se este clone for freqüentemente encontrado. A inclusão de isolados não relacionados epidemiologicamente auxiliam a diferenciar as cepas endêmicas, principalmente quando a epidemiologia molecular da bactéria ainda não foi determinada naquele local. A inclusão de controles históricos auxiliam a determinar se um grupo de isolados representa um novo surto, e amostras conhecidas auxiliam no controle técnico (Tenover et al., 1995).

OBJETIVOS

GERAIS

Determinar os perfis moleculares de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes hospitalizados em Porto Alegre.

Determinar os perfis de resistência a antimicrobianos de uso freqüente no tratamento de infecções causadas de *P. aeruginosa*.

ESPECÍFICOS

Avaliar sistemas fenotípicos de caracterização fenotípica para *P. aeruginosa*.

Estabelecer relação molecular entre as amostras isoladas em um mesmo hospital e entre hospitais diferentes.

Verificar a relação clonal entre amostras resistentes a agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:43-57.
2. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40-3.
3. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Jun.;45:1615-20.
4. Barker NR, Minor V, Deal C, Shahrabadi MS, Simpson DA, Woods DE. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S in an adhesion. *Infect Immun* 1991;59:2859-63.
5. Barth AL, Pitt TL Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:37-40.
6. Barth AL, Pitt TL Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Infect Dis* 1998;2:43-61.
7. Bennekow T, Colding H, Ojeniyi B, Bentzon M, Hoigy N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1996;34:202-4.
8. Bennett JV, Brachman PS. Hospital infections. 3rd ed. Boston: Little Brown and Company; 1992.
9. Bergmans D, Bonten M, van Tiel F, Gaillard C, London N, van der Geest S, de Leeuw P, Stobberingh E. Value of phenotyping methods as an initial screening of *Pseudomonas aeruginosa* in epidemiologic studies. *Infection* 1997;25:350-354.
10. Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infec* 1998;39:53-62.
11. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, Helias JP. Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001;27:1263-8.

12. Bingen E, Bonacorsi S, Rohrllich P, Duval M, Lhopital S, Brahim N, Vilmer E, Goering RV. Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 1996;34:3226-9.
13. Birren B, Lai E. Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. San Diego (California): Academic Press; 1993.
14. Blanc DS, Siegrist HH, Sahli R, Francioli P. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1993;31:71-7.
15. Blondeau JM, Suter ME, Borsos S, Misfeld C. Canadian *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility study from 48 medical centers. *J Antimicrob Agents* 1998;10:297-302.
16. Bonfiglio G, Carciotto, V, Russo G, Stefani S, Schito GC, Debbia E, Nicoletti G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey. *J Antimicrob Agents* 1998;41:307-10.
17. Bonfiglio G, Marchetti F. In vitro activity of ceftazidime, cefepime and imipenem on 1005 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates either susceptible or resistant to beta-lactams. *Chemother* 2000;46:229-34.
18. Boukadida J, Montalembert M, Lenoir G, Veron M, Berche P. Molecular epidemiology of chronic pulmonary colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1993;38:29-33.
19. Bouza E, Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Diaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:981-2.
20. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
21. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Kusters K, Toelstra A, Verhoef J, Scmitz FJ. Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Using automated ribotyping. *J Clin Microbiol* 2000;38:3636-45.

22. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshall S, Jones RN. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:1818-22.
23. Bush K. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998;27 Suppl 1:48-53.
24. Carmeli Y, Eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L, Girolami P, Samore M. Failure of quality control measures to prevent reporting false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1998;36:595-7.
25. Carsenti-Etesse H, Cavallo JD, Roger PM, Zihra-Zarifi I, Plesiat P, Garrabe E, Dellamonica P. Effect of β -lactam antibiotics on the in vitro development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:144-51.
26. Cavallo JD, Leblanc F, Fabre R, Fourtq-Esqueoute S. Survey of the antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* in France and the distribution of beta-lactams resistance mechanisms. *Pathol Biol* 2001;49:534-9.
27. Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995;43:300-9.
28. Christenson JC, Korgenski EK, Daly JA. In vitro activity of meropenem, imipenem, cefepime and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:899-901.
29. Corona-Nakamura AL, Miranda-Novaes MG, Leanos-Miranda B, Portilo-Gomez L, Hernandez-Chavez A, Anthon-Rendon J, Aguilar-Benavides S. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res* 2001;32:238-42.
30. Cowan ST. Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. London (UK): Cambridge University Press;1974.
31. Cross A, Allen J, Burke J, Duce G. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev Infect Dis* 1983;5:837-45.
32. Danel F, Hall LMC, Livermore DM. Laboratory mutants of OXA-10- β -lactamase giving ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1999a;43:339-44.

33. Danel F, Hall LMC, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999b;43:1362-6.
34. Darini ALC. Epidemiologic typing methods for bacteria. *Rev Bras Pat Clin* 1994;30:14-9.
35. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, Sader HS, Kugler K, Beach M. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY antimicrobial surveillance programs, 1997. *Clin Infect Dis* 1999;29:595-607.
36. Douglas MW, Mulholland K, Denyer V, Gottlieb T. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a burns unit: an infection control study. *Burns* 2001;27:131-5.
37. Farber JM. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J Food Protec* 1996;59:1091-101.
38. Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NT. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 1971;173:836-8.
39. Fluit AC, Verhoef J, Scmitz FJ. Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. European SENTRY participants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:370-4.
40. Forbes BA, Sahan DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th ed. New York: Mosby; 1998.
41. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1977-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32:146-55.
42. Grattard F, Pozzetto B, Ros A, Gaudin O. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains by ribotyping: high discriminatory power by using a single restriction endonuclease. *J Med Microbiol* 1994;40:275-81.
43. Griffith SJ, Nathan C, Selander RK, Chamberlin W, Gordon S, Kabins S, Weinstein RA. The epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in oncology patients in a general hospital. *J Infect Dis* 1989;160:1030-6.
44. Grimont F, Grimont P. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur* 1986;137:167-75.

45. Grothues D, Koopmann U, Hardt H, Tümmler B. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol* 1988;26:1973-7.
46. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner F, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1995;33:528-34.
47. Gruner E, Kropec A, Huebner J, Altwegg M, Daschner F. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical intensive care patients. *J Infect Dis* 1993;167:1216-20.
48. Gulay Z, Atay T, Amyes SG. Clonal spread of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit of a Turkish hospital. *J Chemother* 2001;13:546-54.
49. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998;27 Suppl 1:93-9.
50. Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 1999;28:1128-33.
51. Harris AD, Smith D, Johnson JÁ, Bradham DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2002;34:340-5.
52. Hentzer M, Teitzel GM, Heydorn A, Molin S, Givdkov M, Parsek MR. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001;183:5395-401.
53. Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:789-99.
54. Hoiby N, Krog JH, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 2001;3:23-35.
55. Hollyoak V, Allison D, Summers J. *Pseudomonas aeruginosa* wound infection associated with a nursing home's whirlpool. *Comm Dis Rep* 1995;5:100-4.

56. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J Clin Microbiol* 1998 May;36:1347-51.
57. Iaconis PJ, Pitkin DH, Sheikh W, Nadler HL. Comparison of antibacterial activities of meropenem and six other antimicrobial against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from North American studies and clinical trials. *Clin Infect Dis* 1997;24:191-6.
58. Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* 2001;18:557-8.
59. Jones RN, Biedenbach DJ, Marschall AS, Pfaller MA, Doern GV. Evaluation of the Vitek System to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against cefepime. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:107-10.
60. Jones RN, Pfaller MA, Marshall AS, Hollis RJ, Wilke WW. Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: occurrence of resistance, molecular epidemiology and screening for metallo-enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:187-92.
61. Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over past few years. *Chest* 2001;119 Suppl 2:397-404.
62. Kato K, Iwai S, Kumasa K, Horikoshi A, Inada S, Inamatsu T, Ono Y, Nishiya H, Hanatai Y, Narita T, Sekino H, Hayashi I. Survey of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by the Tokyo Johoku Association of Pseudomonas studies. *J Infect Chemother* 2001;7:258-62.
63. Kaufmann ME, Pitt TL. Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: Henrik Chart. *Methods in practical laboratory bacteriology*. London: CRC Press; 1994. p. 83-92.
64. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Wodford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology: Protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press Inc; 1998. p. 33-50.
65. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 517-25.

66. Kocazeybeck B. Antimicrobial resistance surveillance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units of four different hospitals in Turkey. Evaluation of the prevalence of extended-spectrum and inducible beta-lactamases using different E-test strips and direct induction methods. *Chemother* 2001;47:396-408.
67. Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *P. aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:424-7.
68. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Washington CW. *Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
69. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC Cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of Ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:882-9.
70. Lister PD. Beta-lactamase inhibitor combinations with extended-spectrum penicillins: factors influencing antibacterial activity against enterobacteriaceae and *P. aeruginosa*. *Pharmacotherapy* 2000;20:213-8.
71. Livermore DM, Winstaley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:87-102.
72. Livermore DM, Yang YJ. Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactams antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987;155:775-82.
73. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
74. Livermore DM. Are all beta-lactams created equal? *Scand J Infect Dis Suppl* 1996;101:33-43.
75. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamases induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:439-45.
76. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634-40.
77. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:247-50.

78. Livermore DM. Role of beta-lactamase and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Chemother* 1989;42:257-63.
79. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:105-16.
80. Mai GT, Seow WK, Pier GB, McCormack JG, Thong YH. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun* 1993;61:559-64.
81. Mansi A, Orsi GB, Tomao P, Visca P. Virulence determinants in human and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital wards. *Med Microbiol Lett* 1995;4:238-46.
82. Marchandini H, Pierre H, de Champs C, Sirot D, Darbas H, Perigault PF, Carriere C. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum- β -lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:213-6.
83. Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. Interplay between Chromosomal β -Lactamase and the MexAB-OprM Efflux System in Intrinsic Resistance to β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:400-2.
84. Mendes C, Hsiung A, Kieffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I, Zoccoli. Avaliação da atividade in vitro de nove antimicrobianos contra cepas bacterianas isoladas de pacientes em unidades de terapia intensiva no Brasil: programa de vigilância antimicrobiana "MYSTIC". *Braz J Infect Dis* 2000;4:236-44.
85. Mifsud AJ, Watine J, Picard B, Charet JC, Solignac-Bourel C, Pitt TL. Epidemiologically related and unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 cannot be distinguished by phenotypic and genotypic typing. *J Hosp Infect* 1997;36:105-16.
86. Minami S, Akama M, Araki H, Watanabe Y, Narita H, Iyobe S, Mitsuhashi S. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:433-44.

87. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS Document M100-S12. Pennsylvania, 2002.
88. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998;27 Suppl 1:32-41.
89. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:128-32.
90. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1085-90.
91. Ogle JW, Janda MJ, Woods DE, Vasil ML. Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987;155:119-126.
92. Ogle JW, Reller S, Vasil ML. Development of resistance in *P. aeruginosa* to imipenem, norfloxacin and ciprofloxacin during therapy: proofs provided by typing with DNA probe. *J Infect Dis* 1988;157:743-8.
93. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *P. aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penems antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1964-71.
94. Pai H, Kim JW, Kim J, Lee J, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:480-4.
95. Panzig B, Schröder G, Gründing M. A large outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in north-eastern Germany. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:415-8.
96. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect and Immun* 2000;68:4331-4.
97. Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér AS, Oliveira MP, Sampaio JL, Freitas A, Ferreira ALP, Amorim ELT, Riley LW, Moreira BM. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002;40:2420-4.

98. Phillips I. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J Med Microbiol* 1968;2:9-16.
99. Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 2001;69:1895-901.
100. Pitt TL, Barth AL. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important Pseudomonads. In: Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH, editors. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. London: John Wiley & Sons Ltda; 1997. p. 493-517.
101. Pitt TL. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Infect Dis* 1988;7:238-47.
102. Pitt TL. *Pseudomonas, Burkholderia* and related genera. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Microbiology and Microbial infections*. 9th ed. N.York: Topley & Wilson's; 1998. p. 1109-38.
103. Poh CL, Yeo CC, Tay L. Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping to differentiate *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 strains. *Eur J Clin Microbiol* 1992;11:817-22.
104. Poh CL, Yeo CC. Recent advances in typing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect* 1993;24:173-81.
105. Pujana I, Gallego L, Martín G, López F, Canduela J, Cisterna R. Epidemiological analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic bronchiectasis patient without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999;2071-3.
106. Quinn JP. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 1998;27 Suppl 1:S17-24.
107. Römling U, Wingender J, Müller H, Tümmler B. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Env Microbiol* 1994a;60:1734-8.
108. Römling U, Fielder B, Bohammer J, Grothues D, Von der Hardt H, Tümmler B. Epidemiology of chronic *P. aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1994b;170:1616-21.
109. Römling U, Tümmler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000;38:464-5.

110. Ryan BM, Dougherty TJ, Beaulieu D, Chang J, Dougherty BA, Barrett JF. Efflux in bacteria: what do we really know about it? *Expert Opin Invest Drugs* 2001;10:1409-22.
111. Sader HS, Cerbara EF, Luz D, Hashimoto A. Evaluation of the cephalosporins, cefepime, cefpirome and ceftazidime, against clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Infect Dis* 1999c;3:231-7.
112. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 2001;5:200-14.
113. Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med* 1995;15:407-31.
114. Sader HS, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Gales AC, Winokur PL, Kugler KC. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in Latin America, 1997: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 1999a;3:97-110.
115. Sader HS, Pignatari AC, Leme IL, Burattini MN, Tancredi R, Hollis RJ, Jones RN. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:13-8.
116. Sader HS, Sampaio JLM, Zoccoli C, Jones, RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in three Brazilian medical centers. *Braz J Infect Dis* 1999b;3:63-79.
117. Saiman L, Mehar F, Niu WW, Neu HC, Miller G, Prince A. Antibiotic susceptibility of multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis, including candidates for transplantation. *Clin Infect Dis* 1996;23:532-7.
118. Samarrai TH, Zhang N, Lamont IL, Martin L, Kolbe J, Wilsher M, Morris AJ, Schmid J. Simple and inexpensive but highly discriminatory method for computer-assisted DNA fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4445-52.

119. Schreckenberger PC. Practical approach to the identification of glucose nonfermenting Gram-negative bacilli - a guide to identification. Denver: CACMLE; 1996.
120. Silbert S, Barth AL, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2001;39:3976-81.
121. Slama KB, Boudabous A, Skande G, Cherif A, Chedlya F, Boelenst H, Maaskant J, Verbrugh H, vanBelkum A. Heterogeneity among infecting strains of *Pseudomonas aeruginosa* in diverse departments of a large Tunisian hospital. J Hosp Infect 2001;47:325-7.
122. Speciale A, Musumeci R, Blandino G, Caccamo F, Siracusa V, Renis M. Molecular mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. Int J Antimicrob Agents 2000;14:151-6.
123. Speert DP, Putterman M, Govan J, Doherty C, Hoiby N, Ojeniyi B, Ogle J, Johnson Z, Paranchych W, Sastry P, Pitt T, Lawrance L. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1994;169:134-42.
124. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhie HT. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. J Clin Microbiol 1999;37:3654-61.
125. Stoodley BJ, Thom BT. Observations on the intestinal carriage of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 1970;3:367-75.
126. Struelens MJ, Schwan V, Deplano A, Baran D. Genome macro restriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 1993;31:2320-6.
127. Stull TL, Lipluma JJ, Edling TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988;157:280-6.
128. Stunt RA, Thomson CJ, Payne DJ, Amyes SGB. A study of the mechanisms involved in imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Japan. JAC 1998;42:272-3.
129. Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AM, Fock C, Legakis NJ. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. J Clin Microbiol 1998;36:879-901.

141. Vurma-Rapp U, Kayser FH, Hadorn K, Wiederkehr F. Mechanism of imipenem resistance acquired by three *Pseudomonas aeruginosa* strains during imipenem therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:580-7.
142. Walsh TR, Bolmtöm A, Qwörnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;27:55-9.
143. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-51.
144. Weber, DA, Sanders, CC. Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class 1 enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:156-9.
145. Widmer AF, Wenzel RP, Trilla A, Bale MJ, Jones RN, Doebbeling BN. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker. *Clin Infect Dis* 1993;16:372-6.
146. Williams T. Evaluation of antimicrobial sensitivity patterns as markers of *P. aeruginosa* cross-infection at a cystic fibrosis clinic. *Br J Biomed Sci* 1997;54:181-5.
147. Zihra-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:287-91.

OBRAS CONSULTADAS

Aurélio BHF. Dicionário Aurélio Eletrônico Século XXI. Nova Fronteira ed. 1999.

American College of Physicians. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. 2002. <http://www.acponline.org>.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Informações e documentação-Referências e elaboração (NBR 6023). 2000. 22p.

BIREME. Normas para apresentação de Dissertações e Teses. Herani MLG. 1990. São Paulo. 46p.

**Antibiotic Resistance and Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*:
Focus on Imipenem**

Ana Lúcia Peixoto de Freitas and Afonso Luis Barth

Federal University of Rio Grande do Sul, Pharmacy School, Clinical Hospital of Porto Alegre, Cardiology Institute, Porto Alegre, RS; Catholic University of Pelotas, Pharmacy School, Pelotas, RS, Brazil

The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2002;6(1):1-7
© 2002 by The Brazilian Journal of Infectious Diseases and
Contexto Publishing. All rights reserved.
1413-8670

Received on 25 July 2001; revised 15 February 2002.

Address for correspondence: Dr. Ana Lúcia P. de Freitas,
Barros Cassal, 666/806. Zip code: 90035-030, Porto Alegre -
RS - Brazil. Phone: (051) 3311-5460. E-mail: usha@via-rs.net.

* This study was sponsored by "Fundo de Incentivo à
Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre"
and "Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul".

SUMMARY

Susceptibility testes by disk diffusion and by E-test and molecular typing by macrorestriction analysis were performed to determine the relatedness of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from three distinct hospitals. The resistance profile of 124 isolates to 8 antimicrobial agents was determined in three distinct hospitals, in Porto Alegre, Brazil. Rates of susceptibility ranged from 43.9% for carbenicillin to 87.7% for ceftazidime. Cross-resistance data of imipenem-resistant isolates indicated that the majority (70%) were also resistant to carbenicillin although 70% remained susceptible to ceftazidime and cefepime. In general, susceptibility profiles were not able to determine relatedness among isolates of *P. aeruginosa*. On the other hand, molecular typing by macrorestriction analysis demonstrated high discriminatory power and identified 66 strains among 72 isolates of *P. aeruginosa*. Imipenem-susceptible isolates were all different. However, for imipenem-resistant isolates, it was possible to observe common clones within two hospitals, despite their variety of response to other antibiotics. No clustering of infection between different medical center was observed. In conclusion, there is no spread of clones of *P. aeruginosa* among different hospitals in our city despite the occasional presence of related isolates of *P. aeruginosa* imipenem-resistant.

INTRODUCTION

Despite improvements in antibiotic therapy, *Pseudomonas aeruginosa* remains as one of the most prominent Gram-negative bacteria causing hospital-associated infections. *P. aeruginosa* is intrinsically resistant to a number of antimicrobial agents, and frequently displays resistance to multiple classes of antimicrobial agents [1]. Carbapenems are potent agents for the treatment of infections due to multiresistant pseudomonads. However, nosocomial isolates may easily develop resistance to carbapenems due to reduced uptake of the drug, which leads to outbreaks of multiresistant/carbapenems-resistant strains [2,3,4]. It is of importance, therefore, to perform surveillance programs to establish the epidemiological situation of *P. aeruginosa* in different hospitals [5].

Outbreaks caused by multiresistant *P. aeruginosa* have been reported in various nosocomial settings, such as in individual intensive care units (ICU) or several units within a hospital. These outbreaks can be of short length or can persist for an extended period of time with the same strains being identified over one year period [4, 6, 3, 7, 8].

Typing techniques that establish clonal relationship between individual isolates in the hospital settings are warranted in order to recognize nosocomial transmission and hence to guide infection control practice. DNA-based techniques, such as macrorestriction analysis by pulsed field gel electrophoresis, have been successfully applied to the epidemiological study of *P. aeruginosa* [9].

In the present report, *P. aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Porto Alegre, Brazil, were analyzed to determine their susceptibility rates and epidemiological relatedness.

MATERIALS AND METHODS

A total of 124 nonreplicate *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates were recovered from patients from 3 hospitals (HCPA, ISCM, and HSL), in Porto Alegre, Brazil, between September 1998 and June 1999.

Overall, 54% of the isolates were obtained from the respiratory tract, 28% from urine, 6.5% from blood and 11.5% from a variety of other sources (catheters, abdominal secretions, skin).

Identification was based upon production of characteristic pigments (blue or green). Additional biochemical tests used to identify *P. aeruginosa* included: oxidase, oxidation of glucose on OF-medium, arginine and nitrate and growth in cefrimide agar [1]. Isolates were checked for purity by plating on MacConkey agar before the susceptibility tests and typing.

The susceptibility tests were performed by agar disk diffusion method according to NCCLS guidelines [10]. The following antimicrobials were tested: amikacin, aztreonam, carbenicillin, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, imipenem and ticarcillin (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville). The resistant rates used in this study refer to both intermediate and resistant results. According to the susceptibility patterns the isolates were classified into antibiotypes, designated by small letters. Isolates that had equal response to all antimicrobial agents were considered to belong to the same antibiotype, while a single difference to any of the tested antimicrobials determine a distinct profile.

In order to avoid false resistance to Imipenem due to drug degradation during storage [11], resistant isolates by the disk diffusion method were confirmed by the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden).

Macrorestriction analysis followed by PFGE was performed as described previously [12]. Briefly, the bacteria was embedded in agarose blocks, digested with restriction endonuclease *SpeI* (Gibco BRL, USA) and electrophoresed in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Richmond, USA). The gels were run at 14° C, 5,9 V cm⁻¹, for 22 hours, with switch time of 5 to 50 s. Lambda ladder (48.5 Kb, Sigma, USA) was used as molecular weight marker. The gels were stained with ethidium bromide and the image was acquired on a transilluminator Chemilmager 4000 (Alpha Inntech Corporation). Comparison of macrorestriction profiles was performed by visual analysis.

Isolates were considered to be part of a major clone whether they had identical profile of macrorestriction (PFGE). They were considered related (subtypes) whether there was 1 to 6 fragments (bands) differences between profiles. Isolates with more than 6 different fragments were considered distinct or not related strains [13]. Each major clone was coded with a capital letter and a number was added to each subtype.

RESULTS AND DISCUSSION

It was possible to evaluate 124 *P. aeruginosa* isolates and the susceptibility range varied from 43.9% for carbenicillin to 87.7% for ceftazidime. Cefepime, ceftazidime and imipenem proved to be active against the majority of *P. aeruginosa* clinical isolates (> 80% of susceptibility).

The rates of resistance of *P. aeruginosa* to amikacin, aztreonam, ciprofloxacin, ceftazidime and cefepime were similar to those described for isolates from Brazil [14, 15, 16] and other countries [4, 5, 17, 18, 19, 20]. However, in this study ticarcillin and carbenicillin displayed less activity when compared with the majority of other surveillance studies. Although many reports suggest increasing multiresistance in *P.*

aeruginosa [2, 3, 4, 8], only four isolates (3.2%) were resistant to all tested antimicrobials which contrasts to 37% of susceptibility to all agents.

We found 20 strains to be resistant to imipenem, most of them with MIC \geq 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In fact, only one of these isolates displayed MIC = 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was also considered resistant according to NCCLS [10]. We found, therefore, 100% of correlation between disk diffusion and E-test for all imipenem resistant isolates as also described by BURNS and cols. [21].

The rate of susceptibility to imipenem (83,7%) was similar to those described in the SENTRY antimicrobial surveillance program in Brazil and Latin America [14, 15]. However, a study of 26 Brazilian isolates of *P. aeruginosa* indicated susceptibility rates to imipenem below 70% [20]. Data from other countries indicate susceptibility to imipenem ranging from 79% [4] to 95% [20].

Cross-resistance data are useful to indicate alternative drugs to treatment. In our study, ceftazidime was the most active antimicrobial agent, and less than 50% of the ceftazidime-resistant isolates were also resistant to imipenem or cefepime (table 1). Only 30% of the isolates resistant to imipenem were also resistant to cephalosporins, which indicates that ceftazidime and cefepime may be therapeutical options for the treatment of infections due to imipenem-resistant *P. aeruginosa*.

Bouza and cols. [5] provided cross-resistance data of *P. aeruginosa* isolated in Spain. Comparing to our results, Spanish imipenem-resistant isolates displayed similar cross-resistant rates to most of all other agents. Conversely, imipenem-resistant *P. aeruginosa* of our study were more resistant to ticarcillin and amikacin. However, it must be emphasized that the percentage of individual resistance to ticarcillin and amikacin agents was already higher in our population in comparison to the Spanish isolates. Among ceftazidime-resistant isolates Bouza and cols. [5] described 80% of

resistance to cefepime, while we found only 47% (table 1). This may be of importance as the individual resistance to each agent was very similar in both studies.

The high incidence of cross-resistance among antibiotics of different classes observed in our study may indicate that many isolates probably display resistance due to a combination of multiple unrelated resistance mechanisms.

It was possible to type by macrorestriction analysis 72 isolates (including those resistant to imipenem, ceftazidime or cefepime) and as result we found 66 distinct strains. We were able to observe that there were no common clones among any susceptibility pattern, unless they were also resistant to imipenem.

On the other hand, several imipenem-resistant isolates were indistinguishable by macrorestriction analysis despite their susceptibility to other antimicrobials. The 20 imipenem-resistant isolates (9 from ISCM, 7 from HSL and 4 from HCPA) displayed 12 DNA major types (table 2).

We were able to identify 5 major types of *P. aeruginosa* imipenem-resistant in ISCM. Two isolates belonged to type A and were recovered within a period of 4 days, from patients hospitalized in different units. Their profiles of susceptibility were very similar, differing only by resistance to aztreonam. The type B included 3 urine isolates, with the same susceptibility profile, but recovered within a longer period of time (18 days). The isolates from type C were obtained in a two days period and displayed similar susceptibility profile, but were isolated from patients hospitalized in different units. The remaining 2 isolates from ISCM belonged to distinct molecular types. Although they were recovered in the same day, there was no epidemiological correlation between the patients (table 2). Although laboratory data indicated occurrence of common clones of *P. aeruginosa* in ISCM, thus suggesting patient-to-patient transmission, epidemiological data do not corroborate it, since patients were

admitted in distinct units and the isolates were obtained in different periods of time. It can be considered that these isolates may have some characteristic which improved their permanence and dissemination in the hospital environment.

The majority of the isolates from HSL (5 out of 7) belonged to the same genotype (figure 1). These isolates were obtained from the respiratory tract of patients in the same unit during a relatively long period (28 days). Noteworthy, unrelated strains were also obtained during this period of time, including one isolated from a patient in the same unit. Almost all isolates of HSL had distinct susceptibility profiles, regardless their genotype. Since identification of *P. aeruginosa* type D from HSL was restricted to this period it seems that this clone was associated to an outbreak of short length.

Isolates from HCPA were all distinct according to either DNA or susceptibility profiles. It has to be mentioned that two isolates were recovered within a two days period, both from sputum of patients admitted in the same unit.

It is by far well known that macrorestriction analysis is the most powerful tool for the study of epidemiology of *P. aeruginosa* while phenotypic markers can lead to misinterpretation of strain relatedness [9, 22]. In the present study we were able to demonstrate that in some cases both DNA and susceptibility profiles lead to the same conclusion while in others the results were conflicting. For instance, in our study we observed agreement in the case of isolates 21 and 27 which belonged to the same major type (B) and displayed the same antibiotype (table 2).

However, discrepancy was more frequent than agreement between different methods. In most cases, susceptibility patterns were not able to indicate strain identity, as seen for HSL isolates belonging to clone D or ISCM isolates belonging to clone A. Furthermore, the susceptibility pattern has low discriminatory power to establish strain

identity. In our study the antibiotype “a” was found in all hospitals despite absence of epidemiological relation among isolates.

In this study we analyzed isolates from distinct hospitals in the same city, in a relative long period of time. The results of susceptibility to antimicrobials indicated that our resistance rates to antibiotics used against *P. aeruginosa* are lower than the rates described in other studies [2, 3, 4, 8, 20].

On the opposite of studies that described a major clone of resistant *P. aeruginosa* in several hospitals from a country [3, 4, 7], molecular typing of our isolates revealed mainly unique strains. However, concerning to imipenem resistant *P. aeruginosa* we noted a clustering of infections due to the same genotype, suggesting possible transmission inside a hospital, but not between different medical centers.

TABLE 1 - Cross-resistance among *P. aeruginosa* isolates

Drug to which isolates were resistant	N° of resistant strains	% resistance ^a to							
		CAZ	CEF	IMI	AZT	CIP	TIC	AMI	CAR
Ceftazidime	15		47	40	73	47	73	60	87
Cefepime	18	39		33	83	83	100	94	100
Imipenem	20	30	30		45	50	55	45	70
Aztreonam	37	30	41	24		65	81	68	97
Ciprofloxacin	39	18	38	26	62		85	92	97
Ticarcillin	43	26	42	26	70	77		79	100
Amikacin	41	22	41	22	61	88	83		98
Carbenicillin	70	19	26	20	51	54	61	57	

^a nonsusceptible isolates.

CAZ= ceftazidime; CEF= cefepime; IMI= imipenem; AZT= aztreonam; CIP= ciprofloxacin; TIC= ticarcillin; AMI= amikacin; CAR= carbenicillin.

TABLE 2 – Distribution of imipenem resistant *P. aeruginosa* isolates according to macrorestriction (genotype), antimicrobial susceptibility profile (antibiotype) and location of the patient.

Hospital	No isolate	Genotype (<i>SpeI</i>)	Antibiotype	Date of isolation (mo/day/yr)	location (unit)
ISCM	123	A	f	06/09/99	USC
	26	A	g	06/12/99	UTI
	24	B	j	05/29/99	USF
	27	B1	j	06/10/99	UPF
	21	B2	j	06/15/99	USC
	20	C	i	04/06/99	USC
	39	C1	j	04/07/99	UPF
	23	K	a	10/25/98	USF
	15	L	i	10/25/98	USC
HSL	100	D	e	11/10/98	UTI
	101	D	a	11/11/98	UTI
	106	D	h	11/17/98	UTI
	119	D	b	12/02/98	UTI
	120	D	c	12/06/98	UTI
	118	E	a	12/02/98	UTI
	103	F	d	11/13/98	UCL
HCPA	42	H	a	10/24/98	UCL
	62	I	i	01/11/99	UCL
	69	J	f	10/10/98	UTI
	76	G	c	10/08/98	UTI

Antibiotype of imipenem resistant isolates:

a= susceptible to all other agents;

b= resistant only to ceftazidime;

c= resistant only to carbenicillin;

d= resistant a carbenicillin and ciprofloxacin;

e= resistant a carbenicillin e ticarcillin;

f= resistant a ciprofloxacin and amikacin;

g= resistant to aztreonam, ciprofloxacin, amikacin;

h= resistant a ceftazidime, cefepime and carbenicillin;

i= resistant to aztreonam, ciprofloxacin, ticarcillin, amikacin and carbenicillin;

j= resistant to all agents.

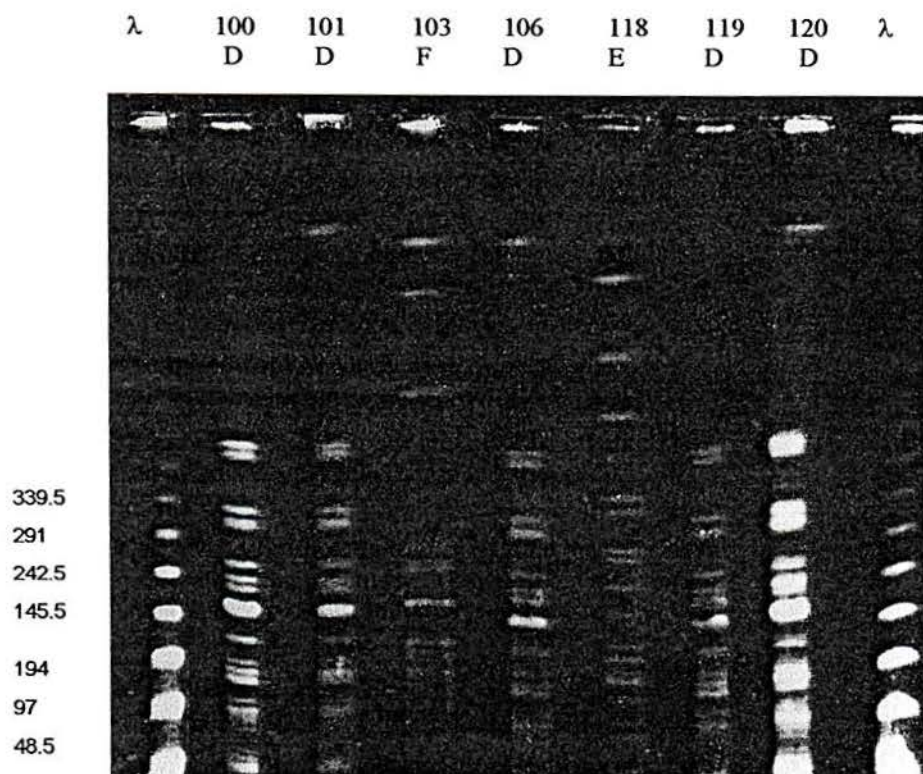


FIGURE 1 – Representative PFGE of selected strains.
 All lanes are from the same gel.
 λ = molecular weight marker. Lanes 1 to 7 correspond to isolates of HSL.

REFERENCES

1. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology 1999. p.517-25.
2. Iaconis PJ, Pitkin DH, Sheikh W, Nadler HL. Comparison of antibacterial activities of meropenem and six other antimicrobial against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from North American studies and clinical trials. *Clin Infect Dis* 1997; 24:191-6.
3. Tsakris A, Pournaras S, Woodsord N, Palepou MI, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1290-92.
4. Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AM, Fock C, Legakis NJ and the Greek *Pseudomonas aeruginosa* study group. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. *J Clin Microbiol* 1998; 36:879-901.
5. Bouza E, Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Diaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:981-82.

6. Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infect* 1998; 39:53-62.
7. Panzig B, Schröder G, Gründing M. A large outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in north-eastern Germany. *JAC* 1999; 43:415-18.
8. Hsueh P, Teng L, Yang P, Chen Y, Ho S, Luh K. persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:1347-51.
9. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner F, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:528-34.
10. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Tests*. Pennsylvania, 1999.
11. Carmeli Y, eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L, deGirolami P, Samore M. failure of quality control measures to prevent reporting false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* *J Clin Microbiol* 1998; 36:595-97.
12. Kaufmann ME Pulsed-field gel electrophoresis. In: Wodford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology. Protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press Inc. 1998. p.33-50.
13. Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.
14. Sader HS, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Gales AC, Winokur PL, Kugler KC and the SENTRY Latin America Study Group. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in Latin America, 1997: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program *BJID* 1999; 3: 97-110.
15. Sader HS, Sampaio JLM, Zoccoli C, Jones, RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in three Brazilian medical centers *BJID* 1999; 3:63-79.
16. Sader HS, Cerbara EF, Luz D, Hashimoto A. Evaluation of the cephalosporins, cefepime, ceftazidime and ceftazidime, against clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* *BJID* 1999; 3:231-37.
17. Blondeau JM, Suter ME, Borsos S, Misfeld C. Canadian *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility study from 48 medical centers. *J Antimicrob Agents* 1998; 10:297-302.
18. Bonfiglio G, Carciotto, V, Russo G, Stefani S, Schito GC, Debbia E, Nicoletti G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey. *J Antimicrob Agents* 1998; 41:307-10.
19. Bonfiglio G, Marchetti F. In vitro activity of ceftazidime, cefepime and imipenem on 1005 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates either susceptible or resistant to beta-lactams *Chemother* 2000; 46:229-34.
20. Jones RN, Pfaller MA, Marshall AS, Hollis RJ, Wilkw WW. Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: occurrence of resistance, molecular epidemiology and screening for metallo-enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29:187-92.
21. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshall S, Jones RN. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1818-22.
22. Grothues D, Koopmann U, Hardt H, Tümmler B. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1973-1977.

Prezada Dra. Ana Lúcia Freitas,

Recebemos e agradecemos seu e-mail encaminhando o manuscrito "Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: critical analysis of susceptibility and biochemical profiles compared to genotype". Daremos prosseguimento ao processo e informamos que o trabalho receberá um número de referência que será devidamente informado a V.Sa.

Atenciosamente,

Dalva Pizeta

Editora Executiva

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil

fax: 55+16+633-3825

e-mail: bjournal@fmrp.usp.br

Versão On Line - <http://www.scielo.br/bjmb>

Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: critical analysis of susceptibility and biochemical profiles compared to genotype.

Freitas, AL¹ and Barth, AL²

1. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Escola de Farmácia - Universidade Católica de Pelotas.

2. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Unidade de Pesquisa Biomédica – Serviço de Patologia Clínica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

* corresponding author

Barros Cassal, 666/806 CEP 90035-030 - Porto Alegre - RS - Brazil.

Fone: (051) 33115460 Fax (51) 33168310 E-mail: usha@via-rs.net

Running title

Typing *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, typing, genotyping, phenotypic markers.

ABSTRACT

Typing techniques are essential to understand hospital epidemiology, allowing to elucidate the source of infection and routes of bacterial transmission. Although DNA-based techniques are considered as the gold standard to the epidemiological study of *P. aeruginosa*, antibiotic profiles and biochemical results are used as typing methods because they are easy to perform and to interpret. Antibiotypes (susceptibility profiles) and biotypes (biochemical profiles) were compared to genotypes established by macrorestriction analysis in 124 clinical isolates of *P. aeruginosa* from 3 hospital in Porto Alegre, Brazil. Epidemiological relation among patients was also estimated. Susceptibility and macrorestriction profiles were discrepant in the majority of cases, and many antibiotypes were observed among isolates from the same genotype. Furthermore, susceptibility profiles, were enable to distinguish isolates from unrelated genotypes. As a great number of isolates displayed the same biochemical results, only a small number of biotypes were detected, conferring to this method low discriminatory power as a typing method. Epidemiological data did not provide conclusive data about relation of *P. aeruginosa* isolates. In conclusion, this work indicated that the only method capable to establish clonal relation is molecular typing, and that other methods can lead to misleading interpretation, inadequate to guide proper infection control measures.

INTRODUCTION

Despite the advances in hospital care and the introduction of a wide variety of antimicrobial agents, *Pseudomonas aeruginosa* continue to be a common cause of nosocomial infections. The epidemiology of infections caused by this organism must be periodically reviewed in order to allow appropriate control measures.

Typing techniques are essential to establish clonal relationship between individual isolates in the hospital settings, allowing to recognize outbreaks and to elucidate the source of infection (1). Although DNA-based techniques have been successfully applied to the epidemiological study of *P. aeruginosa* (2,3,4), these procedure are time consuming, expensive and require specific equipment (5,6). On the other hand, results of antibiotic susceptibility and biochemical tests are usually used as typing method because they are performed routinely by clinical laboratories.

Although susceptibility tests provide profiles that are used in infection control, these kind of data are unable to confirm clusters of nosocomial cross-infection or distinguish unrelated infections in the majority of cases (5,7,8,9), specially when analyzing multi resistant strains (6,10). However, quantitative analysis of antibiogram, comparing disk zone sizes, were considered useful for nosocomial infection control in a few cases (11).

Results of biochemical tests in combination with production of pigment and hemolysis allows the determination of distinct biotypes. *P. aeruginosa* display uniform response to some biochemical tests which are used for identification purposes. However, the variability of response to other tests can provide different profiles (biotype), useful to distinguish clinical isolates. The carbohydrates used for typing include galactose, mannose, mannitol and rhamnose, with utilization rates from 22 to 81 % (12). *P. aeruginosa* metabolize carbohydrates by the

oxidative pathway, and require special culture medium to be detected. Degradation of carbohydrates is evaluated by the oxidative-fermentative (OF) medium. However, the small production of acid by oxidation can be neutralized by alkali released from the breakdown of peptone, misleading the detection of sugar utilization. Therefore, utilization may be better demonstrated in the ammonium salt medium (ASS), mainly due to the lack of peptone in the medium (13). Hydrolysis of urea which is positive for 43% of *P. aeruginosa* strains and hemolysis on blood agar, present in about half of the clinical isolates are other useful biochemical test (13). Most strains of *P. aeruginosa* produce pyocyanin and fluorescein which gives the characteristic blue-green color of colonies on agar cultures. A few number of *P. aeruginosa* can produce colonies with distinct color, due to other pigments, or even non-pigmented colonies (14).

In the present report, 124 clinical isolates of *P. aeruginosa* from hospitalized patients, were evaluated to determine epidemiological relatedness, using two phenotypic methods (antibiotic susceptibility and biochemical patterns), molecular analysis (macrorestriction analysis of DNA followed by pulsed-field gel electrophoresis) and epidemiological information (date and place of isolation).

MATERIALS AND METHODS

Pseudomonas aeruginosa clinical isolates recovered from distinct non-cystic fibrosis hospitalized patients of 3 hospitals in Porto Alegre, Brazil were analyzed in this study.

Identification of *P. aeruginosa* was based upon production of pigment, oxidase, glucose, arginine, nitrate and growth on cefrimide agar (12).

The susceptibility tests were performed by the agar disk diffusion method according to NCCLS guidelines (15). To represent the different classes of antimicrobial agents commonly

used for the treatment of *P. aeruginosa* it was used amikacin, aztreonam, carbenicillin, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem and ticarcillin-clavulanic acid (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville). Differences between the results from susceptibility to resistant and from resistant to susceptibility with at least one of the agents characterized a different antibiotype, represented by a small letter. Differences in the results from susceptible to intermediate, or the contrary, characterized a subtype, and an arabic number was added to the antibiotype letter.

Biotyping was performed by observation of hemolysis after growth for 24 h, under transmitted light. Hemolytic isolates were divided in two groups accordingly to observation of alpha or beta hemolysis. Production of pigment was determined in Mueller-Hinton medium incubated for 24 h/35°C, and pigmented colonies were classified according to their color.

Initially, the utilization of glucose was assessed on OF medium (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville), using two tubes: one of them overlaid with paraffin oil. Carbohydrate degradation was performed using one tube of OF and one of ASS (ammonium salt sugar) added of 1% of galactose, mannose, mannitol or rhamnose. The tubes were incubated up to 4 days before the negative results be considered. Urea hydrolysis was performed by the Christensen's method (12). Each group of identical results for pigment, hemolysis, urea hydrolysis and carbohydrate utilization was considered as a biotype and coded with a number.

Epidemiological relation was estimated by geographic and temporal links among patients of each hospital. Patients were considered related whether they were treated at the same unit and isolation of *P. aeruginosa* was made within a five days period. A relation number (R) was given to each group of related patients.

Macrorestriction analysis of DNA followed by pulsed field gel electrophoresis was performed as described previously (16). Briefly, the bacteria was embedded in agarose blocks and digested with restriction endonuclease *SpeI* (Gibco BRL, USA). Electrophoresis were done in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Richmond, USA), at 14° C, 5,9 V cm⁻¹, for 22 hours, with switch time of 5 to 50 s. Lambda ladder (48.5 Kb, Sigma, USA) was used as molecular weight marker. The gels were stained with ethidium bromide and the image was acquired on a transiluminator Chemilmager 4000 (Alpha Inntech Corporation). Comparison of macrorestriction profiles was performed by visual analysis and criteria of Tenover et al (17) were used to establish the relationship among the isolates. Each major clone was coded with a capital letter and a number was added to each subtype.

Macrorestriction analysis was considered the gold standard for comparisons (2,3).

RESULTS

We analyzed 124 clinical isolates obtained from hospitalized patients in 3 different hospitals, between September of 1998 and may of 1999. Overall, 54% of the isolates were obtained from the respiratory tract, 28% from urine, 6.5% from blood and 11.5% from a variety of other sources (catheters, abdominal secretions, skin).

The susceptibility results allowed to establish 26 major antibiotypes, 7 of them including subtypes, while profiles unique to the isolate were observed in 15 cases. A total of 46 (37.1%) isolates were susceptible to all tested agents, but only 3 were multiresistant (table 1).

Table 1

Production of pigment was observed in 122 of 124 isolates, the majority (86.3%) displayed the characteristic green color. All isolates were hemolytic and most of them demonstrated β hemolysis (95.2%). Carbohydrate utilization presents the same results for both OF and ASS media, although the time needed for positive results were not always the same.

Most isolates were positive for galactose (99%), and only a small number metabolized rhamnose (0.8%). The results of these tests provided 11 distinct biotypes. Isolates which used urea, galactose, mannose and mannitol and displayed green pigment and β hemolysis belonged to the more frequently biotype (70% of the cases).

Epidemiological analysis provided 14 groups that included a variable number of patients. Only 3 of these groups (R9, R12, R14) displayed the same antibiotype (table 2), however, the same biotype was observed in isolates from patients of 8 groups.

Table 2

A total of 81 isolates of *P. aeruginosa* were submitted to molecular typing and it was possible to observe 71 different DNA profiles (genotypes) among them. Autodegradation of DNA rendered one isolate untypeable even after repeated testing. Five genotypes were detected in more than one isolate, and the genotype D was observed in 5 isolates (table 3).

Table 3

The combination of antibiotype "a" and biotype 1 was the more frequent situation and occurred among 31 isolates. Genotypic data of related patients indicated that 3 out of 9 isolates from the major group (R1) belonged to the same genotype (D). However, this profile was also observed in two other not related isolates. The antibiotype and the biotype of the isolates from this clone were able to detect their relation (table 3). Multiresistant isolates from clone B displayed the same profile in all methods used, and two of them had epidemiological relation.

DISCUSSION

In this study, macrorestriction analysis (molecular typing) demonstrated that the majority of *P. aeruginosa* isolates belonged to distinct genotypes, confirming that this method had the higher discriminatory power compared to the phenotypic methods (antibiotyping and biotyping).

The susceptibility typing classified many isolates as the antibiotype "a" (fully susceptible to antibiotics), however, all of them displayed distinct DNA macrorestriction profiles. In fact,

antibiotype “b” (multiresistant to antibiotics) was the only group which included isolates belonging to the same genotype. This may be due to the difference between the number of isolates classified in these groups, only 3 isolates among antibiotype “b” and 46 isolates among antibiotype “a” and therefore it would be more likely to find a higher variability of genotypes among the latter antibiotype.

Despite the fact that isolates with unique susceptibility profiles displayed distinct genotypes, the difference in antibiotype may not guarantee clonal distinction, as many isolates of the same genotype displayed distinct susceptibility profiles, revealing the inadequacy of this method for typing purposes, as previously described (1,5,9).

The inadequacy of antibiotype to confirm clonal relation among multiresistant isolates has been described (6,10), however, we found antibiotyping useful, as all multiresistant isolates of this study were included in the same genotype. The low prevalence of the multiresistant *P. aeruginosa* observed in our study (2,4%) may be the factor responsible for the clonal identity of isolates. Although other rare susceptibility profiles (1 to 3 isolates) were not satisfactory for typing purposes, multiresistance, appeared to provide a clue for clonal relation of the isolates.

The low discriminatory power of susceptibility tests is not surprising since the power of a method is determined by the number of types defined by the method and the relative frequencies of these types (18). Although we obtained a satisfactory number of groups (26 major groups), the heterogeneous distribution of the isolates in the groups (37% in the same antibiotype) conferred poor discriminatory power to this method.

According to Kiska et al. (12), the rates of utilization of galactose, mannose, mannitol and rhamnose by *P. aeruginosa* are 81%, 79%, 68% e 22% respectively, indicating that these tests may be useful to distinguish among clinical isolates. However, in this study, we observed a more

homogeneous utilization of carbohydrates, and due to this results, the majority of *P. aeruginosa* isolates were classified in the same group, conferring the poor discriminatory power of biotyping.

Phenotypic methods were used to screen isolates which may further be typed by a more discriminatory test (7,11,19,20), but in this study, we found biotype and antibiotype unsatisfactory for screening or typing. The combination of both methods was also insufficient to establish distinction among isolates from different genotypes. In fact, failure to obtain good quality data using phenotypic methods was already mentioned (1,5,6,9,10,20).

The isolation of the same bacteria from patients in the same unit may aid to detect an outbreak (21). However, data from our and other studies (22,23) indicated that epidemiological relation among patients is not adequate to establish cross transmission or outbreaks, as no clonal relation may be observed among *P. aeruginosa* from this patients. We also observed that isolates from the same genotype may be isolated from non-related patients, and this can be explained by the environmental contribution as source of infection (24).

Although DNA macrorestriction is the gold standard for *P. aeruginosa* typing, the time for determination sometimes induce the use of epidemiological and phenotypic data, mainly susceptibility profiles, to indicate a possible outbreak. The present study has shown that utilization of these data cannot be accepted as presumption of relatedness or distinction among *P. aeruginosa* isolates, confirming that only genotypic typing is able to establish the clonal relation.

REFERENCES

1. Corona ALN, Miranda MGN, Leanos BM, Portilo LG, Hernandez AC, Anthon JR & Aguilar SB (2001). Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Archives of Medical Research*, 32(3):238-42.
2. Struelens MJ, Schwan V, Deplano A & Baran D (1993). Genome macro restriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2320-6.
3. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner F & Pitt TL (1995). Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*; 33:528-34.
4. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE & Tjhie HT (1999). Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*; 37 (11):3654-61.
5. Williams T (1997). Evaluation of antimicrobial sensitivity patterns as markers of *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection at cystic fibrosis clinic. *British Journal of Biomedical Science*, 54:181-5.
6. Rodriguez B, Vasquez E, Sussmann O, Mattar S & Jaramillo CA (2000). Antimicrobial susceptibility and serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Bogota, Colombia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 19:152-4.
7. Bergmans D, Bonten M, van Tiel F, Gaillard C, London N, van der Geest S, Leeuw P & Stobberingh E (1997). Value of phenotyping methods as an initial screening of *Pseudomonas aeruginosa* in epidemiologic studies. *Infection*, 25:350-4.

17. Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D & Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:2233-9.
18. Hunter PR & Gaston MM (1989). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26:2465-6.
19. Renders N, van Belkum A, Barth A, Goessens W, Mouton J & Verbrugh H (1996). Typing *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: phenotyping versus genotyping. *Clinical Microbiology and Infection*, 1:261-5.
20. Kinoshita M, Sawabe E & Okamura N (1997). Concept of segmentation in nosocomial epidemiology: epidemiological relation among antimicrobial-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection*, 35:269-76.
21. Bennett JV & Brachman PS (1992). *Hospital infections*. 3rd ed. Little Brown and Company. 982p.
22. Verweij PE, Bijl D, Melchers WJ, Pauw BE, Meis JF, Hoogkamp JA & Voss A (1997). Pseudo-outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a hematology unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18:128-31.
23. Slama KB, Boudabous A, Skande G, Cherif A, Chedlya F, Boelenst H, Maaskant J, Verbrugh H & Belkum A (2001). Heterogeneity among infecting strains of *P. aeruginosa* in diverse departments of a large Tunisian hospital. *Journal of Hospital Infection*, 47:325-7.

24. Griffith SJ, Nathan C, Selander RK, Chamberlin W, Gordon S, Kabins S & Weinstein R (1989). The epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in oncology patients in a general hospital. *Journal of Infectious Disease*, 160:1030-6.

Table 1: Major antibiotypes observed in *P. aeruginosa* clinical isolates.

Antibiotype	n	%	Am/At/Cr/Cz/C/I/T	Biotypes	Genotypes	Epi group
a	46	37,1	S/S/S/S/S/S/S		uniques	
b	3	2,4	R/R/R/R/R/R	1	B	R12 No relation
c*	20	16,1	R/S/R/S/R/S/R			
d*	12	9,7	S/S/I/S/S/S/S			
e*	10	8,1	S/S/R/S/S/S/S			
f*	7	5,6	S/I/R/S/S/S/R			
g	3	2,4	R/S/R/S/R/S/S			
h*	2	1,6	I/S/R/S/R/S/R			
j*	2	1,6	R/I/R/S/R/R/R			
k	2	1,6	R/I/R/S/R/R/R			
m*	2	1,6	S/I/R/S/S/R/S			

Am = amikacin, At = aztreonam, Cr = carbenicillin, Cz = ceftazidime, C = ciprofloxacin, I = imipenem, T = ticarcillin/clavulanic acid.

* antibiotypes that comprise subtypes.

Table 2: Characteristics of *P. aeruginosa* isolates from patients with epidemiological relation.

Epidemiological relation	Number of isolates	Number of antibiotypes*	Number of biotypes*
R1	9	7	5
R2	4	3	2
R3	4	3	1
R4	4	4	4
R5	3	3	2
R6	3	3	1
R7	3	3	1
R8	3	1	1
R9	2	2	1
R10	2	2	1
R11	2	2	1
R12	2	1	1
R13	2	2	1
R14	2	1	1

* Number of distinct profiles observed in the group.

Table 3: Characteristics of *P. aeruginosa* with DNA macrorestriction profiles observed in more than one isolate

Genotype	Antibiotype	Biotype	Epidemiological Relation
A	m	1	no relation
A	p*	1	no relation
C	k	1	no relation
C1	r*	1	no relation
D	s*	6	R1
D	d1	9	R1
D	f1	1	R1
D	t*	7	R4
D	m1	5	R4
E	q*	1	no relation
E	c1	1	no relation

* = antibiotypes unique to the isolate.

Versão em português do artigo: Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: critical analysis of susceptibility and biochemical profiles compared to genotype.

Tipagem de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes hospitalizados: análise crítica dos perfis bioquímicos e de susceptibilidade comparados ao genótipo.

RESUMO

A tipagem bacteriana é fundamental para o conhecimento da epidemiologia hospitalar, permitindo avaliar a origem de isolados clínicos e o modo de transmissão de infecções. Ainda que tipagem molecular seja o padrão ouro para o estudo de *Pseudomonas aeruginosa*, o perfil de susceptibilidade a antibióticos e o padrão bioquímico são procedimentos utilizados como métodos de tipagem, principalmente devido a rapidez de resultados e facilidade de realização. Antibiotipos (perfil de susceptibilidade) e biótipos (perfil bioquímico) foram comparados com o genótipo estabelecido por macrorestrição do DNA em 124 isolados clínicos de *P. aeruginosa* de 3 hospitais de Porto Alegre, Brasil. Dados epidemiológicos dos pacientes foram utilizados para estabelecer grupos relacionados. Na maioria dos casos, os perfis de susceptibilidade e de macrorestrição foram discrepantes, tendo sido observados vários antibiotipos em um mesmo genótipo. Além disso, tipagem por perfil de susceptibilidade, em muitos casos, não foi capaz de distinguir isolados com diferentes genótipos. Uma vez que a maioria dos isolados respondeu de modo semelhante aos testes bioquímicos, a variedade de biótipos obtida foi pequena, o que conferiu a este método baixo poder discriminatório como método de tipagem. Dados epidemiológicos dos pacientes também não foram capazes de indicar de modo conclusivo se os isolados de *P. aeruginosa* tinham ou não a mesma origem. Os resultados deste estudo mostraram que tipagem molecular é o único método capaz de estabelecer relação clonal, e que dados fornecidos por outros métodos podem levar a interpretações equivocadas, impróprias para guiar medidas de controle de infecção.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços dos procedimentos hospitalares e da introdução de novos agentes antimicrobianos, *Pseudomonas aeruginosa* continua sendo uma causa freqüente de infecções hospitalares. A epidemiologia destas infecções deve ser constantemente monitorada para permitir implantação de medidas de controle adequadas.

Tipagem bacteriana é fundamental para estabelecer relação clonal entre isolados de pacientes hospitalares e permitir a identificação de surtos e determinação da fonte da infecção (1). Técnicas moleculares tem sido aplicadas com sucesso no estudo da epidemiologia de *P. aeruginosa* (2,3,4), mas estas técnicas tem custo elevado, requerem tempo e equipamento especializado (5,6). Por outro lado, os resultados de testes bioquímicos e de susceptibilidade estão disponíveis rapidamente porque são realizados em laboratório de rotina.

Resultados do antibiograma fornecem perfis de susceptibilidade que são utilizados para controle de infecção. Estes dados poder ter utilidade em alguns casos, mas, na maioria das vezes, são incapazes de confirmar clones de infecção cruzada ou distinguir infecções não relacionadas (5,7,8,9), principalmente quando se trata de cepas multiresistentes (6,10). Análise quantitativa do antibiograma, comparando os tamanhos das zonas de inibição pode ser útil em alguns casos (11).

P. aeruginosa tem resposta uniforme para alguns testes bioquímicos que são utilizados para sua identificação. No entanto, a variabilidade de respostas a outros permite estabelecer diferentes perfis (biótipo) e auxiliar na distinção de isolados clínicos. Alguns dos carboidratos que podem ser úteis com propósito de tipagem incluem a galactose, manose, manitol e ramnose, cujas taxas de utilização por *P. aeruginosa* variam entre 22 e 81 % (12). Como a bactéria só é capaz de utilizar carboidratos pela via oxidativa, são utilizados meios de cultura especiais. O meio mais utilizado é o meio de oxidação-fermentação (OF), contudo, a pequena produção de

ácido pela oxidação do carboidrato pode ser neutralizada pelos álcalis gerados pela quebra da peptona, confundindo os resultados. Assim, foi postulado que testes de utilização de carboidratos fornecem melhores resultados em meio de ASS (ammonium salt sugar), principalmente devido a inexistência de peptona no meio (13).

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* isolada de materiais clínicos elabora os pigmentos piocianina e fluoresceína que conferem coloração verde característica às colônias. No entanto, algumas amostras podem produzir colônias com coloração distinta, devido a outros pigmentos, ou mesmo colônias não pigmentadas (14).

Outras provas úteis para distinguir isolados clínicos são a degradação da uréia que ocorre em 43% das cepas, bem como a hemólise que é evidenciada em meio de agar sangue em cerca de metade dos isolados clínicos (12).

Resultados de testes de utilização de carboidratos e uréia, juntamente com produção de pigmento e hemólise permite a determinação de biótipos.

No presente estudo, 124 isolados clínicos *P. aeruginosa*, obtidos de pacientes hospitalizados, foram analisados para determinar sua relação epidemiológica através de dois métodos fenotípicos (antibiotipo e biótipo) e de método molecular (macrorestrição do DNA). Dados epidemiológicos dos pacientes (data e local de internação) também foram avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes em 3 hospitais de Porto Alegre, Brasil. Não foram incluídas bactérias isoladas de pacientes com fibrose cística.

P. aeruginosa foi caracterizada através da produção de pigmento e pelos testes de oxidase, oxidação da glicose, hidrólise da arginina, redução do nitrato e crescimento em

cetrimida (12). Todos os testes foram realizados a partir de crescimento da bactéria isolada em MacConkey (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville) incubado por 24 h/37°C.

Os testes de susceptibilidade foram realizados pelo método de disco difusão em agar (15). Foram testados representantes de diferentes classes de agentes antimicrobianos comumente usados para tratamento de infecções por *P. aeruginosa*: amicacina, aztreonam, carbenicilina, ceftazidime, ciprofloxacina, imipenem e a associação ticarcilina/clavulanato (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville). Isolados com resposta iguais a todos os agentes foram considerados pertencentes ao mesmo antibiotipo. Diferença em pelo menos um resultado de sensível para resistente, ou ao contrário, caracterizou um tipo diferente, enquanto alteração de sensível para intermediário, ou vice-versa, determinou subtipos. Os antibiotipos foram designados por letras minúsculas e os subtipos receberam números adicionais.

Para biotipagem as amostras foram semeadas em agar sangue para observação da hemólise sob luz transmitida, após incubação por 24 h/37°C, e as amostras hemolíticas foram divididas em dois grupos, conforme apresentassem com hemólise parcial ou total. A observação de pigmento foi feita em placa de agar Mueller-Hinton após incubação por 24 h/37°C, e as amostras pigmentadas foram classificadas conforme a coloração observada.

Inicialmente foi verificada a utilização da glicose em meio de oxidação/fermentação (OF, BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville) utilizando dois tubos, sendo um coberto com óleo mineral. A seguir foram semeados um tubo de OF e um de ASS (ammonium salt sugar) contendo galactose, manose, manitol ou ramnose em concentração de 1%. Os tubos foram incubados por até 4 dias para resultado negativo. Teste paralelo em meio de ASS foi realizado devido a possibilidade deste meio ser mais sensível para detectar utilização de carboidratos por

oxidação, evitando falso-negativos. A hidrólise da uréia foi determinada em meio de Christensen (12).

Cada grupo de respostas idênticas de pigmento, hemólise, hidrólise da uréia e utilização de carboidratos foi considerado como um biótipo, identificado por um número.

Relação epidemiológica foi determinada através de ligações geográficas e temporais entre os pacientes de cada hospital. Foram considerados relacionados pacientes internados na mesma unidade, que tiveram isolamento de *P. aeruginosa* a partir de qualquer material clínico, obtida em período de até 5 dias. Cada grupo de pacientes relacionados recebeu um número de relação (R).

A macrorestrição de DNA seguida de eletroforese pulsada foi realizada como descrito previamente (16). Resumidamente, a bactéria, em blocos de agarose, foi digerida com *SpeI* (Gibco BRL, USA). Eletroforese pulsada no sistema CHEF DR II (Bio-Rad, Richmond, USA), foi realizada a 14° C, por 22 horas, a 5,9 V cm⁻¹, com pulso inicial e final de 5 a 50 seg respectivamente. Marcador de peso molecular 48,5 Kb (Sigma, USA) foi utilizado em todos os géis, que foram corados com brometo de etídio. A imagem foi capturada através de transiluminador Chemilmager 4000 (Alpha Inntech Corporation). Os perfis de macrorestrição foram comparados visualmente e a relação entre os isolados foi determinada utilizando os critérios de Tenover et al (17). Cada clone (perfis idênticos) foi identificado por uma letra maiúscula e os subtipos por números adicionais.

Uma vez que a macrorestrição do DNA tem sido considerada como o melhor método para tipagem de *P. aeruginosa* (2,3), o perfil de restrição foi considerado como o padrão ouro para avaliação dos demais métodos.

RESULTADOS

Foram analisados 124 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, obtidos de diferentes pacientes em 3 hospitais, durante o período de setembro de 1998 a maio de 1999. A maioria das amostras foi obtida a partir de material do trato respiratório (54%), seguido do trato urinário (28%), sangue (6,5%) e outros materiais (cateter, secreções abdominais, ferida operatória).

As amostras de *P. aeruginosa* foram classificadas em 26 antibiótipos principais, 7 deles divididos em subtipos. Foram observados perfis únicos em 15 casos. Susceptibilidade a todos os agentes testados foi observada em 46 (37,1%) amostras, enquanto multiresistência ocorreu em apenas 3 (tabela 1).

Foi observado pigmento em 122 das 124 amostras estudadas, a maioria (86,3%) de coloração verde característica. Todas as amostras revelaram ação hemolítica, principalmente com hemólise total (95,2%). Os teste de utilização de carboidratos forneceram os mesmos resultados em meio OF e ASS, embora em alguns casos, a positividade tenha sido observada em menor tempo de incubação em um dos meios utilizados. O carboidrato mais utilizado foi a galactose (99%) e apenas uma minoria utilizou ramnose (0,8%). A biotipagem forneceu 11 perfis diferentes, sendo o biótipo mais freqüente observado em 84 (70%) dos casos, que apresentaram hemólise beta, produção de pigmento verde, utilização da uréia, galactose, manitol e manose e não utilização da ramnose.

Análise da relação epidemiológica forneceu 14 grupos constituídos por número variado de pacientes. Somente em 3 grupos de pacientes relacionados (R9, R12 e R14) as amostras apresentaram antibiótipo idêntico (tabela 2), enquanto o mesmo biótipo foi observado em todos os isolados de pacientes pertencentes 8 grupos.

Um total de 81 isolados de *P. aeruginosa* foram submetidos a tipagem molecular, sendo que um deles não forneceu resultado adequado devido a persistente degradação do DNA. Os demais revelaram 71 perfis de macrorestrição do DNA (genótipos) diferentes. Cinco perfis ocorreram em mais de uma amostra, sendo o perfil D observado em 5 isolados (tabela 3).

O aumento do poder discriminatório pela combinação de mais de um método de tipagem foi avaliado. A combinação entre o antibiotipo “a” e o biótipo 1 ocorreu em 31 casos, sendo a mais freqüente. Análise do genótipo nos grupos de pacientes relacionados mostrou que no maior grupo de pacientes (R1), 3 dos 9 isolados eram do mesmo genótipo (D). No entanto, este mesmo perfil também foi observado em 2 amostras isoladas de pacientes sem relação epidemiológica com o primeiro grupo. Antibiotipo e biótipo de *P. aeruginosa* pertencentes a este clone foram diferentes, não sendo capazes de demonstrar o vínculo revelado pela macrorestrição do DNA (tabela 3). Apenas três isolados (genótipo B) apresentaram o mesmo perfil em todos os métodos de tipagem utilizados neste estudo, sendo todos multiresistentes e dois deles epidemiologicamente relacionados.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a macrorestrição do DNA (tipagem molecular) forneceu o maior número de tipos de *P. aeruginosa*, o que confirma o alto poder discriminatório deste método, principalmente quando comparado com os demais métodos analisados.

A tipagem pelos perfis de susceptibilidade agrupou grande número de isolados no antibiotipo “a”, embora estes não tivessem relação clonal, já que todos apresentaram perfis de

macrorestrição do DNA distintos. Não foi possível estabelecer distinção entre estas amostras mesmo quando associado ao biótipo, ou aos dados de relação epidemiológica dos pacientes.

Somente nas amostras do antibiograma “b” foi observado o mesmo genótipo, os isolados de *P. aeruginosa* de outros antibiogramas não apresentaram relação clonal, ainda que pertencentes ao mesmo biótipo e obtidas de pacientes relacionados. Embora todas as amostras com perfis de sensibilidade únicos tenham confirmado pertencer a genótipos distintos, indicando a adequação da tipagem pelo antibiograma, a observação do mesmo perfil de restrição em antibiogramas distintos demonstra o contrário.

Conforme o Manual of Clinical Microbiology (12), o percentual de isolados de *P. aeruginosa* que utilizam a galactose, manose, manitol e ramnose é de 81%, 79%, 68% e 22% respectivamente. Assim, a utilização destes carboidratos poderia ser útil para distinguir isolados clínicos de *P. aeruginosa*. No entanto, neste estudo, obtivemos resultados bastante homogêneos, com taxas mais elevadas de utilização dos primeiros carboidratos e muito inferior para ramnose, o que determinou a inclusão da maioria das amostras em um mesmo grupo e conferiu a estes testes baixo valor discriminatório como método de tipagem.

Métodos fenotípicos tem sido utilizados para seleção inicial de bactérias que precisam ser tipadas por técnicas com maior poder discriminatório (7,11,18,19). Neste estudo, a utilização de biótipos não foi útil, já que, na maioria dos casos, *P. aeruginosa* apresentou as mesmas características. Os resultados também revelaram discrepância entre perfis de sensibilidade e de macrorestrição do DNA, pois foram observados vários genótipos no mesmo antibiograma e isolados pertencentes ao mesmo clone apresentaram antibiogramas diferentes. Mesmo nos grupos que incluíam poucas amostras a macrorestrição do DNA demonstrou não existir relação clonal.

Falha em obter dados capazes de tipar microrganismos através de métodos fenotípicos também foram apontadas em vários outros estudos (1,5,6,9,10,19).

Isolamento de uma mesma bactéria em materiais clínicos de pacientes hospitalizados na mesma unidade constitui um dos pontos de partida para identificação de possíveis surtos (20). Os dados deste estudo indicaram que isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes epidemiologicamente relacionados na maioria das vezes não pertencem ao mesmo genótipo, e confirmam dados relatados em outros trabalhos (21,22). Assim, fica claro que relação epidemiológica entre pacientes não é suficiente para estabelecer transmissão cruzada ou caracterização de surtos, mesmo que as características fenotípicas sejam iguais. Também foi verificado que o mesmo genótipo pode ocorrer em pacientes sem relação aparente, o que pode estar ligado ao fato do ambiente ser importante fonte de infecção (23).

Embora macrorestrição do DNA seja o método padrão para tipagem de *P. aeruginosa*, o tempo requerido para sua realização muitas vezes leva a utilização de dados epidemiológicos e fenotípicos, notadamente perfil de sensibilidade, para análise inicial na determinação de surtos e medidas de controle. Os resultados do presente estudo indicam que a utilização de tais dados podem induzir interpretações equivocadas, e não devem ser aceitos como sinal de relação ou falta de relação entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*, já que somente a tipagem genotípica é capaz de estabelecer claramente relação clonal.

Tabela 1: Principais antibiotipos observados em *P. aeruginosa*.

Antibiotipo	n	%	AMI	ANT	CAR	CAZ	CIP	IMI	TIC
a	46	37,1	S	S	S	S	S	S	S
b	3	2,4	R	R	R	R	R	R	R
c*	20	16,1	R	S	R	S	R	S	R
d*	12	9,7	S	S	I	S	S	S	S
e*	10	8,1	S	S	R	S	S	S	S
f*	7	5,6	S	I	R	S	S	S	R
g	3	2,4	R	S	R	S	R	S	S
h*	2	1,6	I	S	R	S	R	S	R
j*	2	1,6	R	S	R	S	S	S	R
k	2	1,6	R	I	R	S	R	R	R
m*	2	1,6	S	I	R	S	S	R	S

AMI = amicacina, ATM = aztreonam, CAR = carbenicilina, CAZ = ceftazidime,

CIP = ciprofloxacim, IMI = imipenem, TIC = ticarcilina/ácido clavulânico.

* antibiotipos que apresentaram subtipos.

Tabela 2: Características dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes que apresentaram relação epidemiológica.

Relação epidemiológica	Total de amostras	Número de antibiótipos	Número de biótipos
R1	9	7	5
R2	4	3	2
R3	4	3	1
R4	4	4	4
R5	3	3	2
R6	3	3	1
R7	3	3	1
R8	3	1	1
R9	2	2	1
R10	2	2	1
R11	2	2	1
R12	2	1	1
R13	2	2	1
R14	2	1	1

* Número perfis diferentes no grupo.

Tabela 3: Características das amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram perfis de macrorestrição do DNA observados em mais de um caso.

Genótipo	Antibiotipo	Biótipo	Relação epidemiológica
A	m	1	sem relação
A	u	1	sem relação
AL	u	1	sem relação
AL	cl	1	sem relação
B	b	1	R12
B1	b	1	sem relação
B1	b	1	R12
C	k	1	sem relação
C1	u	1	sem relação
D	u	6	R1
D	d1	9	R1
D	fl	1	R1
D	u	7	R4
D	m1	5	R4

u = antibiotipo único

Pseudomonas aeruginosa: evolution of resistance and screening for
metallo-beta-lactamase.

Freitas, AL¹ and Barth, AL²

1. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Escola de Farmácia - Universidade Católica de Pelotas.
2. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Unidade de Pesquisa Biomédica – Serviço de Patologia Clínica - Hospital de
Clínicas de Porto Alegre.

* corresponding author

Barros Cassal, 666/806 CEP 90035-030 - Porto Alegre - RS - Brazil.
Fone: (051) 33115460 Fax (51) 33168310 E-mail: usha@via-rs.net

Running title

Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, metallo-beta-lactamases.

ABSTRACT

Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by disk-diffusion method was performed in 160 isolates obtained from two hospitals in Porto Alegre, Brazil, in two distinct periods: 1998 and 2002. The increase of resistance observed between the two periods was statistically significant only for ceftazidime ($p=0.0269$) and for cefepime ($p=0.0340$). In parallel, the production of metallo-beta-lactamase (M- β la) by disk approximation test, was evaluated among 35 *P. aeruginosa* resistant to ceftazidime and/or imipenem and 14 displayed positive results. The majority of the M- β la producers were obtained from the hospital with higher rates of resistance to all antibiotics. Resistance to ceftazidime or imipenem displayed sensitivity of 64.3% and 92.9%, respectively, as a screening test for M- β la. This indicated that in our population isolates resistant to any of these agents must be tested for M- β la. A macrorestriction analysis of *P. aeruginosa* from 1998 indicated that there was a heterogeneity of genotypes among M- β la producers and non-producers, although in one hospital the same genotype included both M- β la producers and non-producers.

INTRODUCTION

Over the past several decades, the frequency of antimicrobial resistance and its association with infectious disease have increased at alarming rates. Resistance patterns may vary significantly from country to country and also in different hospitals within a country, making surveillance essential to guide therapy and infection control measures (7). Isolates evaluated by the SENTRY antimicrobial surveillance program indicated that the prevalence and the resistance rates among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Latin America and Brazil were higher than other countries (4,19).

P. aeruginosa infections are often difficult to eradicate, in part due to high-level resistance to many antibiotics as a result of both intrinsic and acquired mechanisms, including the production of beta-lactamases of distinct classes (6,12). Metallo-beta-lactamases (M- β la) are IMP and VIM-related enzymes, which provide bacteria with an efficient and effective way of mediating resistance to beta-lactams, noted for their ability to hydrolyze carbapenems (2,16). These enzymes display a proven capability to disseminate through bacterial populations and the rapid detection of M- β la-producing bacilli is necessary to aid infection control and to prevent their dissemination, since the increase in prevalence could compromise the efficacy of carbapenems to treat infections (16,17). In fact, *P. aeruginosa* isolates that produce M- β la are increasingly being reported worldwide (9,15,22). In parallel, multiresistant *P. aeruginosa* has been described in isolates from Brazil since the last decade, but only recently the production of M- β la was detected (18).

In order to evaluate the magnitude and evolution of antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* in Porto Alegre, Brazil, we performed a study using hospital isolates obtained in two periods. This study also focus on the detection of M- β la production among *P. aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS

P. aeruginosa isolates recovered from patients admitted to university hospitals (HCPA and SCM) in two periods (1998 and 2002), were identified by conventional tests of glucose oxidation, oxidase, arginine dihydrolase and pigment production (8).

Susceptibility to amikacin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and ticarcillin/clavulanate (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville, Md) was determined by the disk diffusion method according to NCCLS guidelines (14). Isolates resistant to imipenem by the disk diffusion were confirmed by the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). The resistance rates considered in this study included both intermediate and fully resistant isolates.

Ceftazidime (CAZ) and/or imipenem (IMI) resistant isolates were evaluated for M- β la production by a disk approximation test as described by Arakawa et al. (1). Briefly, a 10^8 UFC/ml suspension of each isolate was spread onto a Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, England) agar plate and two disks of CAZ (30 μ g - Oxoid, Hampshire, England) were placed with a distance of about 5 cm. A filter disk was placed near one of the CAZ disks (border to border distance, 2 cm), and 3 μ L of a 1.2-g/ml solution of 2-mercaptopropionic acid (2-ME – Across Organics, New Jersey, USA) was added. The cultures were incubated for 16-18 h at 35°C. The observation of an increase in the inhibition zone or the appearance of an inhibition zone around the CAZ disk near the disk with 2-ME was interpreted as a positive result for M- β la production.

Macrorestriction analysis followed by PFGE in isolates from 1998, was performed as described previously (3).

Comparison of resistant rates from the two periods was performed using the Fischer's exact test. A p value <0.005 was considered significant.

RESULTS

The study was performed with clinical isolates of *P. aeruginosa* divided in two periods: 1998 and 2002. In each period was obtained 40 isolates from HCPA and 40

from SCM. In addition, 40 isolates obtained in 1998 from a third hospital (HSL) were included for M- β la tests.

The respiratory tract constituted the source of isolates in the majority of cases, followed by the urinary tract. There was no significant difference of source between first and second periods (HCPA, $p=0.50021$ and SCM $p=0.3711$). Patients were hospitalized mainly in open units (40-50%) and UTI (15-20%).

Resistant rates among isolates from 1998 range from 7.5% for the cephalosporins to 32.5% for ticarcillin in HCPA, while the isolates from SCM were more resistant to gentamicin (47.5%) and more susceptible to imipenem and ceftazidime (10%). In 2002, resistance to gentamicin was higher in both hospitals, and imipenem was the more effective agent "in vitro", despite the difference of resistance observed between both hospitals (HCPA -2.5% and SCM -27.5%). The overall resistance rates were lower at HCPA (table 1).

Isolates from HCPA displayed an enhance of resistance to aztreonam, cefepime, ciprofloxacin, gentamicin and ticarcillin from the first to the second period, but none of these were considered statistically significant. Exclusion of intermediate response from the resistant group, made no difference for all tested agents, except to aztreonam to which the increased in resistance from 1998 to 2002 become statistically significant ($p=0.0015$).

P. aeruginosa isolates from SCM during 2002 displayed major resistance to all agents when compared with 1998 isolates, although difference statistically significant were observed only to ceftazidime ($p=0.0269$) and cefepime ($p=0.0340$), even when intermediate results were considered in separate.

M- β la production tests were performed in 35 isolates resistant to ceftazidime (CAZ) and/or imipenem (IMI), and positive results were observed in 14 (40%) of them (table 2). None of the 5 isolates from HCPA and only 3 out of 8 isolates from HSL were positive for M- β la production. In contrast, 50% (11/22) of the isolates from SCM

proved to produce the enzyme. The proportion of M- β la production found in isolates from 1998 (62.5%) was higher than the proportion in 2002 (42.9%).

Resistance to IMI among the 14 isolates of *P. aeruginosa* that produce M- β la was detected in all but one isolate (MIC=2 μ g/ml), although 5 of them were susceptible to CAZ by disk diffusion tests. The use of resistance to IMI or to CAZ separately, as a screening test for M- β la detection, displayed sensitivity of 92.9% and 64.3% respectively. On the other hand, 5 M- β la non-producers were resistant to both IMI and CAZ, while 16 isolates displayed resistance to only one of these agents (table 2).

Isolates tested for of M- β la were included among the most resistant *P. aeruginosa* of this study, and those with positive results were even more resistant than the non M- β la producers. Resistance to all tested agents was observed in 6 of 14 M- β la positive isolates while only 2 isolates displayed this profile among *P. aeruginosa* non M- β la producers, both recovered in the second period of the study. Resistance to aztreonam was observed in 7 M- β la positive isolates (3 fully and 4 intermediate) and in 15 non-producers (8 fully and 7 intermediate).

Molecular typing of all isolates from 1998 indicated that the nine isolates from SCM that produce M- β la were distributed into 3 distinct genotypes, while non-producers displayed molecular profiles unique to each isolate. In contrast, some M- β la producers from HSL shared the same genotype with non-producers (3).

DISCUSSION

The resistance rates of *P. aeruginosa* obtained from inpatients tend to be quite variable around the world and even among different hospitals from the same region (7). In fact, in this study we found that *P. aeruginosa* from patients at distinct hospitals in our city displayed a considerable difference of the resistant rates for antimicrobials.

Overall rates of resistance observed in this study were comparable to data from other Brazilian hospitals. We found resistance to cefepime, ciprofloxacin and imipenem in SCM similar to the higher rates described, while resistant of HCPA isolates to imipenem and cefepime were lower (11,13,18,20).

There was an enhance of resistance to imipenem in SCM between 1998 and 2002 although it was not statistically significant. However, any increase of resistance to this agent is worrying, as it represents one of the major problem for treatment of *P. aeruginosa* in other Brazilian hospitals (18,19).

Production of M- β la among *P. aeruginosa* isolates of this study, in a particular hospital, was considerably higher than other publications (18,22).

P. aeruginosa M- β la producers usually display high level of resistance to ceftazidime (MIC>64 μ g/ml). However, in this study, the selection of isolates for M- β la detection only taking account the resistance to CAZ would have underestimate its frequency, as the use of this criteria had lower sensivity than the use of resistance to IMI (92.9% and 64.3%).

Another characteristic of M- β la is the fact that the enzyme does not confer resistance to aztreonam (ATM). However, only 5 of the 14 isolates that produce M- β la were susceptible to ATM, indicating that the *P. aeruginosa* tested in our study also expressed other mechanisms of resistance, such as efflux and production of other enzymes beyond M- β la production (10).

Multiresistant *P. aeruginosa* are frequently associated to outbreaks caused by a single or few predominant genotypes in one institution (5,21), but detection of isolates of the same genotype in distinct hospitals was recently described in Brazil (18). In our study, the majority of *P. aeruginosa* M- β la producer were recovered from the hospital that displayed the major rates of resistance, and there was no clonal relation among the multiresistant or M- β la producer isolates.

The high level of resistance and M- β la production among *P. aeruginosa* isolated from hospitals in Porto Alegre indicates that additional studies to evaluate production of beta-lactamases and increase of resistance are warranted.

Table 1: Distribution of antimicrobial resistance among *P. aeruginosa* isolates in 1998 and 2002 (40 isolates of each period)

Antimicrobial agent	No (%) of resistant isolates			
	HCPA		SCM	
	1998	2002	1998	2002
Amikacin	12 (30.0)	10 (25.0)	18 (45.0)	19 (47.5)
Aztreonam	11 (27.5)	14 (35.0)	14 (35.0)	19 (47.5)
Cefepime	3 (7.5)	7 (17.5)	9 (22.5)	19 (47.5)*
Ceftazidime	3 (7.5)	2 (5.0)	4 (10.0)	13 (32.5)*
Ciprofloxacin	9 (22.5)	13 (32.5)	17 (42.5)	20 (50.0)
Gentamicin	11 (27.5)	17 (42.5)	19 (47.5)	20 (50.0)
Imipenem	4 (10.0)	1 (2.5)	4 (10.0)	11 (27.5)
Ticarcillin/clavulanate	13 (32.5)	15 (37.5)	16 (40.0)	NT

* a significant difference ($p < 0.05$) in resistant rates between the two period.

NT = not tested.

Table 2: Metallo- β -lactamase (M- β la) production and susceptibility profiles among *P. aeruginosa* isolates resistant to ceftazidime and/or imipenem.

N	M- β la	Hospital	Period	CAZ	IMI	ATM	CEF	CIP	AMI	GE
101	P	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
103	P	HSL	1	S	R	S	S	R	S	R
106	P	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
15	P	SCM	1	S	R	I	S	R	R	R
20	P	SCM	1	S	R	I	I	R	R	R
21	P	SCM	1	R	R	R	R	R	R	R
24	P	SCM	1	R	R	R	R	R	R	R
39	P	SCM	1	R	R	S	R	R	R	R
606	P	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
609	P	SCM	2	R	R	I	R	R	R	R
613	P	SCM	2	R	R	S	R	R	R	R
618	P	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
636	P	SCM	2	R	R	I	R	R	R	R
623	P	SCM	2	R	S	R	R	R	R	R
64	N	HCPA	1	R	S	I	S	S	S	S
62	N	HCPA	1	S	R	I	S	R	R	R
76	N	HCPA	1	S	R	I	S	S	S	S
504	N	HCPA	2	S	R	R	I	R	R	R
532	N	HCPA	2	R	S	R	S	R	R	R
118	N	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
120	N	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
100	N	HSL	1	I	R	I	S	S	S	S
111	N	HSL	1	R	S	I	S	R	R	R
119	N	HSL	1	R	R	S	S	S	S	S
2	N	SCM	1	R	S	S	S	S	S	S
10	N	SCM	1	R	S	I	I	R	R	R
26	N	SCM	1	S	R	S	S	R	R	R
602	N	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
624	N	SCM	2	R	R	R	R	S	S	S
637	N	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
619	N	SCM	2	R	S	R	R	R	R	R
629	N	SCM	2	R	S	R	R	R	R	R
628	N	SCM	2	R	S	S	R	R	R	R
621	N	SCM	2	S	R	R	R	R	R	R
633	N	SCM	2	S	R	I	R	R	R	R

CAZ = ceftazidime, IMI= imipenem, ATM= aztreonam, CEF= cefepime, CIP= ciprofloxacin, AMI= amikacin, GE= gentamicin.

REFERENCES

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40-3.
2. Bush K. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998;27:48-53.
3. Freitas AI & Barth AL. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Braz J Infect Dis* 2002; 6:1-7.
4. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1977-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32:146-55.
5. Gulay Z, Atay T, Amyes SG. Clonal spread of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit of a Turkish hospital. *J Chemother* 2001;13:546-54.
6. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998;27:93-9.
7. Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over past few years. *Chest* 2001;119 Suppl 2:397-404.
8. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 517-25.
9. Livermore D & Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 2000;3:489-95.
10. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
11. Loureiro MM, Moraes BA, Mendonça VLF, Quadra MRR, Pinheiro GS, Ansensi MD. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:387-94.
12. Luzzaro F; Mantegoli E; Perilli M; Lombardi G; Orlandi V; Orsatti A; Amicosante G; Rossolini GM; Toniolo A. Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase. *J Clin Microbiol* 2001 39:1865-70.

13. Mendes C, Hsiung A, Kieffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I, Zoccoli. Avaliação da atividade in vitro de nove antimicrobianos contra cepas bacterianas isoladas de pacientes em unidades de terapia intensiva no Brasil: programa de vigilância antimicrobiana "MYSTIC". *Braz J Infect Dis* 2000;4(5):236-44.
14. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS Document M100-S12. Pennsylvania, 2002.
15. Nordmann P & Guibert M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antim Chemother* 1998;42:128-32.
16. Nordmann P & Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:321-31.
17. Payne DJ, Rodriguez JAH, Boyd H, Concha N, et al. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases. *Antim Agents and Chemother* 2002; 46:1880-6.
18. Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér AS, Oliveira MP, Sampaio JL, Freitas A, Ferreira ALP, Amorim ELT, Riley LW, Moreira BM. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002;40:2420-4.
19. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 2001;5:200-14.
20. Sader HS, Sampaio JLM, Zoccoli C, Jones, RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in three Brazilian medical centers. *Braz J Infect Dis* 1999;3:63-79.
21. Tsakris A, Pournaras S, Woodsord N, Palepou MI, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000;38:1290-2.
22. Yamaguchi K, Mathai D, Biedenbach DJ, Lewis MT, Gales AC, Jones RN. Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum beta-lactam antimicrobial agents tested against over 2,000 clinical isolates from 22 medical centers in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 34:123-34.

Versão em português do artigo: *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of resistance and screening for metallo-beta-lactamase.

Pseudomonas aeruginosa: evolução da resistência e pesquisa de metalo-beta-lactamase.

RESUMO

Foram realizados testes de susceptibilidade por disco difusão em 160 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtida de dois hospitais em Porto Alegre, Brasil, em dois períodos: 1998 e 2002. O aumento de resistência observado entre isolados dos dois períodos foi estatisticamente significativo apenas para ceftazidime ($p=0.0269$) e cefepime ($p=0.0340$). Produção de M- β la por aproximação de discos foi avaliada em 35 *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidime e/ou imipenem e foi positiva em 14 casos, a maioria em amostras do hospital com maiores taxas de resistência para todos os antibióticos. Seleção de amostras por resistência a ceftazidime ou imipenem revelou sensibilidade de 64,3% e 92,9%, respectivamente. Isto indicou que em nossa população isolados resistentes a qualquer um destes agentes devem ser testados para M- β la. Macrorestrição do DNA em *P. aeruginosa* obtidas em 1998 indicaram heterogeneidade de genótipos entre produtores e não produtores de M- β la, ainda que em um hospital o mesmo genótipo tenha incluído tanto amostras produtoras como não produtoras de M- β la,

INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas houve um aumento alarmante da resistência bacteriana. Já que existe variação dos padrões de resistência de país para país, e mesmo entre diferentes hospitais em uma cidade, programas de vigilância são essenciais para guiar a terapia e medidas de controle de infecção (7). As taxas de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* na América Latina e no Brasil são mais altas que em outros locais (4,19).

A dificuldade de tratamento das infecções por *P. aeruginosa* são em parte decorrência do alto nível de resistência a muitos antibióticos, como resultado da resistência intrínseca e da facilidade de aquisição de mecanismos de resistência, incluindo a produção de beta-lactamases de diversas classes (6,12). Metallo-beta-lactamases (M- β la) são enzimas relacionadas a beta-lactamases das classes IMP e VIM que fornecem a bactéria um modo de resistência a agentes beta-lactâmicos, especialmente importantes por sua capacidade de hidrolisar carbapenens (2,16). Devido a capacidade de difusão destas enzimas, a detecção de bactérias produtoras de M- β la é fundamental para o controle e prevenção de sua disseminação, pois o aumento da prevalência pode comprometer a eficácia do tratamento com carbapenens (16,17). Os relatos de *P. aeruginosa* produtora de M- β la tem sido cada vez mais freqüentes em todo o mundo (9,15,22). *P. aeruginosa* multiresistente tem sido encontrada desde a última década no Brasil, mas apenas recentemente foi detectada produção de M- β la (18).

Para avaliar a magnitude e a evolução da resistência de *P. aeruginosa* a antimicrobianos em Porto Alegre, Brasil, este estudo analisou isolados hospitalares obtidos em dois períodos. A produção de M- β la também foi avaliada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras clínicas de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes internados em hospitais universitários (HCPA e SCM) em dois períodos (1998 e 2002), foram identificadas pelos testes de oxidação da glicose, hidrólise da arginina e produção de pigmento (8).

Susceptibilidade a amicacina, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacim, gentamicina, imipenem e ticarcilina/clavulanato (BBL-Becton Dickinson Microbiology, Cockeysville, Md) foi determinada pelo método de disco difusão, conforme recomendado pelo NCCLS (14). Resistência ao imipenem no teste de difusão foi confirmada pelo E-teste (AB Biodisk, Solna, Sweden). As taxas de resistência incluíram tanto isolados com resistência plena como aqueles com resistência intermediária.

As amostras resistentes a ceftazidime (CAZ) e/ou imipenem (IMI) foram testadas para verificar produção de M- β la, através do método de aproximação de disco descrito por Arakawa e colaboradores (1). Uma suspensão com 10^8 UFC/mL foi semeada em superfície de placa de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, England). Dois discos de CAZ (30 μ g - Oxoid, Hampshire, England) foram colocados a 5 cm de distância. Um disco de papel foi posicionado a 2cm de um dos discos de CAZ e foram adicionados 3 μ L de uma solução 1,2-g/mL de ácido 2-mercapto etanol (2-MPA – Across Organics, New Jersey, USA). As placas foram incubadas por 16-18 h a 35°C. A observação de aumento ou o aparecimento de zona de inibição entre o disco de CAZ e o disco com 2-MPA foi interpretada como resultado positivo para produção de M- β la.

Os isolados obtidos em 1998 foram tipados por macrorestrição do DNA seguida por PFGE, conforme descrito anteriormente (3).

Para comparação das taxas de resistência nos dois períodos foi aplicado o teste de Fischer, sendo considerado significativo um valor de $p < 0,005$.

R**RESULTADOS**

O estudo foi realizado com 40 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do HCPA e 40 da SCM em cada período de estudo: 1998 e 2002. Para pesquisa de M-βla foram incluídas 40 amostras obtidas em 1998 de pacientes internados em um terceiro hospital (HSL).

A maioria das amostras foi isolada a partir de material do trato respiratório e do trato urinário. Não houve diferença significativa entre a origem das amostras de *P. aeruginosa* no primeiro e segundo períodos (HCPA, $p=0,50021$ e SCM $p=0,3711$). Os pacientes estavam hospitalizados principalmente em unidades abertas (40-50%) e em UTI (15-20%).

As taxas de resistência nos isolados de 1998 do HCPA variaram entre 7,5% para as cefalosporinas avaliadas e 32,5% para ticarcilina, enquanto as amostras da SCM deste período apresentaram maior resistência para gentamicina (47,5%) e maior susceptibilidade para imipenem e ceftazidime (10%). Em 2002, em ambos os hospitais, foi observada maior número de isolados resistentes a gentamicina, e o agente mais efetivo “in vitro”, foi o imipenem, embora as taxas de resistência dos dois hospitais fossem bastante diferentes (HCPA: 2,5% e SCM: 27,5%). Em geral, as amostras obtidas de pacientes hospitalizados no HCPA apresentaram menores taxas de resistência (tabela 1).

Comparando as taxas de resistência dos dois períodos, foi observado aumento de resistência ao aztreonam, cefepime, ciprofloxacim, gentamicina e no HCPA, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas. Exclusão das amostras com resistência intermediária do grupo considerado resistente, tornou o aumento de resistência para aztreonam estatisticamente significativo ($p=0,0015$).

Amostras de *P. aeruginosa* isoladas da SCM em 2002 foram mas resistentes que as de 1998 para todos os agentes, mas este aumento foi estatisticamente significativo somente para ceftazidime ($p=0,0269$) e cefepime ($p=0,0340$), independentemente dos resultados intermediários serem ou não considerados em separado.

Pesquisa de M- β la foi realizada em 35 isolados resistentes a CAZ e/ou IMI, sendo 14 (40%) positivos (tabela 2). Nenhuma das 5 amostras do HCPA que foram testadas e apenas 3 das 8 amostras do HSL foram positivas para M- β la. Ao contrário, na SCM 50% (11/22) das amostras testadas forneceram resultado positivo. A proporção de isolados positivos em 1998 (62,5%) foi maior que a observada em 2002 (42,9%).

Entre as amostras produtoras de M- β la apenas uma não apresentou resistência plena ao imipenem (MIC=2 μ g/mL), porém 5 apresentaram susceptibilidade a CAZ. A utilização de resistência apenas a um dos agentes para “screening” de M- β la apresentou sensibilidade de 92,9% para IMI e de 64,3% para CAZ. Por outro lado, nas amostras não produtoras de M- β la 5 apresentaram resistência a ambos os agentes, enquanto 16 foram resistentes apenas a IMI ou CAZ (tabela 2).

As amostras testadas para M- β la estavam entre as mais resistentes deste estudo, e as com teste positivo apresentaram resistência ainda maior que as não produtoras de M- β la. Resistência a todos os agentes foi observada em 6 de 14 *P. aeruginosa* produtoras de M- β la, enquanto apenas 2 amostras negativas apresentaram este perfil, ambas isoladas em 2002. Resistência ao aztreonam ocorreu em 7 amostras positivas para M- β la (3 com resistência plena e 4 intermediária), e em 15 amostras não produtores (8 com resistência plena e 7 intermediária).

Tipagem molecular das amostras obtidas em 1998 revelou que, na SCM, 9 dos 11 produtores de M- β la estavam distribuídos em 3 genótipos distintos, enquanto todas

as *P. aeruginosa* não produtoras de M-βla apresentaram perfis moleculares únicos. Já no HSL, um genótipo ocorreu tanto em amostras produtoras como em não produtoras de M-βla.

DISCUSSÃO

As taxas de resistência de *P. aeruginosa* isolada de pacientes hospitalizados tende a ser bastante variável no mundo (7). Neste estudo, observamos diferença considerável entre as taxas de resistência de *P. aeruginosa* em pacientes internados em diferentes hospitais.

De modo geral, as taxas de resistência observadas foram comparáveis as de outros hospitais brasileiros. Resistência a cefepime, ciprofloxacim e imipenem em isolados da SCM foi semelhante às maiores taxas descritas, enquanto resistência ao imipenem e cefepime em isolados do HCPA foram menores (11,13,18,20).

Embora o aumento de resistência ao imipenem na SCM entre 1998 e 2002, não tenha sido estatisticamente significativo, qualquer aumento de resistência a este agente é preocupante, já que representa um dos maiores problemas para o tratamento de *P. aeruginosa* em outros hospitais brasileiros (18,19).

A produção de M-βla nos isolados de *P. aeruginosa* deste estudo, em um dos hospitais, foi consideravelmente maior que o de outros relatos (18,22).

P. aeruginosa produtora de M-βla geralmente apresenta alto nível de resistência a ceftazidime (MIC>64μg/mL). Entretanto, neste estudo, a seleção de amostras para pesquisa de M-βla considerando apenas resistência a CAZ teria subestimado sua freqüência, pois o uso deste critério isoladamente apresentou menor sensibilidade que o uso de resistência ao IMI (92,9% e 64,3%).

Embora M- β la não confira resistência ao aztreonam (ATM), apenas 5 das 14 amostras positivas eram susceptíveis a este agente, indicando que as amostras de *P. aeruginosa* testadas neste estudo expressavam outros mecanismos de resistência, com efluxo e produção de outras enzimas além de M- β la (10).

O isolamento de *P. aeruginosa* multiresistente é freqüentemente associado a surtos causados por um genótipo principal em um hospital (5,21), embora presença de isolados com o mesmo perfil molecular em diferentes hospitais tenha sido descrito no Brasil (18). Em nosso estudo a maioria das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M- β la foram obtidas do hospital que apresentou as maiores taxas de resistência, e estas amostras não apresentaram relação clonal.

O alto nível de resistência e de produção de M- β la em isolados clínicos de *P. aeruginosa* em hospitais em Porto Alegre indica a necessidade de estudos para avaliar o aumento de resistência e a produção de beta-lactamases.

Tabela 1: Taxas de resistência de *P. aeruginosa* isolada em 1998 e 2002 no HCPA e SCM (40 amostras de cada período).

Agente antimicrobiano	No (%) de isolados resistentes			
	HCPA		SCM	
	1998	2002	1998	2002
Amicacina	12 (30,0)	10 (25,0)	18 (45,0)	19 (47,5)
Aztreonam	11 (27,5)	14 (35,0)	14 (35,0)	19 (47,5)
Cefepime	3 (7,5)	7 (17,5)	9 (22,5)	19 (47,5)*
Ceftazidime	3 (7,5)	2 (5,0)	4 (10,0)	13 (32,5)*
Ciprofloxacim	9 (22,5)	13 (32,5)	17 (42,5)	20 (50,0)
Gentamicina	11 (27,5)	17 (42,5)	19 (47,5)	20 (50,0)
Imipenem	4 (10,0)	1 (2,5)	4 (10,0)	11 (27,5)
Ticarcilina/clavulanato	13 (32,5)	15 (37,5)	16 (40,0)	NT

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nas taxas de resistência dos dois períodos.

NT = não testado.

Tabela 2: Produção de metalo-beta-lactamase (M- β la) e perfis de susceptibilidade em *P. aeruginosa* resistente a ceftazidime e/ou imipenem.

N	M- β la	Hospital	Período	CAZ	IMI	ATM	CEF	CIP	AMI	GE
101	P	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
103	P	HSL	1	S	R	S	S	R	S	R
106	P	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
15	P	SCM	1	S	R	I	S	R	R	R
20	P	SCM	1	S	R	I	I	R	R	R
21	P	SCM	1	R	R	R	R	R	R	R
24	P	SCM	1	R	R	R	R	R	R	R
39	P	SCM	1	R	R	S	R	R	R	R
606	P	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
609	P	SCM	2	R	R	I	R	R	R	R
613	P	SCM	2	R	R	S	R	R	R	R
618	P	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
636	P	SCM	2	R	R	I	R	R	R	R
623	P	SCM	2	R	S	R	R	R	R	R
64	N	HCPA	1	R	S	I	S	S	S	S
62	N	HCPA	1	S	R	I	S	R	R	R
76	N	HCPA	1	S	R	I	S	S	S	S
504	N	HCPA	2	S	R	R	I	R	R	R
532	N	HCPA	2	R	S	R	S	R	R	R
118	N	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
120	N	HSL	1	S	R	S	S	S	S	S
100	N	HSL	1	I	R	I	S	S	S	S
111	N	HSL	1	R	S	I	S	R	R	R
119	N	HSL	1	R	R	S	S	S	S	S
2	N	SCM	1	R	S	S	S	S	S	S
10	N	SCM	1	R	S	I	I	R	R	R
26	N	SCM	1	S	R	S	S	R	R	R
602	N	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
624	N	SCM	2	R	R	R	R	S	S	S
637	N	SCM	2	R	R	R	R	R	R	R
619	N	SCM	2	R	S	R	R	R	R	R
629	N	SCM	2	R	S	R	R	R	R	R
628	N	SCM	2	R	S	S	R	R	R	R
621	N	SCM	2	S	R	R	R	R	R	R
633	N	SCM	2	S	R	I	R	R	R	R

CAZ= ceftazidime, IMI= imipenem, ATM= aztreonam, CEF= cefepime, CIP= ciprofloxacim,
AMI= amicacina, GE= gentamicina.

ANEXO 1 - TESTES DE IDENTIFICAÇÃO

* TESTE DA OXIDASE

Detecção da enzima citocromo-oxidase, um grupo de enzimas que catalisam a transferência final do hidrogênio para oxigênio no ciclo de Krebs.

Método: Remover a colônia de meio não seletivo utilizando material não metálico e depositar sobre tira de papel de filtro impregnada em reativo de Kovacs (tetrametil-p-fenilenodiamino dihidroclorido 1%).

Leitura: desenvolvimento de coloração arroxeadada em 10 segundos = testes positivo.

Controles: positivo - *P. aeruginosa* ATCC 27853; negativo - *E. coli* ATCC 25922.

* CRESCIMENTO A 42° C

Verificar a capacidade de crescimento a 42° C.

Método: Inocular um tubo com caldo tripticaseína com pequeno número de bactérias e incubar a 42° C por 24 horas.

Leitura: Observar turvação após ligeira agitação do tubo, comparando com tubo não inoculado como controle negativo. Teste positivo: turvação ou crescimento.

* CRESCIMENTO EM AGAR CETRIMIDA E MACCONKEY

Verificar a capacidade de crescimento em meios seletivos: MacConkey contendo sais biliares e Cetrimida contendo compostos de amônio quaternário.

Método: Semear a bactéria em placa ou tubo com o meio. Incubar até 48 horas a 35° C.

Leitura: Observar crescimento. Teste positivo: crescimento.

* HIDRÓLISE DA ARGININA

A descarboxilação da arginina forma derivados amínicos que alcalinizam o meio.

Método: Base de Moeller adicionada de L-arginina a 1%. Utilizar inóculo denso, em picada e cobrir o tubo com 4 mm de óleo mineral estéril. Incubar por até 4 dias.

Leitura: O desenvolvimento de cor púrpura profunda indica reação positiva (alcalino). Na reação negativa o tubo fica púrpura suave, semelhante ao controle negativo (sem arginina). Pode ocorrer desaparecimento da cor com prolongamento da incubação devido a degradação do indicador.

* REDUÇÃO DO NITRATO E PRODUÇÃO DE GÁS

Detecta a capacidade da bactéria de extrair oxigênio do nitrato formando nitrito e outros produtos como amônia, óxido nítrico ou nitroso ou hidroxilamina.

Método: Caldo BHI com nitrato de potássio 2%, distribuído em tubos contendo tubo de Durham invertido. Inocular com inóculo denso e incubar por 48 horas.

Leitura: Produção de gás no tubo de Durham.

Nitrato: Adicionar os reativos α naftilamina e ácido sulfanílico para detectar presença de nitrito pela denitrificação do nitrato - aparecimento de coloração vermelha em 30 segundos representa reação positiva. Nos tubos sem cor deve ser verificada presença de nitrato residual porque a ausência de nitrito, pode ser devido a sua utilização - adicionar pó de zinco: coloração vermelha pela combinação com nitrato significa reação negativa. Na reação positiva o tubo permanece incolor porque o nitrato foi utilizado.

Fazer a leitura em 48 horas. Incubar mais 24 horas tubos com ausência de crescimento.

Interpretação do aparecimento de coloração vermelha:

- após adição dos reativos: positivo
- após adição de pó de zinco: negativo

Controles: positivo - *E. coli*; negativo - *B. cepacia*

* UTILIZAÇÃO DA GLICOSE

Objetivo: determinar a via de utilização da glicose. Utilizar dois tubos, sendo um deles fechado com vaselina imediatamente após a semeadura, para evitar a entrada de oxigênio e só permitir utilização da glicose através de reações de fermentação.

Método: preparar o meio de OF segundo Hugh-Leifson e adicionar glicose a 1%. Distribuir em tubos de 15 a 20 mm de diâmetro interno, em camada alta. Colocado sob vapor para remover o ar dissolvido e resfriar imediatamente antes do uso. Semear por picada até 2/3 do tubo, 1 ou 2 vezes. Cobrir um dos tubos com uma camada de 1 cm de vaselina estéril. Incubar por até 3-4 dias para leitura final negativa. A acidificação será evidenciada pelo desenvolvimento de cor amarela devido a viragem do indicador de pH (azul de bromo timol).

Leitura e interpretação de resultados da utilização da glicose em meio de OF:

TUBO ABERTO	TUBO FECHADO	VIA DE UTILIZAÇÃO
amarelo	verde	oxidação
amarelo	amarelo	fermentação
verde ou azul	verde	não sacarolítico

Quando ocorre utilização da glicose via oxidativa as reações iniciam na superfície e a alteração da parte inferior do tubo pode demorar. Quando a reação de oxidação é fraca, pode haver inicialmente alcalinização na superfície do tubo aberto; com prolongamento da incubação a reação vira para ácido.

Controles:

- Fermentação da glicose: *E. coli* ATCC 25 922
- Oxidação da glicose: *P. aeruginosa* ATCC 27 853
- Não sacarolítico: *Moraxella* spp

CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES E TESTES DE IDENTIFICAÇÃO NAS AMOSTRAS ANALISADAS

Amostras da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre: 1998-1999

Paciente/ amostra	Unidade	Material	Data	Idade	Cetr Mac	Ox.	Glic	Arg	Nit Gas
1	UTI	urina	set/98	70	+	+	O	+	+
2	DIP	TR	set/98	33	+	+	O	+	+
4	UTI	TR	abr/99	36	+	+	O	+	+
5	UTI	urina	set/98	41	+	+	O	+	+
6	UTI	TR	set/98	-	+	+	O	+	+
7	DIP	TR	nov/98	71	+	+	O	+	+
8	UTI	CAT	abr/99	46	+	+	O	+	+
9	4°	urina	set/98	-	+	+	O	+	+
10	UTI	TR	set/98	-	+	+	O	+	+
11	4°	urina	set/98	65	+	+	O	+	+
12	UTI	TR	set/98	81	+	+	O	+	+
13	UTI	TR	set/98	55	+	+	O	+	+
14	3°	urina	abr/99	48	+	+	O	+	+
15	DIP	TR	set/98	33	+	+	O	+	+
16	UTI	urina	set/98	56	+	+	O	+	+
17	UTI	TR	abr/99	46	+	+	O	+	+
18	UTI	urina	set/98	54	+	+	O	+	+
19	UTI	TR	set/98	-	+	+	O	+	+
20	UTI	urina	abr/99	37	+	+	O	+	+
21	UTI	urina	set/98	-	+	+	O	+	+
22	3°	urina	set/98	64	+	+	O	+	+
23	UTI	TR	set/98	46	+	+	O	+	+
24	UTI	TR	set/98	58	+	+	O	+	+
25	UTI	TR	out/98	-	+	+	O	+	+
26	UTI	TR	out/98	45	+	+	O	+	+
27	3°	urina	abr/99	48	+	+	O	+	+
28	UTI	TR	out/98	-	+	+	O	+	+
29	DIP	TR	out/98	51	+	+	O	+	+
30	UTI	TR	abr/99	55	+	+	O	+	+
31	UTI	FO	out/98	45	+	+	O	+	+
32	UTI	TR	out/98	38	+	+	O	+	+
33	4°	Urina	abr/99	15	+	+	O	+	+
34	UTI	Abdominal	abr/99	65	+	+	O	+	+
35	UTI	Urina	out/98	-	+	+	O	+	+
36	UTI	TR	abr/99	72	+	+	O	+	+
37	UTI	TR	nov/98	59	+	+	O	+	+
38	UTI	TR	nov/98	49	+	+	O	+	+
39	UTI	Urina	abr/99	76	+	+	O	+	+
40	4°	Urina	abr/99	55	+	+	O	+	+
221 (21*)	4°	Urina	jun/99		+	+	O	+	+
223 (123*)	UTI	TR	jun/99		+	+	O	+	+
224 (24*)	UTI	Urina	mai/99		+	+	O	+	+
226 (26*)	UTI	TR	jun/99		+	+	O	+	+
227 (27*)	3°	Urina	mai/99		+	+	O	+	+

* números utilizados do artigo Antibiotic resistance na d molecular...: focus on mipenem

Amostras da ISCMPA: 2002

Paciente/ amostra	Unidade	Material	Data	Idade
601	PF	TR	abr/02	4
602	PF	TR	mai/02	61
603	SJ	sangue	mai/02	36
604	PSC	TR	mai/02	65
605	SJ	TR	mai/02	50
606	PF	TR	mai/02	51
607	PSC	TR	mai/02	65
608	SR	cateter	mai/02	27
609	SR	urina	mai/02	62
610	PSC	sangue	mai/02	56
611	SR	sangue	mai/02	60
612	SR	sangue	mai/02	59
613	SR	abcesso pélvico	mai/02	56
614	PSC	cateter	mai/02	56
615	PF	TR	mai/02	77
616	PF	TR	mai/02	77
617	SR	TR	mai/02	55
618	PSC	TR	mai/02	-
619	PSC	cateter	mai/02	67
620	PF	TR	mai/02	53
621	SJ	TR	mai/02	47
622	PSC	sangue	mai/02	81
623	SR	urina	mai/02	68
624	PSC	TR	mai/02	66
625	PSC	TR	mai/02	36
626	PSC	sangue	mai/02	79
627	SJ	liquor	mai/02	50
628	PF	urina	mai/02	65
629	PSC	urina	fev/02	67
630	SR	secr.abdominal	fev/02	42
631	SF	TR	fev/02	60
632	PSC	TR	jan/02	48
633	PSC	cateter	jan/02	60
634	PF	TR	jan/02	71
635	SR	cateter	jan/02	56
636	PF	urina	jan/02	60
637	DomVic	sec.dreno	mai/02	60
638	SF	urina	mai/02	79
639	PSC	TR	mai/02	50
640	SF	urina	mai/02	79

Amostras do Hospital de Clínicas de Porto Alegre 1998-1999

Paciente/ amostra	Unidade	Material	Data	Idade	Cetr Mac	Ox.	Glic	Arg	Nit Gas
41	EME	Sangue	ago/98	7	+	+	O	+	+
42	CLI	CAT	ago/98	42	+	+	O	+	+
43	CTI	TR	ago/98	72	+	+	O	+	+
44	EME	Urina	ago/98	71	+	+	O	+	+
45	CLI	Urina	ago/98	47	+	+	O	+	+
46	CTI	TR	ago/98	72	+	+	O	+	+
47	CTI	TR	ago/98	55	+	+	O	+	+
48	CIR	Sangue	ago/98	31	+	+	O	+	+
49	EME	Sangue	set/98	64	+	+	O	+	+
50	CLI	Urina	set/98	73	+	+	O	+	+
51	EME	Peritoneal	ago/98	75	+	+	O	+	+
52	PED	Ocular	set/98		+	+	O	+	+
53	CLI	Ocular	set/98	74	+	+	O	+	+
54	CLI	TR	set/98	71	+	+	O	+	+
55	CIR	TR	set/98	42	+	+	O	+	+
56	PED	TR	set/98		+	+	O	+	+
57	CIR	Urina	set/98	66	+	+	O	+	+
58	CLI	TR	jan/99	83	+	+	O	+	+
59	PED	TR	set/98	1	+	+	O	+	+
60	CLI	TR	set/98	74	+	+	O	+	+
61	CIR	Sangue	set/98	64	+	+	O	+	+
62	CLI	Urina	jan/99	74	+	+	O	+	+
63	CLI	CAT	jan/99	10	+	+	O	+	+
64	CLI	Sangue	set/98	68	+	+	O	+	+
65	CTI	TR	set/98	82	+	+	O	+	+
66	CIR	Abdom.	set/98	52	+	+	O	+	+
67	CLI	FO	jan/99	53	+	+	O	+	+
68	CLI	TR	out/98	68	+	+	O	+	+
69	UTI	TR	out/98	65	+	+	O	+	+
70	EME	Urina	set/98	39	+	+	O	+	+
71	CLI	TR	out/98	65	+	+	O	+	+
72	CLI	TR	out/98	73	+	+	O	+	+
73	PED	TR	out/98	1	+	+	O	+	+
74	CTI	TR	out/98	73	+	+	O	+	+
75	CTI	Abdom.	jan/99	53	+	+	O	+	+
76	UTI	TR	out/98		+	+	O	+	+
77	CLI	TR	jan/99	42	+	+	O	+	+
78	CLI	TR	out/98	77	+	+	O	+	+
79	CIR	Urina	out/98	47	+	+	O	+	+
80	CIR	Urina	out/98	33	+	+	O	+	+

Amostras do HCPA: 2002

Paciente/ amostra	Unidade	Material	Data	Idade
501	CTI	TR	mar/02	64
502	CIR	prótese coxa	mar/02	78
503	CIR	urina	mar/02	78
504	CTI	TR	mar/02	44
505	CLI	urina	mar/02	74
506	ONCO	urina	mar/02	16
507	PED	TR	mar/02	0
508	UTI ped	urina	mar/02	7
509	CLI	TR	fev/02	76
510	CTI	sangue	fev/02	64
511	UTI ped	TR	fev/02	4
512	CLI	urina	fev/02	75
513	EME	liq. Ascite	fev/02	91
514	CIR	biopsia	fev/02	45
515	GER	TR	fev/02	71
516	UTI ped	TR	fev/02	4
517	GER	urina	fev/02	69
518	CLI	TR	fev/02	62
519	EME	TR	fev/02	70
520	CLI	TR	fev/02	33
521	CIR	TR	fev/02	59
522	CLI	TR	fev/02	58
523	PEC	TR	fev/02	2
524	GER	urina	jan/02	33
525	CLI	TR	jan/02	64
526	CTI	TR	jan/02	38
527	EME	urina	jan/02	59
528	CTI	TR	jan/02	27
529	CTI	TR	jan/02	84
530	CLI	TR	jan/02	64
531	CLI	TR	jan/02	66
532	CLI	TR	jan/02	81
533	CLI	secr. Pé	jan/02	51
534	PED	TR	jan/02	9
535	GER	TR	jan/02	57
536	CIR	secr. Peritoneal	jan/02	15
537	CTI	sangue	jan/02	32
538	CLI	sangue	jan/02	77
539	GER	TR	jan/02	8
540	CLI	ascite	jan/02	21

Amostras do Hospital São Lucas da PUC: 1998-1999

Paciente/ amostra	Unidade	Material	Data	Idade	Cetr Mac	Ox.	Glic	Arg	Nit Gas
90	UTI	Urina	nov/98	66	+	+	O	+	+
91	UTI	Urina	nov/98	80	+	+	O	+	+
92	GER	Urina	nov/98	67	+	+	O	+	+
93	UTI	Urina	abr/99	58	+	+	O	+	+
94	UTI	TR	nov/98		+	+	O	+	+
95	UTI	TR	nov/98	68	+	+	O	+	+
96	5°	Urina	nov/98	7	+	+	O	+	+
97	6°	Sangue	nov/98	75	+	+	O	+	+
98	6°	TR	abr/99	79	+	+	O	+	+
99	UTI	TR	abr/99	48	+	+	O	+	+
100	UTI	FO	nov/98	1	+	+	O	+	+
101	UTI	TR	nov/98	-	+	+	O	+	+
102	5°	FO	nov/98	7	+	+	O	+	+
103	EME	TR	nov/98	22	+	+	O	+	+
104	6°	TR	nov/98	73	+	+	O	+	+
105	UTI	TR	nov/98	35	+	+	O	+	+
106	UTI	TR	nov/98		+	+	O	+	+
107	6°	TR	nov/98	65	+	+	O	+	+
108	UTI	TR	nov/98	81	+	+	O	+	+
109	UTI	TR	nov/98	81	+	+	O	+	+
110	UTI	TR	nov/98	65	+	+	O	+	+
111	UTI	TR	nov/98	68	+	+	O	+	+
112	UTI	TR	nov/98	35	+	+	O	+	+
113	8°	TR	abr/99	83	+	+	O	+	+
114	UTI	TR	nov/98	-	+	+	O	+	+
115	6°	Urina	nov/98	26	+	+	O	+	+
116	6°	Urina	nov/98	64	+	+	O	+	+
117	UTI	TR	dez/98	1	+	+	O	+	+
118	UTI	TR	dez/98	6	+	+	O	+	+
119	UTI	TR	dez/98	2	+	+	O	+	+
120	UTI	TR	dez/98	1	+	+	O	+	+
121	5°	TR	dez/98	1	+	+	O	+	+
122	5°	FO	dez/98		+	+	O	+	+
123	CLI	Urina	dez/98	87	+	+	O	+	+
124	UTI	Sangue	dez/98	52	+	+	O	+	+
125	UTI	TR	mai/99	67	+	+	O	+	+
126	UTI	Urina	mai/99	87	+	+	O	+	+
127	6°	Sangue	dez/98	60	+	+	O	+	+
128	CTI	TR	dez/98	93	+	+	O	+	+
129	GER	Urina	mai/99	43	+	+	O	+	+

TESTES DE IDENTIFICAÇÃO: OX: teste de oxidase + (positivo); GLIC: oxidação da glicose (O); ARG: arginina + (positivo); NIT: nitrato; GÁS de nitrato + (positivo); CETR: crescimento em cetrimida; MAC: crescimento em MacConkey

UNIDADE: Números (3°, 4°, 5°, 6°) andares de internação; UTI OU CTI: unidade de tratamento intensivo; DIP: doenças infecciosas; GER: unidade aberta; EME: emergência; CLI: unidades clínicas; CIR: unidades cirúrgicas; PED: pediatria.

MATERIAL: TR: trato respiratório; FO: ferida operatória; CAT: cateter

ANEXO 2 - TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

* Teste de sensibilidade pelo método da difusão.

Resumidamente, os testes de sensibilidade pelo método da difusão (NCCLS, 2002) são realizados a partir de culturas puras da bactéria incubada por 24 horas em meio sólido. O crescimento é suspenso em soro fisiológico estéril para obter uma concentração equivalente a 150 milhões de bactérias/ml, determinada pela comparação da turvação com escala padrão (tubo 0,5 da escala de McFarland) ou através medida da densidade ótica da suspensão. Este inóculo é espalhado sobre placa de agar Mueller-Hinton com auxílio de "swab". Discos de papel de filtro impregnados com quantidades fixas dos agentes antibacterianos são colocados sobre a superfície. As placas são incubadas por 16-18 horas em estufa bacteriológica (35° C) e os halos de inibição formados são medidos em mm.

Entre os antibacterianos recomendados pelo NCCLS para testes de sensibilidade de *P. aeruginosa*, foram escolhido 8 agentes que representam as principais classes de antibióticos de uso freqüente para tratamento destas infecções em nosso meio: Amicacina, Aztreonam, Cefepime, Ceftazidime, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, e as associações Ticarcilina/clavulanato e Piperacilina/sulbactam.

* Determinação do MIC para imipenem: amostras resistentes no teste de difusão

Utilizada para prevenir resultados falso resistentes causados por degradação da droga, (Carmeli et al., 1998). Utilização de fitas de E-teste (AB Biodisk, Solna, Suécia).

* Teste de produção de AmpC

Pesquisa de AmpC pelo método de aproximação de discos (Weber & Sanders, 1990; Lister et al., 1999), nas amostras sensíveis a ticarcilina. Semeadura em agar M.Hinton e colocação de discos de imipenem (indutor) e cefoxitina e/ou ticarcilina (substrato), com distância de 20 mm borda-borda. Após incubação verificar indução de AmpC pela observação de achatamento do halo de inibição entre os discos de imipenem e ticarcilina.

Abreviaturas e siglas utilizadas nas tabelas de sensibilidade:

ISCMPA = Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL = Hospital São Lucas da PUC

N= identificação do paciente/amostra

Antibio = antibiotipo: letras minúsculas: antibiotipos principais; números: subtipos;

u=perfil de sensibilidade único da amostra

Ami = amicacina

Tob =tobramicina

Ge =gentamicina

Atm = aztreonam

Car = carbenicilina

Cef = cefepime

Caz = ceftazidime

Cip = ciprofloxacim

Imi = imipenem

Tic = ticarcilina/ácido clavulânico

AmpC = observação de achatamento do halo da ticarcilina:

P = positivo; N=negativos; NO= não observado

NT = não testado

Paciente /amostra	antibio	Ami	Tob	Ge	Azt	Car	Cef	Caz	Cip	Imi	Tic	AmpC
41	u	S	S	S	I	I	S	I	S	S	R	NO
42	d1	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	P
43	e1	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	P
44	h	I	R	R	S	R	S	S	R	S	R	NO
45	c	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	NO
46	f1	S	S	S	I	R	S	S	I	S	R	NO
47	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
48	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	PO
49	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
50	d2	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	P
51	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
52	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
53	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
54	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
55	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
56	e	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	P
57	c	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	NO
58	j	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	NO
59	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
60	c	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	NO
61	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
62	k	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R	NO
63	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
64	u	S	S	S	I	I	S	R	S	S	R	NO
65	d	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	N
66	j1	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	NO
67	g	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	N
68	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
69	d1	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	P
70	e1	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	N
71	f	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	NO
72	f	S	S	S	I	R	R	S	S	S	R	NO
73	e	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	P
74	e	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	P
75	g	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	P
76	u	S	R	S	I	R	S	S	S	R	S	N
77	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
78	u	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	P
79	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
80	f4	I	R	R	I	R	R	I	S	S	R	NO

Paciente /amostra	antibio	Ami	Tob	Ge	Azt	Car	Cef	Caz	Cip	Imi	Tic	AmpC
90	d	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	P
91	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
92	u	R	R	R	S	I	S	S	R	S	R	NO
93	c1	R	R	R	I	R	R	S	R	S	R	NO
94	e1	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	P
95	u	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	P
96	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
97	e	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	P
98	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
99	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
100	u	S	S	S	I	R	S	I	S	R	R	NO
101	d1	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	N
102	d	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	N
103	c2	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	N
104	f1	S	S	S	I	R	S	S	I	S	R	NO
105	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
106	f1	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	NO
107	d	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	P
108	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
109	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
110	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
111	c3	R	R	R	I	R	S	R	R	S	R	NO
112	g	R	R	R	I	R	S	S	R	S	S	P
113	h1	I	R	R	I	R	S	S	R	S	R	NO
114	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
115	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	O
116	c1	R	R	R	I	R	S	S	R	S	R	NO
117	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
118	u	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	N
119	u	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	N
120	m1	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	P
121	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
122	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
123	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
124	f3	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	NO
125	e	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	N
126	d	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	P
127	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
128	a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
129	c3	R	R	R	I	R	I	I	R	S	R	NO

Amostras coletadas em 2002

N	Amica	Genta	Aztr	Cefep	Ceftaz	Cipro	Imi
601	R	R	I	I	S	I	S
602	R	R	R	R	R	R	R
603	S	S	S	S	S	S	S
604	S	I	S	S	S	S	S
605	S	S	S	S	S	S	S
606	R	R	R	R	R	R	R
607	S	S	S	S	S	S	S
608	S	S	S	S	S	S	S
609	R	R	I	R	R	R	R
610	S	S	S	NT	S	I	S
611	S	S	S	S	S	S	S
612	S	S	S	S	S	S	S
613	R	R	S	R	R	R	R
614	S	S	S	S	S	S	S
615	R	R	S	R	S	R	S
616	S	S	S	S	S	S	S
617	S	S	S	S	S	S	S
618	R	R	R	R	I	R	R
619	R	R	R	R	R	R	S
620	S	S	I	S	S	S	S
621	R	R	R	R	S	R	R
622	R	R	R	I	S	R	S
623	R	R	R	R	R	R	S
624	S	S	R	R	I	S	R
625	S	S	I	S	S	R	I
626	S	I	S	S	S	S	S
627	S	S	S	S	S	S	S
628	R	R	NT	R	R	R	S
629	R	R	R	R	R	R	S
630	S	S	S	S	S	S	S
631	S	S	S	S	S	S	S
632	R	R	R	R	S	R	S
633	R	R	I	R	S	R	R
634	S	S	I	S	I	S	S
635	R	S	S	S	S	S	S
636	R	R	I	R	R	R	R
637	R	R	R	R	I	R	R
638	S	S	S	S	S	S	S
639	R	R	R	R	S	R	S
640	S	S	S	S	S	S	S

ANEXO 3 – PESQUISA DE METALO-BETA-LACTAMASE (M-βla,).

Resistência a ceftazidima e/ou imipenem pode ser devido a produção de M-βla, já que esta enzima confere resistência a todos os beta lactâmicos, com exceção do aztreonam (Bush, 1998; Arakawa et al., 2000; Livermore, 2001). No entanto, uma amostra produtora de M-βla, também pode ser resistente ao aztreonam através de outro mecanismo. Deste modo, o critério para seleção de amostras a serem testadas pode ser a resistência a qualquer destes agentes, independentemente do resultado para aztreonam.

O teste pode ser realizado utilizando a metodologia descrita por Arakawa et al. (2000), utilizando o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) como inibidor da enzima que fornece resultados mais claros que outros inibidores. Como substrato são utilizados discos comerciais contendo 30 µg de ceftazidime (CAZ), já que produtores de M-βla, normalmente apresentam resistência de alto nível (MIC>64µg/mL) para este agente.

Suspensões com concentração equivalente a 10⁶ UFC/mL são semeadas na superfície de placa de agar Mueller-Hinton, onde são colocados dois (2) discos de CAZ, a uma distância de 5 cm. Próximo a um dos discos de CAZ é colocado um disco de papel de filtro ao qual é acrescentado 3 µl de solução 1,2g/mL de 2-MPA. A placa é incubada por 16-18 h em estufa bacteriológica. A observação de aparecimento ou de aumento do tamanho do halo de inibição ao redor do disco de CAZ próximo do disco de 2-MPA é considerado indicativo da produção de M-βla,.

A metodologia descreve distâncias variadas entre discos de CAZ e 2-MPA, desde 1 até 2,5 cm centro a centro. Foi padronizada a distância de 2 cm centro a centro, considerando que distâncias menores deixam pequeno espaço entre os discos e podem confundir ausência de crescimento causada pela ação inibitória do 2-MPA com a ação da M-βla,.

Resultado dos testes de M- β la, nas amostras resistentes ao imipenem e/ou ceftazidime, classificadas por produção de M- β la,, resistência a ceftazidime (CAZ) e ao Imipenem (IMI).

Paciente /amostra	M- β la,	CAZ	IMI	ATM	AMI	GE	CEF	CIP	TIC
618	P	I	R	R	R	R	R	R	NT
39	P	R	R	S	R	R	R	R	R
221	P	R	R	R	R	R	R	R	R
224	P	R	R	R	R	R	R	R	R
606	P	R	R	R	R	R	R	R	NT
609	P	R	R	I	R	R	R	R	NT
613	P	R	R	S	R	R	R	R	NT
636	P	R	R	I	R	R	R	R	NT
623	P	R	S	R	R	R	R	R	NT
15	P	S	I	I	R	R	S	R	R
101	P	S	I	S	S	S	S	S	S
106	P	S	I	S	S	S	S	S	R
20	P	S	R	I	R	R	I	R	R
103	P	S	R	S	S	R	S	R	S
100	N	I	R	I	S	S	S	S	R
624	N	I	R	R	S	S	R	S	NT
637	N	I	R	R	R	R	R	R	NT
119	N	R	R	S	S	S	S	S	S
602	N	R	R	R	R	R	R	R	NT
2	N	R	S	S	S	S	S	S	S
10	N	R	S	I	R	R	I	R	R
64	N	R	S	I	S	S	S	S	R
111	N	R	S	I	R	R	S	R	R
532	N	R	S	R	R	R	S	R	NT
619	N	R	S	R	R	R	R	R	NT
628	N	R	S	NT	R	R	R	R	NT
629	N	R	S	R	R	R	R	R	NT
62	N	S	R	I	R	R	S	R	R
76	N	S	R	I	S	S	S	S	S
118	N	S	R	S	S	S	S	S	S
120	N	S	R	S	S	S	S	S	S
226	N	S	R	R	R	R	S	R	S
504	N	S	R	R	R	R	I	R	NT
621	N	S	R	R	R	R	R	R	NT
633	N	S	R	I	R	R	R	R	NT

ANEXO 4 - TESTES DE BIOTIPAGEM

* UTILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM MEIO DE ASS :

Meio de ASS preparado segundo Cowan (1974) (não existe comercialmente).

Preparo do meio: Dissolver os sólidos na água e adicionar o indicador. Autoclavar por 20 minutos. Deixar o meio basal esfriar a cerca de 60°C e adicionar o açúcar como solução estéril para uma concentração final de 1%. Misturar e distribuir em tubos estéreis. Solidificar inclinado. Inocular a superfície inclinada. Incubar por até 72 horas a 35° C.

Leitura: A utilização do carboidrato gera ácidos com mudança de coloração para amarelo devido a viragem do indicador de pH. Positivo = amarelo. Negativo = púrpura.

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1g
KCl	0,2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
Extrato de levedo	0,2g
Ágar	20g
Água destilada	1000 ml
Púrpura de bromocresol solução 0,2%	4 ml

* UTILIZAÇÃO DA URÉIA

Meio de Christensen's: detecta a hidrólise da uréia através da alcalinização devido a produção de amônia. Incubar por 24-72 horas. A reação pode ocorrer em poucas horas.

Leitura: positivo = coloração rosa intensa.

Controles: positivo forte - *Proteus spp*, fraco - *Klebsiella*. Negativo - *E.coli*.

* HEMÓLISE

Objetivo: observação de reação hemolítica em agar-sangue de carneiro.

Leitura: incubar por 24 horas a 35° C. observar hemólise sob luz transmitida.

* DETECÇÃO DE PIGMENTO

Observação da produção de pigmento em meio sem corante (Mueller-Hinton).

Leitura: observar a produção de pigmento após 24 horas de incubação.

Em caso de dúvida incubar por mais 24 horas a temperatura ambiente (cerca de 22° C).

TESTES DE BIOTIPAGEM NAS AMOSTRAS ANALISADAS

Paciente /amostra	Biótipo	Uréia	Manitol	Galactose	Manose	Ramnose	Pigmento	Hemólise
1	1	+	+	+	+	-	V	beta
2	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
4	1	+	+	+	+	-	V	beta
5	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
6	1	+	+	+	+	-	V	beta
7	2	-	+	+	+	-	V	beta
8	2	-	+	+	+	-	V	beta
9	1	+	+	+	+	-	V	beta
10	1	+	+	+	+	-	V	beta
11	1	+	+	+	+	-	V	beta
12	1	+	+	+	+	-	V	beta
13	2	-	+	+	+	-	V	beta
14	2	-	+	+	+	-	V	beta
15	3	+	-	+	+	-	V	beta
16	1	+	+	+	+	-	V	beta
17	1	+	+	+	+	-	V	beta
18	1	+	+	+	+	-	V	beta
19	1	+	+	+	+	-	V	beta
20	1	+	+	+	+	-	V	beta
21	1	+	+	+	+	-	V	beta
22	10	+	-	+	+	-	Sem	alfa
23	11	+	+	+	+	+	V	alfa
24	1	+	+	+	+	-	V	beta
25	1	+	+	+	+	-	V	beta
26	1	+	+	+	+	-	V	beta
27	2	-	+	+	+	-	V	beta
28	1	+	+	+	+	-	V	beta
29	1	+	+	+	+	-	V	beta
30	1	+	+	+	+	-	V	beta
31	1	+	+	+	+	-	V	beta
32	1	+	+	+	+	-	V	beta
33	1	+	+	+	+	-	V	beta
34	2	-	+	+	+	-	V	beta
35	1	+	+	+	+	-	V	beta
36	1	+	+	+	+	-	V	beta
37	1	+	+	+	+	-	V	beta
38	1	+	+	+	+	-	V	beta
39	1	+	+	+	+	-	V	beta
40	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
221	1	+	+	+	+	-	V	beta
223	1	+	+	+	+	-	V	beta
224	1	+	+	+	+	-	V	beta
226	1	+	+	+	+	-	V	beta
227	1	+	+	+	+	-	V	beta

Paciente /amostra	Biótipo	Uréia	Manitol	Galactose	Manose	Ramnose	Pigmento	Hemólise
41	1	+	+	+	+	-	V	beta
42	1	+	+	+	+	-	V	beta
43	6	+	+	+	+	-	V	alfa
44	1	+	+	+	+	-	V	beta
45	1	+	+	+	+	-	V	beta
46	1	+	+	+	+	-	V	beta
47	1	+	+	+	+	-	V	beta
48	5	+	+	+	+	-	Amar	beta
49	1	+	+	+	+	-	V	beta
50	1	+	+	+	+	-	V	beta
51	1	+	+	+	+	-	V	beta
52	1	+	+	+	+	-	V	beta
53	1	+	+	+	+	-	V	beta
54	1	+	+	+	+	-	V	beta
55	1	+	+	+	+	-	V	beta
56	1	+	+	+	+	-	V	beta
57	1	+	+	+	+	-	V	beta
58	1	+	+	+	+	-	V	beta
59	1	+	+	+	+	-	V	beta
60	1	+	+	+	+	-	V	beta
61	1	+	+	+	+	-	V	beta
62	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
63	5	+	+	+	+	-	Amar	beta
64	1	+	+	+	+	-	V	beta
65	1	+	+	+	+	-	V	beta
66	1	+	+	+	+	-	V	beta
67	1	+	+	+	+	-	V	beta
68	1	+	+	+	+	-	V	beta
69	1	+	+	+	+	-	V	beta
70	1	+	+	+	+	-	V	beta
71	1	+	+	+	+	-	V	beta
72	1	+	+	+	+	-	V	beta
73	1	+	+	+	+	-	V	beta
74	1	+	+	+	+	-	V	beta
75	1	+	+	+	+	-	V	beta
76	6	+	+	+	+	-	V	alfa
77	1	+	+	+	+	-	V	beta
78	1	+	+	+	+	-	V	beta
79	1	+	+	+	+	-	V	beta
80	1	+	+	+	+	-	V	beta

Paciente / amostra	Biótipo	Uréia	Manitol	Galactose	Manose	Ramnose	Pigmento	Hemólise
90	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
91	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
92	1	+	+	+	+	-	V	beta
93	1	+	+	+	+	-	V	beta
94	1	+	+	+	+	-	V	beta
95	5	-	+	-	-	-	Sem	sem
96	1	+	+	+	+	-	V	beta
97	5	+	+	+	+	-	Amar	beta
98	8	+	+	+	+	-	Sem	beta
99	1	+	+	+	+	-	V	beta
100	6	+	+	+	+	-	V	alfa
101	9	+	+	+	-	-	V	beta
102	1	+	+	+	+	-	V	beta
103	3	+	-	+	+	-	V	beta
104	3	+	-	+	+	-	V	beta
105	2	-	+	+	+	-	V	beta
106	1	+	+	+	+	-	V	beta
107	10	+	-	+	+	-	Azul	beta
108	7	+	+	+	+	-	Azul	alfa
109	2	-	+	+	+	-	V	beta
110	1	+	+	+	+	-	V	beta
111	1	+	+	+	+	-	V	beta
112	1	+	+	+	+	-	V	beta
113	1	+	+	+	+	-	V	beta
114	1	+	+	+	+	-	V	beta
115	5	+	+	+	+	-	Amar	beta
116	1	+	+	+	+	-	V	beta
117	2	-	+	+	+	-	V	beta
118	3	+	-	+	+	-	V	beta
119	7	+	+	+	+	-	Amar	alfa
120	5	+	+	+	+	-	Amar	beta
121	4	+	+	+	+	-	Azul	beta
122	1	+	+	+	+	-	V	beta
123	6	+	+	+	+	-	V	alfa
124	5	+	+	+	+	-	Amar	beta
125	1	+	+	+	+	-	V	beta
126	1	+	+	+	+	-	V	beta
127	1	+	+	+	+	-	V	beta
128	1	+	+	+	+	-	V	beta
129	1	+	+	+	+	-	V	beta

+: positivo; -: negativo

V: verde; Amar: amarelo; Sem: sem pigmento

Beta: hemólise total; alfa: hemólise parcial; sem: anemolítico.

ANEXO 5 - TIPAGEM MOLECULAR

PROTOCOLO PARA PFGE DE *P. aeruginosa*

1ª ETAPA: Incorporação da bactéria nos blocos

1. Suspender crescimento em 1 ml tampão SE (turvação 15-20% no turbidímetro).
2. Colocar 300 µl de cada amostra em tubo eppendorf - deixar em BM 56° C.
3. Limpar moldes com álcool e água, colocar fita e rotular
4. Dissolver em microondas 0.1 agarose LM + 5 ml tampão SE. Manter BM 56° C.
5. Misturar 300 µl de gel em cada eppendorf. Dispensar no molde, colocar a 4° C até solidificar.

2ª ETAPA: LISE DA BACTÉRIA NOS BLOCOS

1. 1,5 ml de tampão de lise (proteólise) em cada tubo/frasco (Bijou) + 15 µl proteinase K
2. Colocar todos os moldes de 1 cepa em um Bijou.
3. Incubar 24 hs em BM a 56° C
4. Trocar o tampão por tampão TE. Deixar 4° C/30 minutos. Repetir 4 vezes.

Pode ser guardado vários meses em geladeira.

Na técnica do LEMC (São Paulo): antes da digestão lavar com DNS 4 x/1 h/T ambiente para evitar continuidade de ação da enzima. Pode ficar overnight DNS.

3ª ETAPA: DIGESTÃO DO DNA EM BLOCOS DE AGAROSE

1. Preparar tampão de digestão = para cada isolado usar 200 µl de tampão 10X diluído 1:10
 Cálculo = $200 \times n^{\circ} \text{ isolados} / 10 = \mu\text{l (volume) de tampão + água para total (n x 200}\mu\text{l)}$
 Ex. para 8 isolados: colocar em bijoux 1 440 µl de água + 160 µl de tampão descongelado.
2. Dispensar 98 µl em cada eppendorf + 1/3 do bloco. Manter o tampão restante na geladeira.
3. Deixar a 4° C por 30 minutos.
4. Descongelar a enzima em banho de gelo e misturar com o tampão restante.
 Utilizar *SpeI* 10 U/ isolado (1 µl contém 10 U). Ex. p/ 8 isolados: 8 µl de enzima no tampão restante
5. Colocar 98 µl da mistura em cada eppendorf . Incubar no mínimo de 5 h a 37° C em BM.

4ª ETAPA: PREPARO DO GEL

1. Em erlenmeyer de 500 ml: agarose + tampão TBE 0,5X. Microondas até dissolver (transparente). Não agitar demais. Cobrir com alumínio. Esperar o gel ficar a temperatura 56° C (termômetro).
2. Limpar material para molde com álcool, montar. Colocar o pente.
3. Colocar o gel no molde. Remover bolhas. Deixar a agarose restante (5 ml) a 56° C.
4. Deixar o gel a T ambiente pelo menos 30 minutos até solidificar. Colocar em geladeira.

5. Retirar o pente. Fazer registro da corrida e ordem dos isolados.

5ª ETAPA: COLOCAÇÃO DOS BLOCOS NO POÇOS

1. Colocar o bloco em placa e remover o excesso de líquido. Cortar pela metade.
2. Pegar o bloco com bisturi e colocar no poço, todos os blocos no mesmo lado do poço. Empurrar com alça até o fundo. Colocar marcador de PM (50-1000 kb) nos 2 cantos.
3. Fechar os poços com agarose que ficou em BM.

6ª ETAPA: CORRIDA E LEITURA

1. Colocar o gel no tanque, cobrir com 2 litros TBE 0,5x (gelado)
2. Ligar : 1º a bomba; 2º o controle de temperatura; 3º o módulo de controle.
3. Pulso inicial 5 seg., final 50 seg.; Voltagem 5,9 v/cm. Tempo total 22 h. Temperatura 14º C.
4. Ligar quando a temperatura já estiver em 14º C.
5. Desligar na ordem inversa. Reduzir a voltagem antes de desligar.
6. Colocar o gel em recipiente com água e brometo de etídio a 1 µg/ml (500ml água + 50 µl de brometo). Deixar 1 h, T ambiente no escuro. Lavar o gel com água, 2-3 vezes de 30 min.
7. Observar em u.v. Foto com o gel ocupando todo o espaço.

Inativação do brometo: Colocar em recipiente com carvão ativo. Deixar alguns dias. Filtrar. Colocar o líquido na pia. Colocar o filtro em recipiente para material contaminado.

REATIVOS:

TAMPÃO SE

Dissolver 4,38g NaCl + 9,3g EDTA Na₂ em 900 ml de água. Ajustar pH 7,5.

Completar volume para 1 litro. Esterilizar em autoclave. Guardar a 4º C.

TAMPÃO DE LISE ou PROTEÓLISE

Dissolver 3,3g de N lauryl sarcosine + 18,6 g EDTA Na₂ em 80 ml de água, adicionar 10 ml de NaOH 10M para dissolver o EDTA. Ajustar o pH para 9,5 e completar volume 100 ml.

Esterilizar por filtração. Guardar a temperatura ambiente.

PROTEINASE K

Fazer solução estoque 50 mg/ml em água: Dissolver o conteúdo liofilizado do frasco (100 mg) em 2 ml água. Dividir em alíquotas de 200 µl . Congelar. Para uso: 15 µl da solução estoque + 1,5 ml de tampão. Concentração final: 500 µg/ml.

TAMPÃO TE

Dissolver 1,21 g TRIS + 3,72 g EDTA Na₂ em 900 ml de água. Ajustar pH 7,5. Completar volume 1 litro. Esterilizar em autoclave. Guardar na geladeira.

GENÓTIPO DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Paciente/a mostra	Genótipo	Paciente/ amostra	Genótipo	Paciente/ amostra	Genótipo
1	U	42	H	90	AJ
2	M	43	CM	91	AK
8	N	44	CS	92	AL
9	O	46	CT	93	AL
10	W	47	CX	94	AM
11	Br	51	CF	95	BX
12	Q	56	CQ	96	AO
14	P	57	BH	97	AP
15	L	61	BM	99	BQ
17	Z	62	I	100	D
18	Y	64	AC	101	D
19	R	66	BI	102	AD
20	C	67	BM	103	F
21	AA	69	J	104	F
22	AB	71	BK	105	BD
23	K	73	BL	106	D
25	AS	74	BJ	107	T
26	AU	76	G	108	BE
28	AT	79	BP	109	BF
30	BS	80	CR	110	BA
31	AV			111	BG
32	AX			112	BC
35	AZ			116	CP
39	C1			118	E
221	B1			119	D
223	A			120	D
224	B1			124	CD
226	A			125	AQ
227	B			126	AR
				127	N
				128	CA