

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

**Avaliação da produção de β -lactamases em
Pseudomonas aeruginosa obtidas de dois Hospitais
de Porto Alegre**

Ana Lúcia Saraiva Gonçalves
Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth
Dissertação de Mestrado
2005

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

Avaliação da produção de β -lactamases em
***Pseudomonas aeruginosa* obtidas de dois Hospitais**
de Porto Alegre

Ana Lúcia Saraiva Gonçalves
Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth
Dissertação de Mestrado
2005

Gonçalves, Ana Lúcia Saraiva

Avaliação da produção de β -lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de dois Hospitais de Porto Alegre/

Ana Lúcia Saraiva Gonçalves. – Porto Alegre, 2005.

vii, 88f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas.

1. *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Resistência Bacteriana
3. β -lactamases

AGRADECIMENTOS

A Deus que dá o sentido da minha vida.

Ao Prof. Dr Afonso Luís Barth pela sábia orientação e oportunidade de crescimento profissional neste e em outros trabalhos.

Aos meus pais Ivan e Cármen Lúcia pelo amor incondicional, presença e estímulo constantes na minha vida.

Aos meus irmãos pelo amparo e carinho em todos os momentos.

As minhas cunhadas pela amizade e incentivo.

A toda minha família pelo amor e apoio.

Ao Dr Carlos Voegeli pela amizade e pelos seus ensinamentos os quais contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos colegas do Setor de Bacteriologia do Laboratório Central da Santa Casa de Porto Alegre pelo incentivo, amizade e compreensão pelos momentos nos quais estive ausente para a execução deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório Central da Santa Casa de Porto Alegre em especial à Marisa e Rejane pela amizade e incentivo.

Aos professores Cícero Dias e Pedro D'Azevedo que me estimularam para ingressar nesta caminhada.

A todos os meus amigos em especial à Juliana e Ionara pela amizade, paciência e apoio constantes.

Aos amigos Patrick, Andreza e Larissa pela amizade e parceria, além do auxílio técnico na realização da tipagem molecular.

Às instituições que contribuíram para execução deste trabalho: Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se. [...]
Um homem sozinho pode ser vencido, mas dois conseguem defender-se. Um cordão de três dobras não se rompe com facilidade.
Eclesiastes 4.9,12.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DA LITERATURA	12
Características do Gênero	12
Patogenicidade da <i>P. aeruginosa</i>	14
Epidemiologia e importância clínica da <i>P. aeruginosa</i>	16
Resistência aos antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i>	18
Métodos de detecção de β -lactamases em amostras de <i>P. aeruginosa</i>	29
Tipagem molecular <i>P. aeruginosa</i>	33
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	35
OBJETIVOS.....	48
ARTIGO	49
Evaluation of β -lactamases in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> from two university hospitals in southern Brazil.....	50
Versão em português do artigo: Avaliação da presença de β -lactamases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em dois hospitais universitários no sul do Brasil....	70
ANEXO – Termo de Compromisso para Utilização de Dados.....	89

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
CTX	Cefotaxima
CAZ	Ceftazidima
CPM	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
CIP	Ciprofloxacina
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
LPS	Lipopolissacarídeo de superfície
M β la	Metalo- β -lactamase
MH	Müller Hinton
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PIP/TAZ	Piperacilina-Tazobactam
PFGE	Gel de Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado
TIM	Ticarcilina-Clavulanato
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo freqüentemente isolado em infecções hospitalares, principalmente em pneumonias nosocomiais (Linch, 2001). Esta bactéria está amplamente distribuída no meio ambiente e por causa desta capacidade torna-se um problema principalmente em ambientes hospitalares, pois permanece nos sistemas utilizados para respiração artificial em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), assim como soluções aquosas (Kiska *et al*, 1999). Ao mesmo tempo, a *P. aeruginosa* é capaz de produzir diversos fatores de virulência, os quais estão fortemente relacionados com o potencial desta bactéria de causar doenças (Pitt *et al*, 1997).

A importância da *P. aeruginosa* como relevante patógeno hospitalar está relacionada a sua resistência a agentes antimicrobianos. Resistência intrínseca é expressa em graus variáveis por todos isolados de *P. aeruginosa*, os quais são menos susceptíveis que enterobactérias para a maioria dos antibióticos (Livermore, 2001). Além disso, *P. aeruginosa* produz β -lactamases, enzimas com capacidade de hidrolizar os antibióticos β -lactâmicos, os quais são as bases no tratamento de infecções causadas por essa bactéria (Nordmann, 2003). No entanto, outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem estar presentes, tais como perda de permeabilidade da membrana externa e sistema de efluxo ativo, conferindo assim um perfil de resistência a diversos agentes antimicrobianos (Livermore, 2001).

A disseminação dessas cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes no ambiente hospitalar, principalmente em UTI, tem sido analisada pelos programas que monitoram a prevalência e os padrões de resistência de microorganismos em

infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, como o “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”. Este programa analisou, entre 1997 e 2001, diversos patógenos isolados na América Latina, incluindo o Brasil, e relatou que a *P. aeruginosa* foi a terceira e quinta bactéria mais freqüentemente isolada em geral e de bacteremias, respectivamente (Sader *et al*, 2004).

As cefalosporinas de amplo espectro, ceftazidima e cefepime em particular, assim como os carbapenêmicos, imipenem e meropenem, sempre foram uns recursos para o tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa*. No entanto, este bacilo tem a capacidade de adquirir resistência durante a terapia (Livermore *et al*, 2001). Uma β -lactamase do tipo cromossômica e induzível, denominada AmpC (Bush *et al*, 1995) induz resistência a todos os β -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos. A resistência aos antibióticos β -lactâmicos está relacionada à presença de outras β -lactamases, além da AmpC, como β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e metalo- β -lactamases (M β la). Assim, diversos estudos sobre a resistência em *P. aeruginosa* e a disseminação dessas enzimas têm sido publicados na Europa (Cornaglia *et al*, 2000; Lagatolla *et al*, 2004; Luzzaro *et al*, 2004; Pagani *et al*, 2004), na Ásia (Jones *et al*, 2004a) na América do Norte (Jones *et al*, 2004b; Rhomberg *et al*, 2004), na América Latina (Toleman *et al*, 2002; Sader *et al*, 2005) e, inclusive, no Brasil (Gales *et al*, 2003; Poirel *et al*, 2004). Isto indica que a emergência de *P. aeruginosa* resistentes aos β -lactâmicos tem se tornado uma questão global.

Em vista disso, alguns métodos têm sido propostos para detecção de AmpC, ESBL e metalo- β -lactamases (Arakawa *et al*, 2000; Livermore *et al*, 2001; Luzzaro *et*

al, 2001). Porém a diversidade de β -lactamases do tipo ESBL, encontradas na *P. aeruginosa* dificultam sua detecção através de métodos fenotípicos, os quais possam ser aplicáveis na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica (Mugnier, 1996). Ao contrário, a detecção de metalo- β -lactamases pode ser feita com um método relativamente simples o qual apresenta resultados claros (Arakawa *et al*, 2000)

Portanto, o reconhecimento laboratorial destas β -lactamases e suas implicações clínicas tornam-se cada vez mais relevantes em *P. aeruginosa*. Este estudo teve a finalidade de avaliar, através de testes fenotípicos, a presença de AmpC, metalo- β -lactamases e ESBL em amostras clínicas de *P. aeruginosa* obtidas de duas estruturas hospitalares independentes em Porto Alegre. Além disso, analisar a epidemiologia molecular das amostras produtoras dos diferentes mecanismos de resistência.

REVISÃO DA LITERATURA

Características do Gênero

O gênero *Pseudomonas* spp. pertence à família *Pseudomonadaceae* e é composto por bastonetes Gram-negativos aeróbios, não formadores de esporos, móveis devido a presença de flagelo polar, que crescem em MacConkey e são catalase e oxidase positivos. As espécies deste gênero se caracterizam por sua incapacidade de fermentar os açúcares, embora a maioria das cepas degrade oxidativamente a glicose. São bactérias nutricionalmente versáteis, capazes de utilizar ampla variedade de substratos, cuja temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37° C, embora se multipliquem em temperaturas baixas (Kiska *et al*, 1999).

Dois esquemas para classificar os organismos que pertencem à família *Pseudomonadaceae* foram propostos. Um deles, popularizado por Gilardi, é baseado nas características fenotípicas e divide em sete grandes grupos: *P.fluorescente*, *P.stutzeri*, *P.alcaligenes*, *P.pseudomallei*, *P.acidovorans*, *P.facilis-delafieldii* e *P.diminuta*. Um segundo esquema, desenvolvido por Palleroni, é baseado em estudos de homologia de rRNA-DNA separando em grupos de um à cinco.

Um esquema que combina a classificação fenotípica de Gilardi e a genotípica de Palleroni classifica a *Pseudomonas aeruginosa* como Grupo RNA I, Grupo Fluorescente, o qual também inclui as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*.

As colônias de *P. aeruginosa* em meios de cultura não seletivos podem apresentar seis formas diferentes, desde colônia plana e difusa, característica da maioria dos isolados clínicos até colônias bem diminutas. (Koneman *et al* 1997).

P. aeruginosa produz no mínimo quatro pigmentos distintos: piocianina (azul), pioverdina (amarelo - esverdeado), piorrubrina (vermelho) e piomelanina (marrom escuro). A piocianina é um pigmento solúvel em água e clorofórmio e é encontrada em aproximadamente 80% das amostras. Sua produção é estimulada pela presença de glicerol, magnésio, potássio e ferro. A pioverdina é solúvel em água, mas não em clorofórmio e é encontrada em outras espécies fluorescentes de *Pseudomonas*. A piorrubrina é solúvel em água e insolúvel em clorofórmio e a piomelanina difere quimicamente da melanina animal. Os últimos dois pigmentos citados são produzidos por menos de 2% dos isolados clínicos (Visca *et al*, 1992).

A confirmação da identificação da espécie *P. aeruginosa* pode ser realizada pela oxidação da glicose em meio basal, produção da arginina dehidrolase, crescimento à 42⁰C, redução do nitrato em nitrito e inabilidade de utilizar a maltose em meio de amônia com sais e açúcares (Koneman *et al*, 1997).

Patogenicidade da *P. aeruginosa*

Devido a sua importância como patógeno hospitalar *P. aeruginosa* é a espécie mais estudada dentro do gênero (Kiska & Gilligan, 1999). Este bacilo Gram-negativo é capaz de crescer e sobreviver em praticamente qualquer ambiente, permanecendo viável por longos períodos na água, solo e vegetação. Em hospitais, *P. aeruginosa* podem colonizar pias e canos (Widmer *et al*, 1993). Esta espécie tem sido isolada de uma variedade de soluções aquosas, incluindo desinfetantes e sabões, soluções oculares e fluidos de irrigação ou diálise.

Esta bactéria também pode ser detectada em grande número de esgotos comunitários (Römling *et al*, 1994). No entanto, *P. aeruginosa* raramente causa infecções adquiridas na comunidade em pacientes imunocompetentes. Para iniciar a infecção, a bactéria requer um rompimento substancial da primeira linha de defesa, a barreira cutânea, como ocorre no trauma, na cirurgia e em queimaduras profundas. Em outras situações onde ocorre alteração da mucosa, como o desequilíbrio da flora gastrointestinal normal, devido ao uso de antibióticos ou alteração dos mecanismos imunológicos de defesa, como consequência de neutropenia induzida na quimioterapia, AIDS e diabetes mellitus também favorecem a infecção por *P. aeruginosa*. O primeiro passo para infecção pela *P. aeruginosa* é a colonização do epitélio alterado (Delden *et al*, 1998).

P. aeruginosa produz várias substâncias que aumentam a colonização e infecção do hospedeiro. Estas substâncias juntamente com uma variedade de fatores de virulência, incluindo o LPS (Lipopolissacarídeo de superfície), exotoxina A, leucocidina, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas, fazem da *P.*

aeruginosa a bactéria de maior significado clínico entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores (Koneman *et al*, 1997).

Um morfotipo colonial incomum, mucóide, de *P. aeruginosa* é freqüentemente encontrado em secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística que estão cronicamente infectados por esta bactéria. O morfotipo mucóide ocorre devido à produção de grande quantidade de um polissacarídeo extracelular, denominado alginato. A produção de alginato está associada ao mau prognóstico e alto índice de mortalidade entre os pacientes com fibrose cística (Koneman *et al*, 1997).

Cabe destacar que a patogênese da *P. aeruginosa* é multifatorial, realçada por um grande número de fatores de virulência e um amplo espectro de doenças causadas por esta bactéria (Delden *et al*, 1998).

É considerado um patógeno oportunista que causa bacteremia em pacientes imunocomprometidos e vítimas de queimaduras, além de infecções urinárias iatrogênicas e pneumonias adquiridas em hospital, principalmente em pacientes de UTI (Pollack, 2000).

Além disso, acima de 50% dos pacientes hospitalizados são população de alto risco para colonização pela *P. aeruginosa* (Delden *et al*, 1998). Sendo que vários surtos de *P. aeruginosa* foram associados com sua presença em respiradores (Kiska *et al*, 1999).

Epidemiologia e importância clínica da *P. aeruginosa*

Durante os últimos 50 anos a *P. aeruginosa* tem mostrado seu potencial como patógeno humano devastador, principalmente em pacientes com graves doenças de base e com tratamento antimicrobiano prévio (Bouza, 2003). Assim, pacientes hospitalizados em UTI são de particular risco para aquisição de infecções nosocomiais por *P. aeruginosa*. A necessidade de realizar procedimentos invasivos, comprometendo as mucosas e barreiras cutâneas, além de extensos períodos de internação, entre outros fatores, contribui para a aquisição de infecções nosocomiais.

Em ambientes hospitalares, a exposição a diversos agentes antimicrobianos pode criar condições para seleção de resistência entre a flora bacteriana do hospedeiro ou para transmissão de patógenos. Conseqüentemente, a transferência de pacientes entre unidades de internação no hospital pode proporcionar a introdução de novos e, muitas vezes, altamente resistentes clones para dentro da UTI (Streit *et al*, 2004).

Dados de 1997 a 2001 do “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”, programa que monitora a prevalência e os padrões de resistência de microorganismos em infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade na América Latina, incluindo o Brasil, relatam que a *P. aeruginosa* foi a bactéria mais freqüentemente isolada no trato respiratório (43,3%) e na corrente circulatória (31,7%) (Sader *et al*, 2004). De acordo com um estudo do programa “MYSTIC Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection”, a *P. aeruginosa* foi responsável por 11,4% das infecções em pacientes internados em UTI no Brasil (Mendes *et al*, 2000). Particularmente em pacientes necessitando prolongada

ventilação mecânica, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*, os quais são resistentes a diversos antibióticos, estão envolvidos em 30 a 50% das pneumonias hospitalares (Linch, 2001).

Em outro levantamento realizado pelo Programa SENTRY em 2001, na América do Norte, a *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno (12,2%) isolado entre as demais bactérias encontradas em todas amostras clínicas provenientes de infecções em pacientes de UTI (Streit *et al*, 2004). Infecções por *P. aeruginosa* são caracteristicamente associadas com alto índice de mortalidade. Por exemplo, bacteremia causada por esta bactéria relacionada à pneumonia está associada com um índice de mortalidade aproximado de 70% (Hilf, 1989).

A frequência dos patógenos que causaram infecção do trato urinário em pacientes hospitalizados na América Latina, incluindo o Brasil, entre 1997 e 2000 foi relatada pelo Programa SENTRY, sendo que o número de isolados coletados entre 1997 e 1999 foi comparado com os de 2000. Nos dois períodos a *P. aeruginosa* foi o terceiro patógeno (8%-6,2%) mais freqüente causando infecção do trato urinário nosocomial, antecedido apenas pela *E.coli* (56,0%-60,3%) e *Klebsiella* spp. (11,6%-11,5%) (Gales *et al*, 2002).

Embora *P. aeruginosa* seja relativamente infreqüente como causa de infecções adquiridas na comunidade, a osteomielite de pé e otite externa invasiva entre diabéticos devido à *P. aeruginosa* são muito comuns (Laughlin *et al*, 1997). Pacientes com AIDS têm sido identificados, nos últimos anos, como um novo grupo de pacientes de risco para infecções adquiridas na comunidade por *P. aeruginosa* (Flores *et al*, 1993 & Mendelson *et al*, 1994).

Resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*

A ampla resistência, tanto intrínseca quanto adquirida, a muitos antibióticos utilizados na prática médica contribui para a alta “patogenicidade” da *P. aeruginosa*. As bactérias deste gênero podem apresentar altas taxas de resistência a maioria dos antimicrobianos normalmente utilizados no ambiente hospitalar. As opções terapêuticas incluem aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, penicilinas de amplo espectro, monobactâmicos, ceftazidima, cefalosporinas de quarta geração e carbapenens. Uma das recomendações para a antibioticoterapia no tratamento das infecções causadas pela *P. aeruginosa* é o uso de associação incluindo um β -lactâmicos e um outro antibiótico, comumente um aminoglicosídeo ou quinolona, sendo que os β -lactâmicos são a base da associação escolhida. (Nordmann, 2003).

A resistência da *P. aeruginosa* aos antibióticos β -lactâmicos pode decorrer da ação de mecanismos enzimáticos, como a produção de β -lactamases, por meio da ativação de sistemas de impermeabilidade da membrana externa, relacionada as porinas (Hancock, 1998; Livermore, 2001) e, também através da expulsão de antimicrobianos para fora da célula bacteriana, chamado de bomba de efluxo (Livermore, 2001; Nordamnn, 2003). Eventualmente, mais de um mecanismo pode estar presente, resultando em um perfil de resistência amplo a todos os β -lactâmicos, sendo a produção de β -lactamases o mecanismo mais estudado nas últimas décadas.

P. aeruginosa, junto com algumas enterobactérias, como *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e *Yersinia enterocolitica* possuem uma cefalosporinase do tipo cromossômica e induzível,

denominada AmpC (Bush *et al*, 1995). Esta enzima, quando expressa em baixos níveis, confere resistência para a amoxicilina e as cefalosporinas de 1^a e 2^a geração, cefalotina e cefoxitina respectivamente. Além disso, a AmpC, comumente denominada cefalosporinase, não é inibida pelos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, conferindo adicionalmente resistência para o antibiótico combinado, como amoxicilina ou ampicilina.

A hiperprodução dessa cefalosporinase é o mecanismo mais comum para aquisição de resistência a cefalosporinas de 3^a geração. Ocorre uma desrepressão permante e estável do gene da cefalosporinase, junto a uma mutação de um gene regulador. Sendo que a utilização dos antibióticos em monoterapia é um dos fatores que favorece o desenvolvimento desse mecanismo. Com exceção dos carbapenêmicos, ela induz uma resistência a todos os β -lactâmicos. No entanto, os níveis de resistências as cefalosporinas de 3^a e 4^a geração podem ser variáveis. Atualmente, a hiperprodução de cefalosporinases encontra-se entre 7,0 e 15% das cepas. (Nordmann, 2003).

Além da AmpC, diversas β -lactamases têm sido descritas em *P. aeruginosa*. Estas enzimas são derivadas de penicilinas (β -lactamases classe A de Ambler), metalo β -lactamases (classe B de Ambler) ou oxacilinas (classe D de Ambler) (tabela1). As enzimas da classe A, C e D (segundo Ambler) são serinas β -lactamases e atuam sobre o antibiótico, rompendo o anel β -lactâmico por um mecanismo de hidrólise com conseqüente inativação da droga. As β -lactamases da classe B utilizam íons zinco para romper o anel β -lactâmico e inativar o antibiótico

(Rossi et al, 2005). Várias delas conferem alto grau de resistência para cefalosporinas de 3^a geração como a ceftazidima (Nordmann *et al*, 1998).

Tabela 1- Esquema de Classificação para β -lactamases (1)

Grupo de Bush	Classe Molecular de Ambler	Substrato Preferido	Inibição pelo Ac. Clavulânico (inibidor de β -lactamase)	Enzimas Representantes
1	C	Cefalosporinas	Não	Enzimas AmpC de bactérias Gram-negativas
2a	A	Penicilinas	Sim	Penicilinases de bactérias Gram-positivas
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	Sim	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, 2 ^a e 3 ^a geração, monobactams	Sim	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>K.oxytoca</i> K1
2br	A	Penicilinas	Variável	TEM-30 até TEM-36
2c	A	Penicilinas, Carbenicilina	Sim	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilina, Oxacilina	Variável	OXA-1 a OXA-11, PSE-2 (OXA-2)
2e	A	Cefalosporinas	Sim	Cefalosporinases induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenens	Sim	NMC-A em <i>E.cloacae</i> e Sme-1 em <i>S.marcescens</i>
3	B	β -lactâmicos (inclusive carbapenens e exceto aztreonam)	Não	Metallo- β -lactamases em <i>P. aeruginosa</i> e L1 em <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
4	Não determinado	Penicilinas	Não	Penicilinase em <i>B.cepacia</i>

(1) Esquema proposto por Bush K. *et al.* A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas mediadas por genes plasmidiais, capazes de hidrolisar a cadeia oximino-lactâmica presente na estrutura química da droga, inativando β -lactâmicos de amplo espectro, como as cefalosporinas de terceira e quarta geração e monobactâmicos, mas não conferem resistência as cefamicinas e carbapenêmicos.

As ESBL da classe A de Ambler são em sua grande maioria, derivadas das enzimas TEM-1 ou SHV-1. As enzimas descritas posteriormente, apresentando as mesmas características, foram incorporando diferentes números a sua nomenclatura. Sendo assim, β -lactamases do tipo TEM são, muitas vezes, encontradas em *E.coli* e *K.pneumoniae*, mas também estão presentes em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2001). No entanto, Mugnier *et al* (1996) descreveram a presença de uma β -lactamase TEM-42 em *P. aeruginosa*. Assim ocorre, também, para a maioria das ESBL do tipo SHV, as quais foram encontradas inicialmente em isolados de *K.pneumoniae*, porém essas enzimas também já foram relatadas em outros gêneros de *Enterobacteriaceae* e em *P. aeruginosa* (Naas *et al*, 1999a).

Todavia, um pequeno número de ESBL, as quais não apresentam relação com nenhuma classe de ESBL já estabelecida, têm sido relatadas. As β -lactamases PER-1 e VEB-1 são exemplos destas enzimas, as quais foram isoladas em *P. aeruginosa* (Nordmann *et al*, 1993 & Naas *et al*, 1999b).

A emergência dos microorganismos produtores de ESBL tem grande importância clínica, pois este mecanismo é mediado por plasmídios, facilitando a transmissão horizontal (Livermore, 1995). Além disso, a presença de cepas

produtoras de ESBL acarreta implicações terapêuticas, porque a extensão do espectro de resistência para cefalosporinas de terceira e quarta geração impõe limites para utilização de drogas da classe dos β -lactâmicos, podendo aumentar a prescrição de carbapenêmicos (Bush, 1996).

O segundo grupo de β -lactamases em *P. aeruginosa* (classe B de Ambler), incluem as enzimas IMP e VIM, as quais são metalo-enzimas (utilizam íons zinco para rompimento do anel β -lactâmico) de origem cromossômica e plasmidial. Estas β -lactamases hidrolizam diversos antibióticos β -lactâmicos, incluindo ceftazidima e cefepima, mas não o aztreonam. E, por serem capazes de hidrolisar também o imipenem e meropenem, são denominadas carbapenemases. Clinicamente, constituem um problema muito maior porque são plasmídeo-mediadas e já foram relatadas em *Klebsiellae* que funcionam como vetores da resistência (Rossi *et al*, 2005).

A primeira metalo- β -lactamase plasmidial em *P. aeruginosa* do tipo IMP (IMP-1), foi descrita no Japão em 1991 (Watanabe *et al*, 1991). Atualmente, as metalo- β -lactamases estão disseminadas em diversas espécies bacterianas na Europa e nas Américas (Nordmann *et al*, 2002).

Nas últimas décadas, diversas carbapenemases derivadas da IMP-1 têm sido identificadas em *P. aeruginosa* as quais de se disseminaram no Japão e China, e posteriormente surgiram na Europa e Canadá. Posteriormente, foram caracterizadas enzimas tipo VIM, VIM-1 e VIM-2, inicialmente na Itália e França (Lauretti *et al*, 1999; Poirel *et al*, 2000), respectivamente, mas estas enzimas são também altamente

prevalentes na Coréia e Grécia (Giakkoupi *et al*, 2003; Oh *et al*, 2003; Tsakris *et al*, 2000).

Embora as metalo- β -lactamases mais conhecidas e estudadas sejam das famílias IMP e VIM, outros dois tipos de metalo- β -lactamases já foram descritos. No Brasil, outra família de carbapenemase, denominada SPM-1, foi identificada em *P. aeruginosa* isolada em São Paulo (Toleman *et al*, 2002). Posteriormente, foi descrita a presença desta metalo- β -lactamase em isolados de *P. aeruginosa* no Recife, Brasil (Poirel *et al*, 2004).

Na Alemanha em 2004 foi caracterizada uma nova metalo- β -lactamase a qual foi denominada GIM-1 (Castanheira *et al*, 2004).

O terceiro grupo de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) em *P. aeruginosa* são da classe D de Ambler. Estas enzimas são de difícil identificação na rotina do laboratório, pois são muitas vezes, fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. (Nordmann, 2003). As β -lactamases do tipo CARB - ou PSE (“*Pseudomonas*-specific enzyme”) também denominadas carbenicilinas (com exceção da PSE-2 ou OXA-10, a qual é de fato uma oxacilinase) foram encontradas inicialmente em *P. aeruginosa*, mas também foram identificadas em *Enterobacteriaceae*. Enquanto a maioria das ESBL tem sido encontrada em *E.coli*, *K.pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae*, as ESBL tipo OXA tem sido descritas principalmente em *P. aeruginosa*. Sete β -lactamases de espectro estendido já foram descritas, sendo cinco delas do tipo OXA, “oxacillin-hydrolyzing enzymes”: OXA-11, -14, -16, e -17. Essas enzimas são derivadas da OXA-10 (PSE-2), enquanto a OXA-15 é uma derivação da OXA-2 e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. No

entanto a OXA-18, a qual provém da OXA-9 e -12 têm atividade de hidrólise moderada para oxacilina e alta atividade contra cefalosporinas de amplo espectro. Esta atividade é inibida pelo ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam e imipenem (Philippon *et al*, 1997).

Novos membros do grupo ESBL tipo OXA têm sido descritas, porém sem atividade de espectro estendido: OXA-20, -22, -24, -25, -26, -27, e -30. Muitos destes novos membros desta família de β -lactamases têm sido encontrados em isolados bacterianos originados na Turquia e na França, assim como as demais oxacilinas descritas. Isto pode estar relacionado ao fato destes dois países representarem o foco de amostras que possuem essas enzimas, ou eles representam o centro de pesquisadores estudando essas β -lactamases (Bradford, 2001). Em um estudo realizado por Aubert e colaboradores (2001) na França, foi descrita uma oxacilinase, denominada OXA-31, a qual confere resistência a cefepima e susceptibilidade a ceftazidima em *P. aeruginosa*, uma propriedade não relatada anteriormente. Esta característica está relacionada com a ação da OXA-1 e também, muito provavelmente, com a ação de outra derivada da OXA-1, como a OXA-4. Desse modo, OXA-1 e derivados, podem hidrolisar seletivamente cefalosporinas como cefepima, e não ceftazidima e cefotaxima. *P. aeruginosa* produzindo OXA-1 e enzimas derivadas, apresentará na rotina laboratorial suscetibilidade a ceftazidima e resistência a cefepima, porém diferente dos isolados que produzem ESBL da classe A de Ambler, esse fenótipo pode ser relatado.

No entanto, a ceftazidima, a qual é menos hidrolizada pela β -lactamase da classe C de Ambler, pode se tornar mais sensível a ação da AmpC devido a um

sinergismo entre a alta desrepressão de β -lactamases e a baixa permeabilidade da membrana externa desta espécie. Nestes casos, as cefalosporinas de quarta geração são mais eficazes que a ceftazidima, devido a suas altas propriedades de penetração na membrana externa e baixa afinidade por β -lactamases (Cunha *et al*, 1995; Hancock, 1998).

Cabe ressaltar que, a resistência aos antibióticos β -lactâmicos também ocorre através de mecanismos não enzimáticos. O efluxo ativo do tipo MexA-MexB-OprM induz uma resistência ou uma diminuição da susceptibilidade a ticarcilina e ao aztreonam, enquanto que a susceptibilidade a piperacilina e ceftazidima é conservada (Nordmann, 2003). A proteína MexB é uma bomba de amplo espectro, localizada na membrana citoplasmática; a proteína OprM é a que provém uma porta de saída até a membrana externa e a proteína MexA une fisicamente esses componentes (Livermore, 2001).

A múltipla resistência aos demais antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, como quinolonas e aminoglicosídeos, também está relacionada à produção de enzimas, ativação das bombas de efluxo e alteração das porinas (Hancock, 1998; Kölher *et al*, 1998).

Em relação à aquisição de resistência ao imipenem, Troillet e colaboradores (1997) avaliaram os fatores de risco para o aparecimento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem. Eles concluíram que o uso prévio de outros β -lactâmicos não estava relacionado ao aparecimento de resistência ao imipenem, e que as cepas resistentes a imipenem podem permanecer sensíveis a outros β -lactâmicos. Neste estudo, somente 15% das cepas resistentes ao imipenem eram resistentes

também a ceftazidima. Essa dissociação pode ser explicada pelo fato dos carbapenens utilizarem uma porina específica (porina OprD). Como os outros β -lactâmicos utilizam outras porinas, a perda da porina OprD levaria a uma resistência maior aos carbapenens mesmo quando associada a hiperprodução de β -lactamases da Classe C.

Um levantamento do “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” relata uma diminuição na suscetibilidade para todos agentes antimicrobianos avaliados em infecções nosocomiais e adquiridos na comunidade da América Latina, incluindo o Brasil, conforme descrito na tabela 2 (Andrade *et al*, 2003). A prevalência de isolados resistentes para todos os agentes antimicrobianos tem aumentado continuamente desde o início do programa em 1997. Adicionalmente, têm sido descritas taxas de resistência levemente mais altas em isolados dos centros no Brasil (Sader *et al*, 2004).

Tabela 2 – Diminuição da suscetibilidade para 12 antibióticos entre *P. aeruginosa* isoladas na América Latina (SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2001) (adaptado de Andrade *et al*, 2003).

Antibióticos	% suscetibilidade por ano (nº de isolados)					OR (IC 95%) (1)
	1997 (335)	1998 (424)	1999 (371)	2000 (357)	2001(407)	
ceftazidima	66,6	64,4	65,8	59,7	56,3	1,39 (1,02-1,91)
cefepima	66,2	67,9	65,2	59,4	54,8	1,53 (1,12-2,09)
aztreonam	55,5	45,0	46,6	34,7	41,3	1,76 (1,30-2,39)
piperacilina	71,9	66,7	66,6	61,9	60,9	1,64 (1,19-2,27)
piperacilina-tazobactam	79,4	77,1	73,3	66,4	64,9	2,09 (1,48-2,96)
imipenem	77,1	76,7	73,6	70,6	62,2	2,07 (1,47-2,90)
meropenem	83,0	79,7	76,0	71,7	64,4	2,70 (1,88-3,89)
amicacina	77,7	73,3	69,0	65,0	65,4	1,84 (1,31-2,59)
gentamicina	63,6	61,8	60,1	56,9	49,6	1,77 (1,30-2,41)
ciprofloxacina	67,2	60,8	60,6	53,2	49,9	2,06 (1,51-2,81)
gatifloxacina	60,9	57,1	56,3	52,1	46,4	1,80 (1,33-2,44)
levofloxacina	63,6	59,0	59,3	53,5	49,6	1,77 (1,30-2,41)

(1) Valor P foi calculado pelo teste do Qui-quadrado; todos valores P foram < 0,001. OR e respectivo IC 95% referem-se a comparações entre 1997e 2001.

Métodos de detecção de β -lactamases em amostras de *P. aeruginosa*

A gravidade das infecções causadas pela *P. aeruginosa* acarreta a escolha de um tratamento eficaz o mais breve possível. A primeira escolha utilizada é a de um antibiótico β -lactâmico associado a um outro antibiótico, como aminoglicosídeos ou quinolonas. Mas o sucesso da terapêutica adotada depende também do conhecimento do(s) mecanismo(s) de resistência da cepa envolvida.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados no laboratório de rotina de microbiologia é o teste de disco difusão padronizado pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS). Este teste, no entanto, pode não detectar a resistência mediada por β -lactamases em *P. aeruginosa*. Além disso, mesmo que o teste de disco difusão possa detectar a resistência a determinados antibióticos por produção de β -lactamases, esta técnica não tem capacidade de estabelecer qual tipo de enzima está envolvida na resistência. Assim, outros testes laboratoriais baseados em métodos fenotípicos, ou seja, avaliam as características expressas pela bactéria, têm sido propostos para detecção de β -lactamases. (Arakawa *et al*, 2000; Livermore *et al*, 2001; Luzzaro *et al*, 2001).

O número restrito de métodos laboratoriais fenotípicos para bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose é um fator preocupante, principalmente em regiões onde a prevalência de *P. aeruginosa* apresentando múltipla resistência aos antimicrobianos é elevada. Além disso, a *P. aeruginosa* pode expressar, simultaneamente, mais de um mecanismo de resistência aos antimicrobianos, dificultando assim a interpretação do perfil fenotípico encontrado nos teste de suscetibilidade.

A presença de β -lactamases do tipo AmpC induzíveis pode ser observada, no laboratório de microbiologia de rotina, utilizando discos de β -lactâmicos indutores dessa enzima, como imipenem ou ceftazidima. Um disco do antibiótico indutor é colocado ao redor de ceftazidima (substrato). O efeito indutor da enzima AmpC é observado através de um achatamento no halo da ceftazidima (Livermore *et al*, 2001)

A diversidade de enzimas ESBL já relatadas em *P. aeruginosa* (TEM, PER, PSE, OXA) e as diferentes respostas frente a ação dos inibidores de β -lactamases, dificultam a obtenção de uma metodologia padronizada, a qual possa ser empregada na rotina laboratorial. Enquanto as β -lactamases do tipo TEM estão amplamente distribuídas entre as *Enterobacteriaceae*, são raros os relatos de isolamento desta enzima em *P. aeruginosa* (Mugnier *et al*, 1996).

A detecção de um fenótipo de resistência a ticarcilina e suscetibilidade a ticarcilina combinada com ácido clavulânico pode ser indicativo da presença de ESBL em *P. aeruginosa*. No entanto, a detecção de ESBL através de teste que utiliza discos combinados de cefalosporinas de amplo espectro e clavulanato, é sensível e específico apenas para detecção de ESBL em enterobactérias. Assim, o mesmo teste pode não ser aplicável para a detecção desta β -lactamase em *P. aeruginosa* (Weldhagen *et al*, 2003). Isto se deve, possivelmente, a alguns fatores como a hiperprodução de AmpC, a presença simultânea de metalo-enzimas (Docquier *et al*, 2001), de oxacilinases de espectro estendido (OXA-2, derivados da OXA-10 e OXA-18) (Philippon *et al*, 1997), ou ainda a combinação de mecanismos de resistência como impermeabilidade e efluxo. Segundo Weldhagem e

colaboradores (2003), testes positivos utilizando discos combinados são facilmente obtidos com amostras de *P. aeruginosa* PER-1 e VEB-1 positivas. Logo, a dificuldade para detectar outras ESBL em *P. aeruginosa* nos laboratórios de microbiologia clínica, através de testes fenotípicos, pode subestimar a verdadeira prevalência das β -lactamases.

Desde 1998, o NCCLS padronizou a metodologia para detecção de ESBL somente para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. O teste para ESBL é realizado em duas etapas, o teste de triagem e o confirmatório, os quais podem ser desenvolvidos através de disco difusão ou microdiluição (NCCLS, 2001).

No entanto na França, o “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie” publicou um teste de aproximação de discos para detecção de ESBL em *P. aeruginosa*. Este teste utiliza um disco contendo clavulanato, o qual é colocado a 2,0 cm dos discos de β -lactâmicos. O aumento ou distorção do halo (zona fantasma) ao redor dos discos de cefotaxima, cetazidima ou aztreonam indica a presença de uma ESBL. Porém, deve-se levar em conta a resposta variável à ação do inibidor de inibidor de β -lactamase sobre as enzimas ESBL que podem estar presentes em *P. aeruginosa*, conforme tabela 1.

Todavia, β -lactamases da Classe B, também denominadas metalo-enzimas, são detectadas através de um teste laboratorial fenotípico, proposto por Arakawa e colaboradores (2000). Utilizando substâncias que bloqueia a ação dessas β -lactamases zinco dependente, o teste permite avaliar a presença de metalo- β -lactamases em isolados de *P. aeruginosa* que apresentarem resistência aos

carbapenêmicos. e/ou ceftazidima. O método de aproximação de discos consiste em verificar a ação inibidora do ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) sobre a enzima, permitindo ação do substrato (ceftazidime), sobre a bactéria. 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-bla. Este teste de aproximação de discos é de fácil realização e tem sensibilidade e especificidade comparáveis ao PCR.

Tipagem molecular *P. aeruginosa*

Análise do DNA cromossômico através da técnica de macrorestrição seguida por eletroforese pulsada é considerada o melhor método para tipagem de *P. aeruginosa* (Römling *et al*, 1994; Tenover *et al*, 1995).

A bactéria é incorporada em gel de agarose para evitar quebras inespecíficas do cromossoma. Posteriormente é promovida a 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 separado através de eletroforese pulsada durante um período tempo. O gel é visualizado sob luz UV após ter sido corado com brometo de etídio.

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 tipagem molecular auxilia amplamente a identificação de surtos e distinção de isolados não relacionados. Tenover e colaboradores (1995) definem como isolados epidemiologicamente relacionados aqueles obtidos de pacientes ou do ambiente hospitalar em um período de tempo ou de uma área restrita, como parte de uma investigação epidemiológica, a qual sugere que os isolados podem ser

derivados de uma fonte comum. No entanto, isolados geneticamente relacionados (clones) seriam os isolados que são indistinguíveis mutuamente do outro através de uma variedade de testes genéticos (PFGE, ribotipagem, etc), ou que são tão similares que se presume serem derivados de amostra comum.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

ANDRADE SS, JONES RN, GALES AC, SADER HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2003; 52: 140-41.

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** 2000:40-43.

AUBERT D, POIREL L, CHEVALIER J, LEOTARD S, PAGES JM, NORDMANN, P. Oxacilinase-Mediated Resistance to Cefepime and Susceptibility to Ceftazidima in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2001; 45(6):1615-20.

BOUZA E, GARROTE FG, CERCENADO E, MARIN M, DIAZ MS, ROMEO S, VINDEL A. *Pseudomonas aeruginosa*: A multicenter study in 136 hospitals in Spain. **Rev Esp Quimioterap** 2003: vol. 16 (nº 1): 41-52.

BRADFORD PA. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clin Microbiol Rev** 2001; 14(4):933-51.

BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS A A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1995; 39:121-33.

BUSH K. Is it important to identify extend-spectrum β -lactamase-producing isolates? **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 1996;15: 361-4.

CASTANHEIRA M, TOLEMAN MA, JONES RN, SCHIMIDT FJ, WALSH TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother** 2004;48 (12) in press.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Report 2000-2001.

CORNAGLIA G, MAZZARIOL A, LAURETTI L, ROSSOLINI GM, FONTANA R. Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1, a Novel Transferable Metallo- β -lactamase. **Clin Infect Dis** 2000, 31:1119-25.

CUNHA BA, GIL MV. Cefepime. In: Cunha BA. **The Medical Clinics of North America.** Philadelphia, W.B. Saunders Company 1995:721-32.

DANEL F, HALL LM, GURr D, AAKALIN HE, LIVERMORE DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* . **J Antimicrob Chemother** 1995; 35: 281-94.

DELLEN CV, IGLEWSKI BH. Cell to Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infectious. **Emerging Infectious Diseases** 1998; 4(4):551-60

DOCQUIER JD, LUZZARO F, AMICOSANTE G, TONIOLO A, ROSSOLINI GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine β -lactamase and VIM-2 metallo- β -lactamase. **Emerg Infect Dis** 2001;7:910-11.

FLORES G, STAVOLA JJ, NOEL GJ. Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* in children with AIDS. **Clin Infect Dis** 1993;16:706-8.

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, 1997-1999. **Clin Infect Dis** 2001; 32(Suppl 2):S145-55.

GALES AC, SADER HS, JONES RN. The SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diag Microbiology and Infectious Disease** 2002;44: 289-99.

GIAKKOUPI P, PETRIKKOS G, TZOUVELESKIS LS, TSONAS S, LEGASKIS NJ, VATAPOULOS AC, and The WHONET Greece Study Group. Spread of integron-associated VIM-type metallo- β -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible

Pseudomonas aeruginosa strains in Greek hospitals. **J Clin Microbiol** 2003; 41: 822-25.

HANCOCK REW. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. **Clin Infect Dis** 1998; 27: S93-S99.

HILF M, YU VL., SHARP J, ZURAVLEFF JJ, KORVICK JA, MUDER RR. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. **Am J Med** 1989; 87:540-6.

JONES RN, DESHPANDE LM, BELL JM, TURNIDGE JD, KOHNO S, HIRAKATA Y, ONO Y, MIYAZAWA Y, KAWAKAMA S, INOUE M, HIRATA Y, TOLEMAN MA. Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo- β -lactamases in multidrug-resistant Gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** 2004a; 49: 289-94.

JONES RN, DESHPANDE L, FRITSCHER TR, SADER HS. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999-2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** 2004b; 49: 211-16.

KAUFMANN ME, PITT TL. Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: H. Chart. **Methods in Practical Laboratory Bacteriology**. CRC Press, London, 1994, p. 83-92.

KISKA DL, GILLIGAN, PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH editors. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology 1999, p. 517-25.

KÖHLER T, PECHÉRE JC. Resistance to Quinolones: Mechanisms and Clinical Implications. In: Andriole VT. **The Quinolones**. San Diego, Academic Press, 1998, p. 117-33.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN WCJ. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In: _____. **Atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia, USA: Lippincott, 1997, p. 253-72.

LAGATOLLA C, TONIN EA, BRAGADIN CM, DOLZANI L, GOMBAC F, BEARZI C, EDALUCCI E, GIONECHETTI F, ROSSOLINI GM. Endemic Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired Metallo- β -actamase Determinants in European Hospital. **Emerging Infectious Diseases** 2004, 10 (3);535-38.

LAUGHLIN TJ, ARMSTRONG DG, CAPORUSSO J, LAVERY LA. Soft tissue and bone infections from puncture wounds in children. **West J Med** 1997;166:126-8.

LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R. Cloning and characterization of *bla_{vim}*, a new integron-borne metallo- β -

lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother** 1999; 43:1584-90.

LINCH JP. Hospital-Acquired Infections: Realities of Risks and Resistance. **CHEST** 2001;119:373S-84S.

LIVERMORE DM. β - lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev** 1995; 8: 557-84.

LIVERMORE DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2001; 47:247-50.

LIVERMORE DM, BROWN DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2001;48, Suppl.S1: 59-64

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** 2001:1865-70.

LUZZARO F, ENDIMIANI A, DOCQUIER JD, MUGNAIOLI C, BONSIGNORI M, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM, TONIOLO A. Prevalence and characterization of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 2004, 48:131-35.

MARCHADIN H, PIERRE JH, CHAMPS DC, SIROT D, JARBAS H, PERIGAULT PF, CARRIERE C. Production of TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** 2000; 44:213-16.

MENDELSON MH, GURTAMAN A, SZABO S. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. **Clin Infect Dis** 1994; 18:886-95.

MENDES C, HSIUNG A, KIFFER A, OPLUSTIL C, SINTO S, MIMICA I, ZOCCOLI C, MYSTIC STUDY GROUP. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal Infectious Diseases** 2000;4 (5): 236-44.

MUGNIER P, DUBROUS S, CASIN I, ARLET G, COLLATZ E. A TEM-derived extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 1996;40:2488-93.

NAAS T, PHILIPPON LN, RONCO E, POIREL L, NORDMANN P. SHV extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1999a; 43(5):1281-84.

NAAS T, SOUGAKOFF W, CASETTA A, NORDMANN P. Molecular characterization of In50, a class1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Lett** 1999b; 176:411-19.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS approved standard M100-S11. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pennsylvania. 2001.

NORDMANN P, RONCO E, NAAS T, DUPORT C, BRIAND MY, LABIA R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; 37: 962-69.

NORDMANN P, GUIBERT M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother** 1998; 42:128-31.

NORDMANN P, POIREL L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin Microbiol infect** 2002; 8:321-31.

NORDMANN P. Mechanism of resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation** 2003; 22:527-30.

OH EJ, LEE S, PARK YJ, PARK JJ, PARK K, KIM SI, KANG MW, KIM BK. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. **J Microbiol Methods** 2003; 54:411-18.

PAGANI, L, MANTENGOLI E, MIGLIVACCA R, NUCLEO E, POLLINI S, SPALLA M, DATURI R, ROMERO E, ROSSOLINI GM. Multifocal Detection of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β -lactamase in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, 2004, 42 (6):2523-29.

PHILIPPON LN, NAAS T, BOUTHORS AT, BARAKETT V, NORDMANN P. Oxa-18, A Class D Clavulanic Acid-Inhibited Extended -Spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1997; 41:2188-95.

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**. Wiley, UK, 1997, p. 493-517.

POIREL L, RONCO E, NAAS T, NORDMANN P. Extended-spectrum β -lactamases TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Microbiol Infect** 1999; 5:651-52.

POIREL L, NAAS T, NICOLAS D, COLLET L, BELLAIS S, CAVALLO JD, NORDMANN P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2000; 44:891-97.

POIREL L, MAGALHÃES M, LOPES M, NORDMANN P. Molecular Analysis of Metallo- β -lactamase Gene *bla*_{SPM-1} Surrounding Sequences from Disseminated

Pseudomonas aeruginosa isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2004;48:1406-09.

POLLACK M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Editors. **Principles and practice of infectious diseases**, 5th ed. Churchill, Livingstone, Philadelphia, 2000, p. 2310-35.

RHOMBERG PR, JONES RN, SADER HS, FRITSCHE TR, THE MYSTIC PROGRAMME STUDY GROUP. Antimicrobial resistance rates and clonality results from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme: report of year five (2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** 2004; 49: 273-81.

RÖMLING U, FIELDER B, BOBHAMMER J. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **J Infect Dis** 1994; 170:1616-21.

ROSSI F. Bacilos Gram-negativos: Beta-lactamases. In: Rossi F, Andreazzi DB, editors. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005: p. 65-94.

SADER HS, JONES RN, GALES AC, SILVA JB, PIGNATARI AC. SENTRY Latin America Participants Group. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** 2004; 8(1):25-79.

SADER HS, CASTANHEIRA M, MENDES RE, TOLEMAN M, WALSH TR, JONES RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamses in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents** 2005;25: 57-61.

STREIT JM, JONES RN, SADER HS, FRITSCHER TR. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). **International Journal of Antimicrobial Agents** 2004, 24:111-18.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol** 1995 (33):2233-39

TOLEMAN MA, SIMM AM, MURPHY TA, GALES AC, BIEDENBACH DJ, JONES RN, WALSH TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother** 2002; 50:673-79.

TSAKARIS A, POURNARAS S, WOODFORD N, PALEPOU MF, 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.

VAHABOGLU H, ÖZTURK R, AYGUN F, COSKUNKAN F, YAMAN A, KAYGUSUZ A, Leblebicioglu H, BALIK I, AYDIN K., OKTUM M. Widespread detection of PER-1 - type extended -spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother** 1997; 41:2265-69.

VAHABOGLU H, SARIBAS S, AKBAL H, ÖZTÜRK R, YUCEL A. Activities of cefepime and five others antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA -10-type- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.. **J Antimicrob Chemother** 1998; 42:269-70.

VISCA P, COLOTTI G, SERINO L, VERZILI D, ORSI N, CHIANCONE E. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. **Appl Environ Microbiol** 1992; 58:2886-93.

WATANABE M, IYOBE S, INOUE M, MITSUHASHI S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** 1991; 35:147-51.

WELDHAGEN GF, POIREL L, NORDMANN P. Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. **Antimicrob Agents Chemother**. 2003;47:2385-92.

WIDME 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;
16:372-76.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os mecanismos de resistência por produção de β -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* obtidas em dois Hospitais universitários de Porto Alegre.

Determinar a relação clonal entre as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de AmpC .

Determinar a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras metalo- β -lactamases.

Determinar a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL).

Determinar o perfil de macrorestrição de DNA de amostras produtoras de β -lactamases.

Evaluation of β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* from two
University hospitals in southern Brazil

Ana Lúcia Saraiva Gonçalves* and Afonso Luís Barth[#]

*Laboratório Central - Análises Clínicas - ISCMPA, Brazil,

[#]Unidade de Pesquisa Biomédica, [#]Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia
Clínica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Author for correspondence:

Afonso Luís Barth,

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia – Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS, Brazil,

90.035-003

Phone: (+51) 21018607

e-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Objectives: To evaluate susceptibility profile, the prevalence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) production, AmpC and Metallo- β -lactamases (M- β la) in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from two distinct hospitals (ISCMPA and HCPA) in Porto Alegre, Brazil. In addition, molecular typing by PFGE was performed among isolates producing M- β la in order to evaluate probably clonal relatedness.

Methods: The susceptibility of 238 *P. aeruginosa* to 8 antimicrobial agents was determined by the disk diffusion method, using Müller-Hinton agar (MH) in accordance with “National Committee for Clinical Laboratory Standards” guidelines. All isolates were evaluated for AmpC production with the imipenem disk (strong inducer) near of the cefepime/ceftazidime disk (substrate). A blunting of the cefepime/ceftazidime zone by imipenem-induced enzyme, indicated positive result for AmpC. All isolates were evaluated for ESBL production by disk approximation test with ceftazidime, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone plus ticarcillin-clavulanate as inhibitor. M- β la production was determined by disk approximation test with disks containing CAZ and 2-mercatopropionic acid (2-MPA). The results were compared by the Fisher’s Exact Test. Macrorestriction analysis by *SpeI*, followed by PFGE, was performed in isolates M- β la positive. The resistance rates were compared by The Fisher’s Exact Test. P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results: The resistance rates to all antimicrobial agents were higher among isolates obtained from ISCMPA than those obtained from HCPA. The ceftazidime was the more active antibiotic against the isolates in both hospitals with resistance rates of 25,7% (ISCMPA) and 6,1% (HCPA). The derepression of AmpC was observed in

190 isolates (83,7% HCPA and 77,1% ISCMPA). It was not possible to detect the presence of ESBL among all *P. aeruginosa* evaluated in both hospitals. Positive results for M- β la production were observed in 28 isolates (20,0%) from ISCMPA. But none M- β la production was identified in *P. aeruginosa* from HCPA. The macrorestriction analysis by PFGE, showed that 14 of 16 M- β la positive *P. aeruginosa* belonged to one clone (named clone A) and its subclones. Only two others clones (B and C) were identified in one isolate each.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, AmpC, extended-spectrum β -lactamase, Metallo- β -lactamase.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a opportunistic human pathogen, as well the most common Gram-negative bacterium reported in nosocomial infectious (Delden *et al*, 1998). This species exhibits resistance to several antimicrobial agents, including most β -lactams (Cornaglia *et al*, 2000). The acquired resistance of *P. aeruginosa* for β -lactams antibiotics may be related to the expression of enzymes such as chromosomal β -lactamase, or by upregulation of efflux pump as well as by decreased permeability (Hancock, 1998).

The β -lactamase production has been the more studied resistance mechanism in *P. aeruginosa* regardless the fact that other resistance mechanism may also be related to multiresistance.

The multiresistance to antimicrobial agents used in the treatment of infections due *P. aeruginosa*, has been evaluated through surveillance programs that monitor the prevalence of microbial pathogens and antimicrobial resistance trends for both nosocomial and community-acquired infections (Sader *et al*, 2004). As resistance rates among *P. aeruginosa* isolates may vary according to geographic area as well as between different hospitals in the same region it is of importance to perform studies in order to establish local data on the resistance mechanisms of the species .

The aims of this study were to evaluate the percentual of antimicrobial resistance by disk difusion, the prevalence of AmpC, Metallo- β -lactamases and ESBL in isolates of *P. aeruginosa* from clinical specimens of patients attending two University Hospitals in Porto Alegre, Brazil, as well to evaluate the clonal relationship among the resistant isolates.

Materials and Methods

Bacterial isolates. A total of 238 *P. aeruginosa* isolates were obtained from patients attending in two University Hospitals in Porto Alegre, Brazil. From October 2002 to February 2003 the isolates were obtained from six distinct buildings (1200 beds), which constitute the “Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre” (ISCMPA). Between June to December 2002 the isolates were obtained from “Hospital de Clínicas de Porto Alegre” with approximately 800 beds. Only one isolate per patient was included in the study. The isolates were obtained from different clinical specimens, including respiratory tract secretions (54.3%), urine (15.0%), blood (12.1%) and others (abdominal secretions, catheters tips, skin secretions, etc – 18.6%).

The identification of the bacterial isolates was performed based upon production of characteristic pigments of the *P. aeruginosa* and through of the positive oxidase tests (Kiska *et al*, 1999). Non-pigmented isolates were identified using a commercial automated system (MicroScan, Dade Behring). They were stored in a 10% glycerol broth (TSB) at - 80°C.

Antimicrobial susceptibility testing and evaluation of β -lactamase production.

The susceptibilities of the bacterial isolates were determined for cefazidime (CAZ), cefepime (CPM), aztreonam (ATM), amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanate and imipenem (Oxoid), by the disk diffusion method using MH agar (bioMérieux) in accordance with the NCCLS

guidelines (2003). Were used for quality control of disk diffusion *P. aeruginosa* ATCC® 27853. The resistance rates determined in this study include both intermediate and fully resistant lines. All *P. aeruginosa* isolates were evaluated for AmpC production with the imipenem disk (strong inducers) near to the cefepime/ceftazidime disk (substrate) are shown in figure 1. Ablunting of the cefepime zone by imipenem-induced enzyme indicated positive a result for AmpC (figure 2). Isolates resistant to cefepime/ceftazidima could not be evaluated for AmpC production. *P. aeruginosa* isolates were evaluated for M-βla by a disk approximation test with disks containing CAZ and 2-mercatopropionic acid (2-MPA), as described by Arakawa *et al* (2000) and shown in figure 1. An inoculum adjusted to a turbidity equal to McFarland 0.5, of each isolate was spread onto a Müller-Hinton agar plate. On the agar surface was placed a 30 µg CAZ disk (Oxoid). A disk was placed near of the CAZ disk , center to center distance of the 2 cm and three microliters of a solution of 2-MPA (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) was added to the disk. The other CAZ disk was placed far of both disks. The observation of an inhibition zone between CAZ disk and 2-MPA disk was interpreted as a positive test results (Figure 3).

All the isolates were evaluated for ESBL production, by approximation disk test, as described by the “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie”. The ATM, CAZ, CTX and CRO disks, containing 30 µg were placed 2.0 cm (center to center) from a ticarcillin-clavulanate disk (Oxoid) (Figure 1). The observation of an increase inhibition zone (ghost zone) around CAZ, CTX, ATM or CRO was interpreted as a positive test results.

Statistical analysis.

The number of resistant and susceptible isolates for the antibiotic was entered in a 2x2 contingency table and compared by The Fisher's Exact Test. P values < 0.05 were considered to be statistically significant..

Molecular typing by macrorestriction analysis of DNA followed by pulsed field electrophoresis (PFGE).

Macrorestriction analysis of DNA followed by PFGE (Kaufmann, 1998) was performed with the isolates M-βla positives from ISCMPA. A suspension of the bacteria with an inoculum adjusted to a turbidity equal to McFarland 2.0 was used a volume of 300 μL this suspension was mixed with an equal volume of 2.0% low-melting-temperature agarose, and the mixture was distributed into plug molds. The DNA in the plugs was digested with 10U of restriction endonuclease *SpeI* (Gibco BRL, USA) at 37° C, according to the instructions of the manufacturer.

The restriction fragments were separated by PFGE in agarose gels, using the CHEF DRII apparatus (Bio-Rad, Richmond, USA). The gel was run at 14°C, 5.9 V/cm, for 22 hours, with pulse times ranging from 5 to 30s. A lambda ladder (48.5 Kb, Sigma, USA) was used as a molecular weight marker. The agarose gels were stained with ethidium bromide, visualized by Chemilmager transilluminator 4000 (Alpha Inntech Corporation), and photographed. The banding patterns were interpreted by visual inspection, based on the criteria of relatedness proposed by Tenover *et al* (1995).

Results

The susceptibility profile for 8 antimicrobial agents was determined for all 238 *P. aeruginosa* isolates. The ceftazidime was the more active antibiotic against the isolates from both hospitals with resistance rates of 25.7% and 6.1% for ISCMPA and HCPA, respectively. The antimicrobial agents less active included gentamicin (resistance rate of 50.7% in ISCMPA and 38.8% in HCPA) and the ticarcillin/clavulanate (55.0% in ISCMPA and 38.8% in HCPA). In general, the resistance rates to all antimicrobial agents were higher among isolated from ISCMPA than among those from the HCPA (Table 1). Although only for antibiotics CAZ (25.7% in ISCMPA and 6.1% in HCPA, $P < 0.0001$, OR = 5.31; 95% CI 2.14-13.17), CPM (40.0% in ISCMPA and 21.4% in HCPA, $P = 0.003$, OR = 2.44; 95% CI 1.36-4.41), TIM (55.0% in ISCMPA and 38.8% in HCPA, $P = 0.0176$, OR = 1.93; 95% CI 1.14-3.26) and IMP (30.7% in ISCMPA and 10.2% in HCPA, $P < 0.0001$, OR = 3.90; 95% CI 1.85-8.23) the difference between resistance rates were statistically significant.

Among the *P. aeruginosa* recovered from ISCMPA and HCPA, 36.4% and 49.0% were susceptible to all antibiotics tested, respectively. On the other hand, 14.3% isolates from ISCMPA were susceptible only to one antimicrobial agent and 11.4% isolates were fully resistant. In contrast, at HCPA, 7.1% isolates were susceptible only to one antimicrobial agent and 1.2% isolates were fully resistant. (Table 2).

The derepression of AmpC was observed in 190 isolates (83.7% in HCPA and 77.1% in ISCMPA) but, probably, this resistance mechanism could be detected in a

higher number of isolates if the test was not dependent on the formation of the inhibition zone around the cefazidime and/or cefepime (Figure 2).

The M- β la production among all *P. aeruginosa* isolates from ISCMPA was 20.0% (28/140). However, considering only the imipenem resistant isolates the rate of M- β la was 65.1% (28/43) positives M- β la. Among the latter isolates, 96.4% (27/28) were susceptible only to aztreonam. This β -lactamase, was detected in *P. aeruginosa* from patients locates in Intensive Care Unity (ICU), but also in other units from ISCMPA (n-ICU), as show in table 3. However, the values not were statistically significant.

Nevertheless, none *P. aeruginosa* isolate from HCPA, including those resistant to imipenem (10.2%), was positive for M- β la production.

We were not able to detect ESBL production among the *P. aeruginosa* included in this study.

Due to the high rates M β la of production of *P. aeruginosa* in ISCMPA, these isolates were typed by macrorestriction analysis by PFGE. Thus, 16 of the 27 positive M β la *P. aeruginosa* were typed and 14 isolates proved to belone to the same clone or subclones (clone A). The other 2 isolates were considered distinct from clone A and were designated clones B and C (figure 4 and 5).

Discussion

In the present study, multiresistance to antimicrobial agents, including carbapenens, was detected among *P. aeruginosa* obtained at two university hospitals in southern Brazil. Interestingly, the resistance rates were higher at

ISCMPA than at HCPA, although, both hospitals had infection control committees that strongly restrict the use of antibiotic. The high resistance rates at ISCMPA could be justified by the complexity of the hospital structure, as well the fact that the 1200 beds are distributed among six distinct buildings in contrast to HCPA where the 800 beds are located in the same building.

Report from SENTRY Surveillance Program from 1997 to 2001, in Latin American and Brazil, showed that *P. aeruginosa* resistance rates were slightly higher among isolates collected in Brazilian in comparison to America Latin centers (Sader *et al*, 2004). However, our study has shown that *P. aeruginosa* is generally less resistant than the isolates from the SENTRY study. For instance, the rates of resistance to ceftazidime in this study were only 6.1% at HCPA and 25.7% at ISCMPA in contrast to 49.8% in the Brazilian hospitals evaluated by SENTRY (Sader *et al*, 2004)

Although our rates of resistance of *P. aeruginosa* from the two hospitals evaluated in this study may not be excessively high, it is important to determine the mechanisms involved among the resistant *P. aeruginosa* as these data may not be predicted from the susceptibility disk diffusion test. The knowledge about the resistance mechanism may to assist the therapeutic choices available for the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*.

As expected, the prevalence of AmpC β -lactamase was high among *P. aeruginosa* and could be even higher whether the technique used to detect this enzyme was not prone to false negative results. This data corroborates the NCCLS recommendation (2003) about the induction of resistance to cephalosporins in *P.*

aeruginosa, i.e., the majority (perhaps all) *P. aeruginosa* may develop resistance *in vivo* during treatment with cephaloporphins.

In an opposite way, it is of note that no ESBL producers were detected among all *P. aeruginosa* included in this study. Numerous methods have been proposed for the detection of ESBL in clinical isolates. Regardless of the method used for detection it is important to note that none of the methods that rely on phenotypic expression of the β -lactamase will detect every ESBL-producing isolate (Bradford, 2001). The diversity of the ESBL enzymes related in *P. aeruginosa* (TEM, PER, PSE, OXA) and the unlike response face the action of β -lactamases inhibitors, difficult to standardize methods, which could be used in clinical laboratory (Mugnier, 1996).

The most worrying result found in this study was the high prevalence of M- β la among *P. aeruginosa* at ISCMPA, although one could consider that M- β la *P. aeruginosa* would be more common among isolates from patients at ICU, we detected resistant isolates from clinical specimens in the patients in ICU, but also in n-ICU. The values were not statistically significant. It may be possible, because the isolates M- β la positive distributed among the unit in ISCMPA was few.

M- β la are β -lactamases which have been described with increased prevalence among *P. aeruginosa* in other studies (Luzzaro *et al*, 2004; Sader *et al*, 2005) and even in Brazil (Zavascki *et al*, 2005). As this enzyme is able to inactivate the carbapenems, the high prevalence of M- β la in ISCMPA would indicate that this antibiotic may not be useful as an empiric treatment for infections due to *P. aeruginosa*. On the other hand, our study showed that among the isolates at ISCMPA, 96.4% were susceptible to aztreonam. Considering the high *in vitro* activity

of aztreonam against M-βla *P. aeruginosa* and that none ESBL producing *P. aeruginosa* was detected, one could indicate this antibiotic as the therapeutic option for infections due to *P. aeruginosa* at ISCMPA.

Regardless the fact that patients infected with multidrug resistance organisms at ISCMPA are placed under contact precautions, a single clone (clone A) was identified in the vast majority (14/16) of M-βla *P. aeruginosa*. It may be possible, therefore, the recommendations of infection control staff may not be strictly adhered, and this may be leading to the spread of the single clone of *P. aeruginosa* in ISCMPA.

In addition, local studies to evaluate the epidemiology of resistant phenotypes (gene epidemics, or horizontal transfer of resistance genes) are very important, because the *P. aeruginosa* is a bacteria that show resistance of profiles that could vary locally, among different hospital in the same geographic area, likewise the molecular epidemiology relationship, of this bacterial in specific places.

Acknowledgments

We thank staff of “Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica - HCPA” Brazil and “Setor de Bacteriologia - Laboratório Central - ISCMPA”, Brazil for their help to collect the *P. aeruginosa* isolates. We thank in special Larissa Lutz, Patrick Gaspareto and Andreza Martins for their help. This study (02-102) was supported by “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) - Hospital de Clínicas e Porto Alegre”, Brazil.

REFERENCES

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** 2000:40-43.

BRADFORD PA. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clin Microbiol Rev** 2001; 14(4): 933-51

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Report 2000-2001.

CORNAGLIA G, MAZZARIOL A, LAURETTI L, ROSSOLINI GM, FONTANA R. Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1, a Novel Transferable Metallo- β -lactamase. **Clin Infect Dis** 2000, 31:1119-25.

DELLEN CV, IGLEWSKI BH. Cell to Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infectious. **Emerging Infectious Diseases** 1998; 4(4):551-60

HANCOCK REW. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. **Clin Infect Dis** 1998; 27: S93-S99.

KISKA DL, GILLIGAN, PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH editors. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology 1999, p. 517-25.

MUGNIER P, DUBROUS S, CASIN I, ARLET G, COLLATZ E. A TEM-derived extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 1996;40:2488-93.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS approved standard M100-S11. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pennsylvania. 2001.

NORDMANN P, GUIBERT M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother** 1998; 42:128-31.

KAUFMANN ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *In*: Woodford N, Johnson AP. Molecular Bacteriology. **Protocols and clinical applications**. New Jersey: Humana Press Inc. 1998, p. 33-50.

SADER HS, JONES RN, GALES AC, SILVA JB, PIGNATARI AC. SENTRY Latin America Participants Group. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** 2004; 8(1):25-79.

SADER HS, CASTANHEIRA M, MENDES RE, TOLEMAN M, WALSH TR, JONES RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents** 2005;25: 57-61.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol** 1995 (33):2233-39.

ZAVASCKI AP, GASPARETO P, MARTINS A, GONÇALVES AL, BARTH, AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. Submitted.

Table 1. Distribution of resistance rates among *P. aeruginosa* isolates from two university hospitals in southern Brazil.

<i>Antibiotic</i>	<i>Nº (%) of resistant isolates</i>		
	ISCOMPA n = 140	HCPA n= 98	OR (95CI%) (1)
Ceftazidime	36 (25.7)*	6 (6.1)*	5.31 (2.14-13.17)
Cefepime	56 (40.0)*	21 (21.4)*	2.44 (1.36-4.41)
Aztreonam	57 (40.7)	33 (33.7)	1.35 (0.79-2.32)
Amicakin	60 (42.9)	35 (35.7)	1.35 (0.79-2.30)
Gentamicin	71 (50.7)	38 (38.8)	1.63 (0.96-2.75)
Ciprofloxacin	65 (46.4)	36 (36.7)	3.90 (1.85-8.23)
Imipenem	43 (30.7)*	10 (10.2)*	1.49 (0.85-2.63)
Piperacillin-Tazobactam	49 (35.0)	26 (26.5)	1.49 (0.85-2.63)
Ticarcillin-Clavulanate	77 (55.0)*	38 (38.8)*	1.93 (1.14-3.26)

(1) P value was calculated by Fisher's Exact Test.

* P values were <0.05.

Table 2. Prevalence of antibiotic multiple resistances among *P. aeruginosa* isolates from two university hospitals in southern Brazil

Hospital	N° of resistant antibiotics (%)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
ISCMPA										
PSC	16	6	2	1	3	6	3	3	4	44
HSF	3	1	1	-	-	-	-	4	-	9
HSJ	5	-	-	-	-	-	1	3	1	10
PPF°	11	7	2	3	2	1	3	2	3	34
HSR	7	1	-	-	1	-	3	4	4	20
HCSA	9	4	2	-	-	-	-	4	4	23
Total	51	19	7	4	6	7	10	20	16	140
	(36.4)	(13.6)	(5.0)	(2.9)	(4.3)	(5.0)	(7.1)	(14.3)	(11.4)	(100)
HCPA	48	9	4	9	2	12	6	7	1	98
	(49.0)	(9.2)	(4.1)	(9.2)	(2.0)	(12.3)	(6.1)	(7.1)	(1.0)	(100)

Table 3. Distribution of *P. aeruginosa* isolates M-βla producer among six hospitals at ISCMPA.

	N° (%) M-βla positive isolates					
	PSC	HSF	HSJ	PPF°	HSR	HCSA
	n=44	n =9	n =10	n =34	n=20	n=23
ICU	2 (4.5)	1(11.1)	3 (30.0)	1(2.9)	4 (20.0)	3 (13.0)
n-ICU	3 (6.8)	1(11.1)	2 (20.0)	2 (5.9)	4 (20.0)	2 (8.7)

Figure 1- Diagram for distribution of disks for tests β -lactamases detection in MH plate (15 cm).

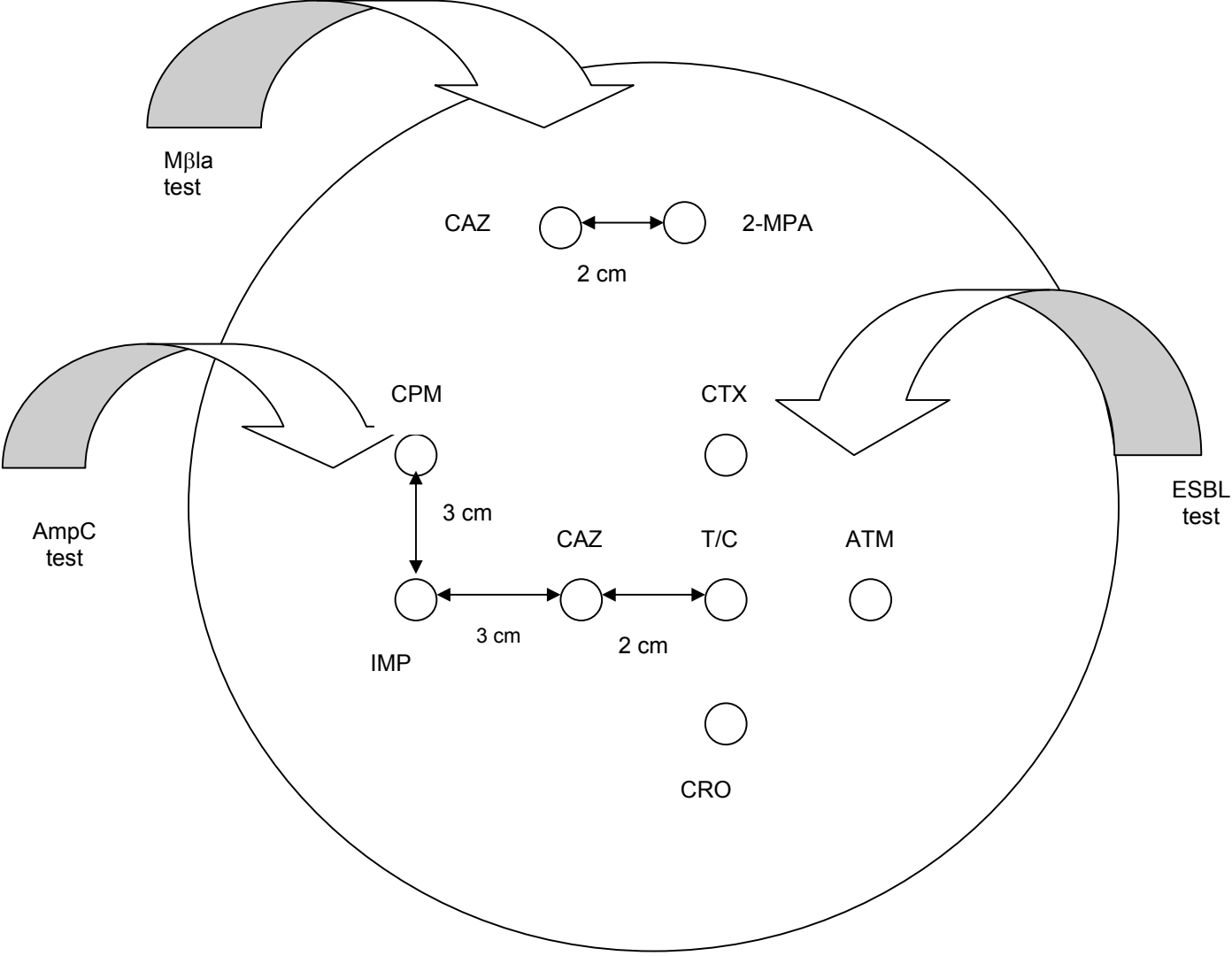


Figure 2 - Expression of AmpC β -lactamase *P. aeruginosa* isolate.

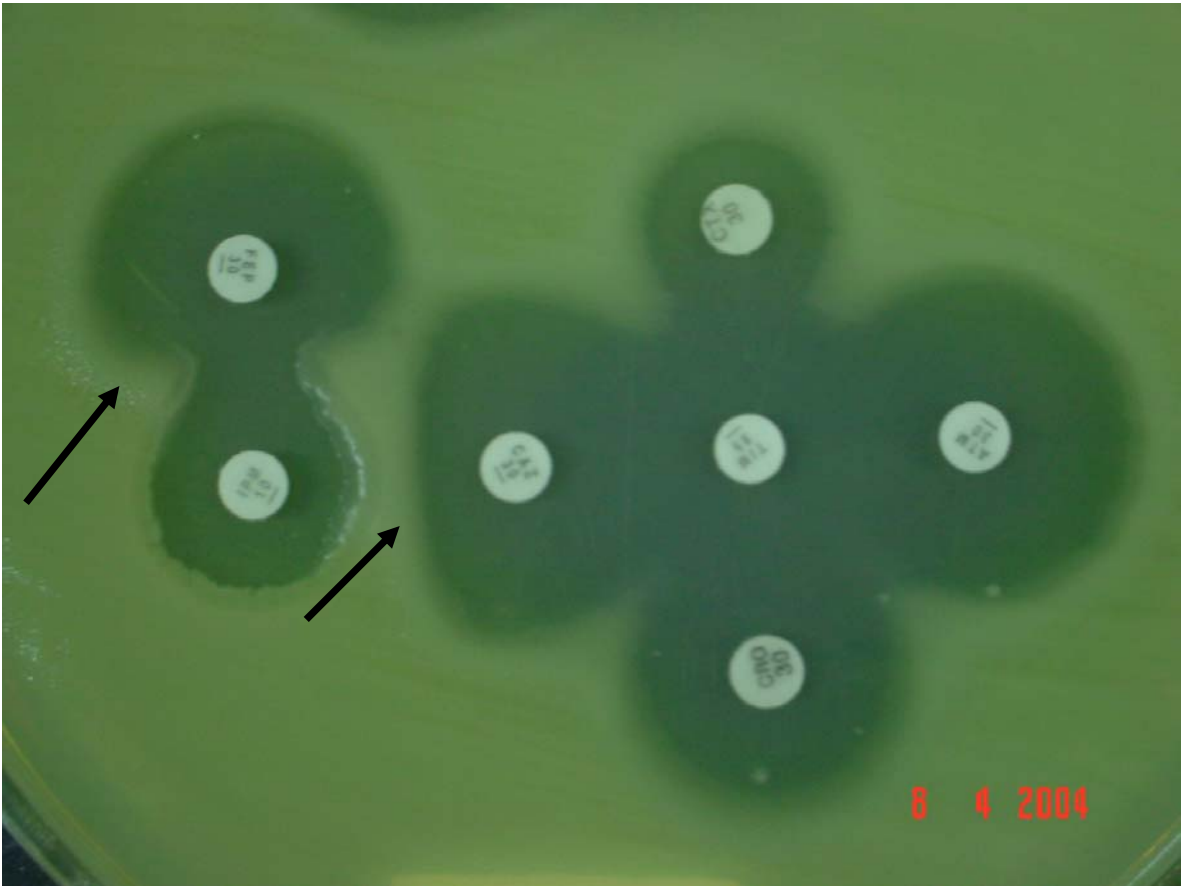


Figure 3 – Positive test (arrow) of M-βla detection in *P. aeruginosa* isolates.

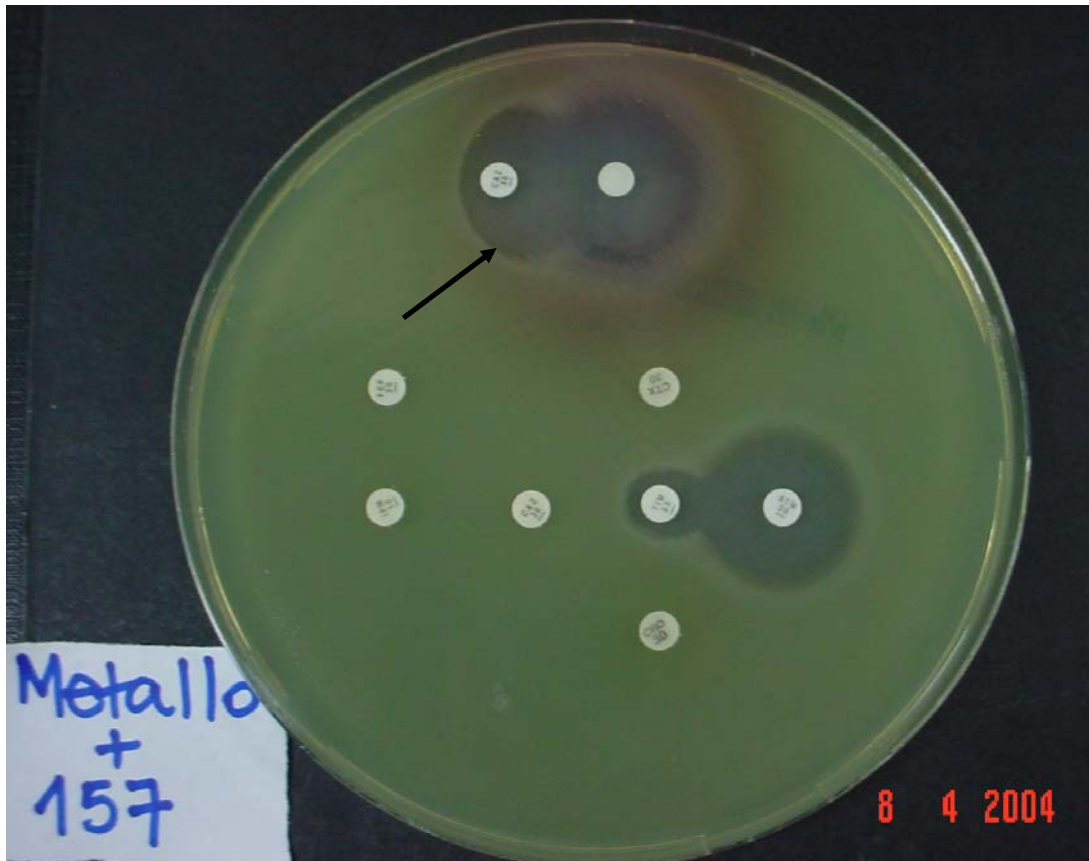
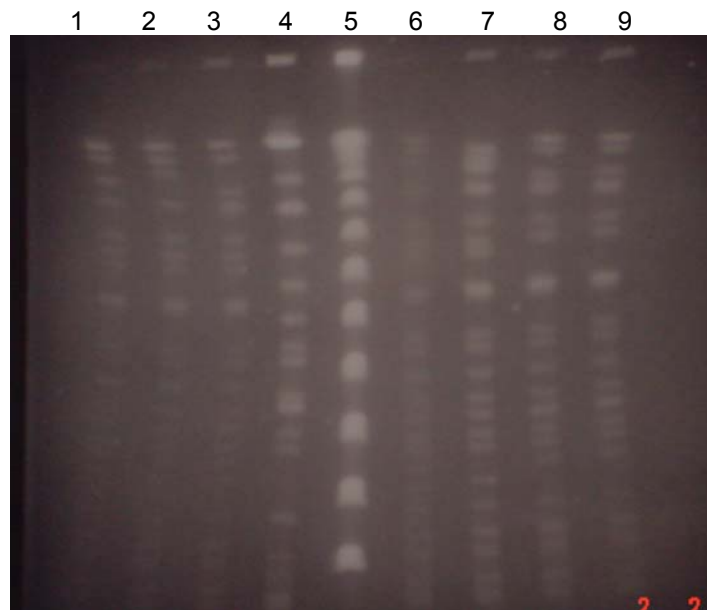


Figure 4 – Macrorestriction profile of M-βla *P. aeruginosa* from ISCMPA.

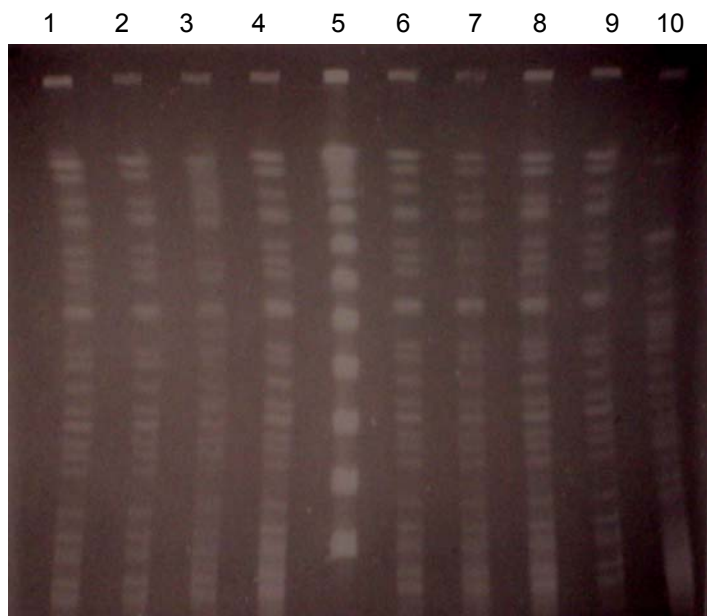


Lines 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9: clone A and its subclones

Line 4: clone B

Line 5: molecular weight marker (lambda ladder 48.5 Kb)

Figure 5 – Macrorestriction profile of M-βla *P. aeruginosa* from ISCMPA.



Lines 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9: clone A and its subclones

Line 10: clone C

Line 5: molecular weight marker (lambda ladder 48.5 Kb)

Versão em português do artigo

Avaliação da presença de β -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* em dois
hospitais universitários no sul do Brasil

Autor para correspondência:

Afonso Luís Barth,

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia – Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS, Brasil,

90.035-003

Fone/FAX: (+51) 21018607

e-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Resumo:

Objetivos: Avaliar o perfil de suscetibilidade, a prevalência da produção de AmpC, β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e Metallo- β -lactamase (M- β la) em *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de dois hospitais universitários distintos (ISCMPA e HCPA) em Porto Alegre. Em adição, tipagem molecular por PFGE foi realizada entre os isolados produtores de M- β la para avaliar a relação clonal. **Métodos:** Foi determinada a suscetibilidade de 238 isolados de *P. aeruginosa* para 8 agentes antimicrobianos, através do teste de disco-difusão, usando agar Müller-Hinton (MH) de acordo com “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS). Todos isolados foram avaliados para produção de AmpC com o disco de imipenem (indutor) próximo ao disco de cefepima/ceftazidima (substrato). Um achatamento no halo de cefepime/ceftazidima pela indução da enzima pelo imipenem, indicava resultado positivo para AmpC. Todos isolados foram avaliados para a presença de ESBL através do teste de aproximação de disco com ceftazidima, cefepima, cefotaxima, ceftriaxona e ticarcilina-clavulanato como inibidor de β -lactamase. A produção de M- β la foi determinada através do teste de aproximação de discos de CAZ a discos impregnados com ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). As taxas de resistência foram comparadas através do Teste Exato de Fisher. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Análise de macrorestrição com a enzima *SpeI* foi realizada em isolados produtores de M- β la. **Resultados:** As taxas de resistência para todos os agentes foram superiores entre os isolados obtidos na ISCMPA em relação aos do HCPA. A ceftazidima mostrou ser o antibiótico mais efetivo contra os isolados de ambos Hospitais (ISCMPA e HCPA) com taxa de

resistência de 25,7% (ISCMPA) e 6,1% (HCPA). A expressão de AmpC foi observada em 190 isolados (83,7% HCPA e 77,1% ISCMPA). Não foi possível detectar a presença de ESBL entre todos as *P. aeruginosa* avaliadas em ambos hospitais. Foi observada a presença de M- β la em 28 isolados (20,0%) da ISCMPA. Mas não foi detectada M- β la em nenhuma *P. aeruginosa* do HCPA. A análise de macrorestrição mostrou que 14 de 16 *P. aeruginosa* M β la positivas pertenciam a um clone (denominado clone A), e seus subclones. Apenas dois outros clones (B e C) foram identificados em um isolado cada.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, AmpC, β -lactamase de espectro estendido, Metallo- β -lactamase.

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno humano oportunista, sendo a bactéria Gram-negativa mais relatada em infecções nosocomiais (Van Delden & Iglewski, 1998). Este microorganismo pode apresentar resistência para diversos agentes antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos (Cornaglia *et al*, 2000). A resistência adquirida da *P. aeruginosa* aos antibióticos β -lactâmicos pode estar relacionada à expressão de enzimas, como as β -lactamases cromossomais, ou ativação de bombas de efluxo e também pela diminuição da permeabilidade da membrana externa (Hancock, 1998). A produção de β -lactamases tem sido o mecanismo de resistência mais estudado em *P. aeruginosa*, apesar do fato que outros mecanismos de resistência podem também ser descritos.

A multirresistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas pela *P. aeruginosa* têm sido avaliada através de programas que monitoram a prevalência e os padrões de resistência de microorganismos em infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade (Sader *et al*, 2004). Como as taxas de resistência entre *P. aeruginosa* podem variar conforme determinada região geográfica ou mesmo conforme diferentes hospitais em uma mesma área geográfica, é muito importante realizar estudos locais que estabeleçam uma análise local dos mecanismos de resistência desta espécie.

Os objetivos deste estudo foram avaliar o percentual de resistência antimicrobiana pelo teste de difusão do disco, a prevalência de ESBL, AmpC e de Metallo- β -lactamases em isolados de *P. aeruginosa* de espécimes clínicos de

pacientes internados em dois Hospitais Universitários de Porto Alegre, bem como avaliar a relação clonal entre os isolados resistentes.

Materiais e Métodos

Isolados Bacterianos. Um total de 238 isolados de *P. aeruginosa* foi obtido de pacientes internados em dois Hospitais Universitários de Porto Alegre. Entre Outubro de 2002 e Fevereiro de 2003 os isolados foram obtidos de seis prédios distintos (1200 leitos), os quais constituem o “Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre” (ISCMPA): Pavilhão Pereira Filho (PPF^o), Policlínica Santa Clara (PSC) e também os Hospitais Santa Rita (HSR), São José (HSJ), São Francisco (HSF), além do Hospital Pediátrico Santo Antônio (HCSA). Entre Junho e Dezembro de 2002 foram obtidos os isolados do “Hospital de Clínicas de Porto Alegre” com aproximadamente 800 leitos. Somente um isolado por paciente foi incluído no estudo e foram obtidos de secreções do trato respiratório (54,3%), urina (15,0%), sangue (12,1%), e outros (secreções abdominais, cateteres, secreções cutâneas, etc - 18,6%).

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada com base na produção de pigmentos característicos da *P. aeruginosa* e através do teste da oxidase positivo (Kiska *et al*, 1999). Isolados não pigmentados foram identificados através de sistema comercial automatizado (MicroScan, Dade Behring). As amostras bacterianas foram armazenadas em Tryptic Soy Broth contendo 10% de glicerol à - 80°C.

Testes de susceptibilidade aos antibióticos e avaliação da produção de β -lactamases. Os isolados foram testados para susceptibilidade a ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), aztreonam (ATM), amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato e imipenem (IMP) (Oxoid) utilizando o método de disco-difusão utilizando Agar Muller-Hinton (MH) (bioMérieux) de acordo com o “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003). O perfil de resistência determinado neste estudo inclui os isolados categorizados como intermediário e resistente. Todos isolados foram avaliados para produção de AmpC com o disco de Imipenem (indutor) próximo ao disco de cefepima/ceftazidima (substrato) conforme figura 1. Um achatamento no halo formado em torno do disco de cefepima e/ou ceftazidima indicava resultado positivo para presença de AmpC (Figura 2). Amostras originalmente resistentes a cefepima e/ou ceftazidima não puderam ser avaliadas para presença de AmpC. Os isolados foram analisados para a produção de M- β la através do teste de aproximação de discos de CAZ e ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA), com descrito por Arakawa *et al* (2000) conforme figura 1. Na superfície de uma placa de agar MH, foi semeado um inóculo ajustado a uma turbidez igual 0,5 de MCFarland. Na superfície do agar foi colocado um disco de CAZ (Oxoid) de 30 μ g. Um disco de papel filtro foi colocado próximo do disco de CAZ com uma distância, centro a centro, de 2,0 cm e três microlitros do 2-MPA (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) foram adicionados ao disco de papel filtro no agar. Um outro disco de CAZ foi colocado distante de ambos. A observação de uma zona de inibição entre os discos de CAZ e 2-MPA foi interpretada como um resultado positivo (Figura 3).

Todos os isolados foram avaliados para a produção ESBL através do teste de aproximação de discos, conforme descrito pelo “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie”. Os discos de ATM, CAZ, CTX e CRO (Oxoid), contendo 30 µg foram colocados a 2,0 cm centro a centro de um disco contendo ticarcilina/clavulanato (Oxoid) 20/10 µg, respectivamente (Figura 1).

A observação de um aumento ao redor dos discos de CAZ, CTX, ATM ou CRO (zona fantasma) seria interpretada como teste positivo.

Análise Estatística. O número de isolados resistentes e suscetíveis, aos antibióticos, foram introduzidos em uma tabela de contingência 2x2 e comparados pelo teste Exato de Fischer. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Tipagem molecular por macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE). A análise de macrorestrição de DNA cromossomal seguida de PFGE foi realizada com os isolados M-βla positivos. Uma suspensão da bactéria foi ajustada para um padrão 2,0 de McFarland e um volume de 300 µL desta suspensão foi misturada com um volume igual de agarose “low-melting” 2,0%, então distribuída em moldes para blocos. O DNA bacteriano foi digerido com 10U da enzima *SpeI* (Gibco BRL, USA) a 37° C, de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos da restrição foram separados pela PFGE, em um gel de agarose, utilizando o aparelho contador de campo elétrico pulsado homogêneo CHEF DRII (Bio-Rad, Richmond, USA). O gel correu a 14°C, 5,9 V/cm,

por 22 h, com pulso inicial de 5 a 30 s. Foi utilizado como marcador de peso molecular o "lambda ladder" (48,5 Kb, Sigma, USA). O gel foi corado com brometo de etídio, e os fragmentos separados foram visualizados com o Chemilmager transiluminator 4000 (Alpha Inntech Corporation) e fotografado. Comparação dos perfis de macroretrição foram realizados através de análise visual, baseado nos critérios propostos por Tenover *et al* (1995).

Resultados

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi determinado para todos 238 isolados de *P. aeruginosa*. A ceftazidima mostrou ser o antibiótico mais ativo contra os isolados de ambos os Hospitais com taxas de resistência de 25,7% e 6,1% para ISMPA e HCPA, respectivamente. Os antibióticos menos efetivos foram a gentamicina (taxa de resistência de 50,7% na ISCMPA e 38,8% no HCPA) e a ticarcilina/clavulanato (55,0% na ISCMPA e 38,8% no HCPA). Em geral, as taxas de resistência aos antibióticos testados mostraram serem maiores nos isolados da ISCMPA do que nos isolados do HCPA (Tabela 1). No entanto, apenas para os antibióticos CAZ (25,7% na ISCMPA e 6,1% no HCPA, $P < 0,0001$, OR = 5,31; IC95% 2,14-13,17), CPM (40,0% na ISCMPA e 21,4% no HCPA, $P = 0,003$, OR = 2,44; IC95% 1,36-4,41), TIM (55,0% na ISCMPA e 38,8% no HCPA, $P = 0,0176$, OR = 1,93; IC95% 1,14-3,26) e IMP (30,7% na ISCMPA e 10,2% in HCPA, $P < 0,0001$, OR=3,90; IC95% 1,85-8,23) a diferença entre as taxas de resistência foi estatisticamente significativa.

Entre os isolados de *P. aeruginosa* obtidos na ISCMPA, 36,4% foram suscetíveis a todos os antibióticos testados. Por outro lado, 14,3% isolados eram

suscetíveis apenas a um agente antimicrobiano e 11,4% isolados apresentaram resistência a todos os antibióticos. Em contraste, no HCPA a resistência a somente um antibiótico foi de 9,2% e a resistência a todos os antimicrobianos foi detectada em apenas 1,2% (Tabela 2).

A expressão de AmpC foi observada em 190 isolados (83,7% no HCPA e 77,1% na ISCMPA) mas, possivelmente, este mecanismo de resistência poderia ser detectado em um maior número de cepas se o teste não dependesse da formação de halo de inibição ao redor do disco de ceftazidima e/ou cefepima (Figura.2).

A produção de M-βla entre todas as *P. aeruginosa* isoladas na ISCMPA foi de 20,0% (28/140). No entanto, considerando apenas os isolados resistentes ao imipenem a taxa de M-βla positivas foi 65,1% (28/43). Entre estes isolados, 96,4% (27/28) eram suscetíveis apenas ao aztreonam. Essa β-lactamase foi detectada em *P. aeruginosa* de pacientes localizados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), mas também em outras unidades da ISCMPA (n-UTI), como mostra a tabela 3. No entanto, os valores encontrados não foram estatisticamente significativos. Todavia, nenhuma *P. aeruginosa* isolada do HCPA, incluindo aquelas resistentes ao imipenem (10,2%), eram produtoras de M-βla.

Não foi detectada a produção de ESBL entre as *P. aeruginosa* incluídas neste estudo.

Devido ao alto percentual de produção de Mβla nas amostras de *P. aeruginosa* da ISCMPA, estes isolados foram tipados pela análise de macrorestrição seguida por PFGE. Assim, 16 de 27 *P. aeruginosa* Mβla positivas foram tipadas mostrando pertencer a um mesmo clone ou subclone (clone A). E outros dois

isolados foram considerados distintos do clone A e foram designados clones B e C (Figura 4 e 5).

Discussão

No presente estudo, multiresistência aos agentes antimicrobianos, incluindo carbapenens, empregados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, foi detectada entre as amostras de *P. aeruginosa* obtidas de dois hospitais universitários do sul do Brasil. Interessantemente, em geral as taxas de resistência foram maiores entre os isolados da ISCMPA do que do HCPA, no entanto, embora ambos hospitais possuam Comissões de controle de infecção, que restringem o uso de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos, um fato que poderia justificar, pelo menos em parte, as altas taxas de resistência da ISCMPA seria a complexidade da estrutura hospitalar, bem como o fato de que os 1200 leitos estão distribuídos entre seis prédios distintos, em contraste com o HCPA, onde os 800 leitos estão localizados no mesmo prédio.

Relato do “SENTRY Surveillance Program” entre 1997 e 2001, na América Latina e Brasil, mostrou que taxas de resistência em *P. aeruginosa* foram levemente maiores entre os isolados coletados nos centros brasileiros participantes do estudo em comparação aos centros da América Latina (Sader *et al*, 2004). No entanto, os dados do nosso estudo mostraram que *P. aeruginosa* é geralmente menos resistente que os isolados do estudo SENTRY. Por exemplo, as taxas de resistência para ceftazidima em nosso estudo foram de apenas 6,1% no HCPA e 25,7% na ISCMPA em contraste com 49,8% nos hospitais brasileiros avaliados pelo SENTRY. Isso indica a importância do compilamento de dados locais a respeito de percentuais

de resistência, visto que os estudos multicêntricos apresentam dados agrupados de determinado país, mas que podem não representar as tendências locais.

Embora nossas taxas de resistência entre os isolados de *P. aeruginosa* dos dois hospitais avaliados neste estudo possam não ter sido excessivamente altas, é importante determinar os mecanismos envolvidos em *P. aeruginosa* multiresistentes. Esta análise pode ser útil para auxiliar na escolha terapêutica empírica para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*.

Como esperado, a β -lactamase AmpC foi detectada na maioria das amostras de *P. aeruginosa* e esta prevalência poderia ser maior, porém a técnica usada para detectar esta enzima é propensa a resultados falso negativos. Esta análise reforça as recomendações do NCCLS (2003) sobre a indução da resistência as cefalosporinas por *P. aeruginosa*, ou seja, a maioria (ou talvez todas) *P. aeruginosa* podem desenvolver resistência *in vivo* durante o tratamento com cefalosporinas.

Em contrapartida, não foram observadas amostras produtoras de ESBL entre todas as *P. aeruginosa* incluídas no estudo. Este resultado pode refletir o fato que este tipo de enzima é muito incomum em nosso meio, mas também pode estar relacionado à metodologia utilizada neste estudo. Diversos métodos têm sido propostos para detecção de ESBL em isolados clínicos. É importante notar que nenhum dos métodos que se baseiam na expressão fenotípica das β -lactamases detectará todos isolados produtores de ESBL (Bradford, 2001). A diversidade de enzimas ESBL relatadas em *P. aeruginosa* (TEM, PER, PSE, OXA) e as diferentes respostas frente aos inibidores de β -lactamases, dificultam a padronização de métodos, os quais poderiam ser utilizados em laboratórios clínicos (Mugnier, 1996).

O resultado mais preocupante encontrado neste estudo é a alta prevalência de M-βla entre *P. aeruginosa* na ISCMPA. Embora, esta β-lactamase tenha sido igualmente detectada nos isolados de espécimes clínicos de pacientes da UTI e n-UTI, os valores não apresentaram diferença significativa. Talvez, isso se justifique pela amostragem ser pequena entre as unidades de internação.

M-βla são β-lactamases as quais têm sido descritas com elevada prevalência entre *P. aeruginosa* em outros estudos (Luzzaro *et al*, 2004; Sader *et al*, 2005) e igualmente no Brasil (Sader, 2004; Zavascki *et al*, 2005). Como esta enzima é capaz de inativar carbapenems, a alta prevalência de M-βla na ISCMPA indicaria que esse antibiótico não poderia ser usado como tratamento empírico das infecções causadas por *P. aeruginosa*. Por outro lado, nosso estudo mostrou que entre os isolados da ISCMPA, 96,4% eram suscetíveis apenas ao aztreonam. Considerando a alta atividade *in vitro* do aztreonam contra *P. aeruginosa* M-βla positiva e que nenhuma *P. aeruginosa* produtora de ESBL foi detectada, isto poderia indicar este antibiótico como a opção terapêutica para infecções devido a *P. aeruginosa* na ISCMPA.

Apesar do fato de que os pacientes com bactérias multiresistentes na ISCMPA são colocados sobre medidas de precaução de contato, um único clone (clone A) foi identificado na maioria (14/16) de *P. aeruginosa* M-βla positiva. Isto pode ser possível, pois, as recomendações da comissão de controle de infecção podem não ter sido rigorosamente aderidas, e isto pode estar levando para a disseminação do único clone de *P. aeruginosa* na ISCMPA.

Em adição, estudos locais para avaliar a epidemiologia dos fenótipos resistentes (genes epidêmicos, ou transferência horizontal de genes resistentes) são

muito importantes, porque a *P. aeruginosa* é uma bactéria que mostra um perfil de resistência que pode variar localmente, entre hospitais distintos na mesma área geográfica, do mesmo modo a relação epidemiológica molecular desta bactéria, em sítios específicos.

Agradecimentos

Nós agradecemos toda a equipe da “Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica –HCPA” e “Setor de Bacteriologia - Laboratório Central – ISCMPA”, pelo auxílio na coleta dos isolados de *P. aeruginosa*. Nós agradecemos, em especial a Larissa Lutz, Patrick Gaspareto e Andreza Martins pelo auxílio na técnica de PFGE. Este estudo (02-102) foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) – Hospital de Clínicas e Porto Alegre.

Tabela 1. Distribuição das taxas de resistência entre os isolados de *P. aeruginosa* em dois hospitais universitários no sul do Brasil.

<i>Antibiótico</i>	<i>Nº (%) de isolados resistentes</i>		
	ISCOMPA n = 140	HCPA n= 98	OR (IC 95%)(1)
Ceftazidima	36 (25,7)*	6 (6,1)*	5,1 (2,4-13,17)
Cefepima	56 (40,0)*	21 (21,4)*	2,44 (1,36-4,41)
Aztreonam	57 (40,7)	33 (33,7)	1,35 (0,79-2,32)
Amicacina	60 (42,9)	35 (35,7)	1,35 (0,79-2,30)
Gentamicina	71 (50,7)	38 (38,8)	1,63 (0,96-2,75)
Ciprofloxacina	65 (46,4)	36 (36,7)	3,90 (1,85-8,23)
Imipenem	43 (30,7)*	10 (10,2)*	1,49 (0,85-2,63)
Piperacilina-Tazobactam	49 (35,0)	26 (26,5)	1,49 (0,85-2,63)
Ticarcilina-Clavulanato	77 (55,0)*	38 (38,8)*	1,93 (1,14-3,26)

(1) Valor de P foi calculado pelo Teste Exato de Fischer.

* Valor de P foi <0.05.

Tabela 2. Prevalência de resistência a múltiplos antibióticos entre os isolados de *P. aeruginosa* nos dois hospitais universitários no sul do Brasil

ISCMPA	<i>Nº de antibióticos resistentes (%)</i>									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
PSC	16	6	2	1	3	6	3	3	4	44
HSF	3	1	1	-	-	-	-	4	-	9
HSJ	5	-	-	-	-	-	1	3	1	10
PPF ^o	11	7	2	3	2	1	3	2	3	34
HSR	7	1	-	-	1	-	3	4	4	20
HCSA	9	4	2	-	-	-	-	4	4	23
Total	51	19	7	4	6	7	10	20	16	140
	(36,4)	(13,6)	(5,0)	(2,9)	(4,3)	(5,0)	(7,1)	(14,3)	(11,4)	(100)
HCPA	48	9	4	9	2	12	6	7	1	98
	(49,0)	(9,2)	(4,1)	(9,2)	(2,0)	(12,3)	(6,1)	(7,1)	(1,0)	(100)

Tabela 3. Distribuição dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de M-βla entre os sete Hospitais da ISCMPA.

	<i>Nº (%) de isolados M-βla positivos</i>					
	PSC	HSF	HSJ	PPF ^o	HSR	HCSA
	n=44	n =9	n =10	n =34	n=20	n=23
UTI	2 (4,5)	1(11,1)	3 (30,0)	1(2,9)	4 (20,0)	3 (13,0)
n-UTI	3 (6,8)	1(11,1)	2 (20,0)	2 (5,9)	4 (20,0)	2 (8,7)

Figura 1- Diagrama da distribuição dos discos para a realização dos testes de detecção das β -lactamases em MH

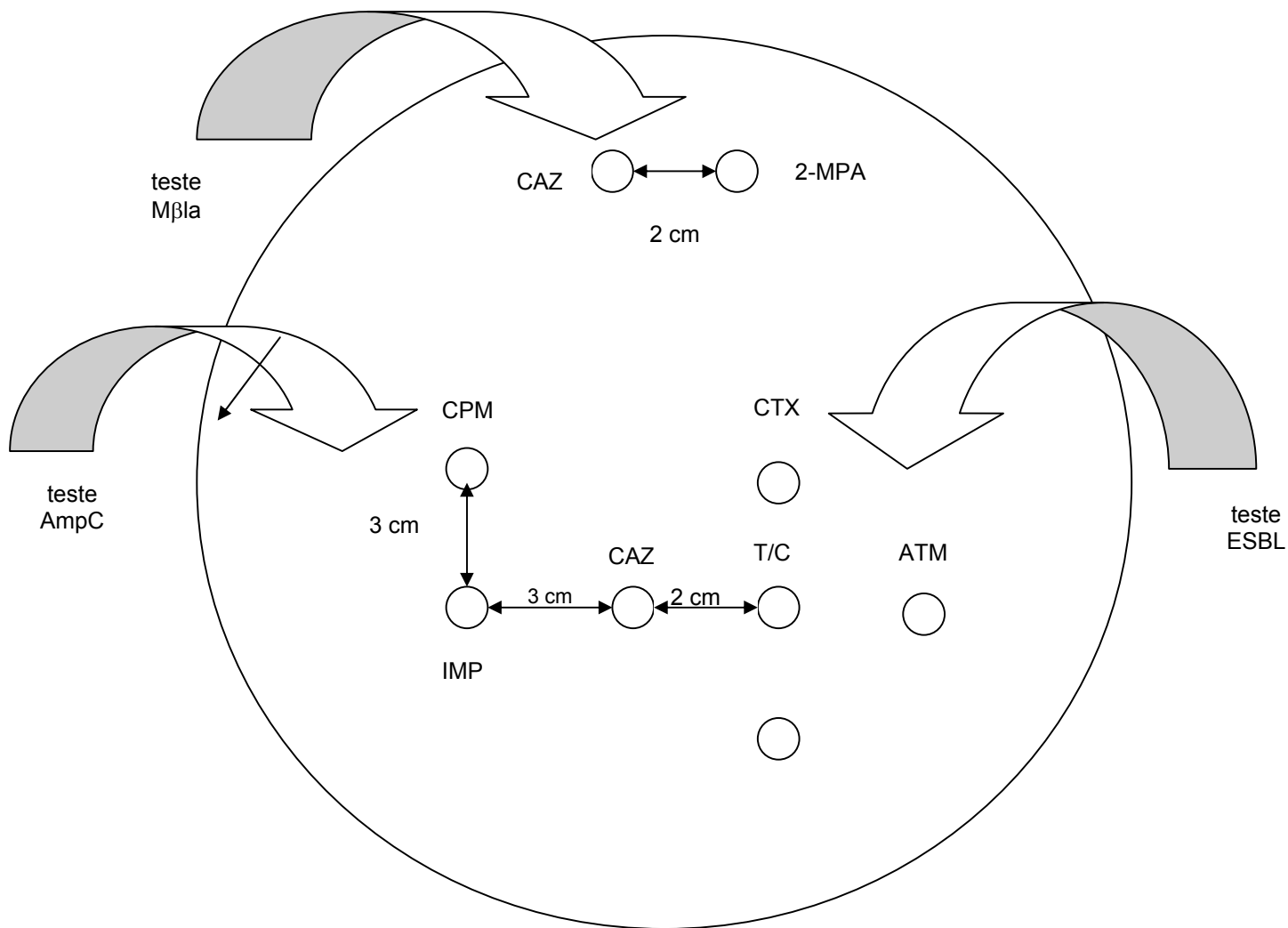


Figura 2 - Expressão da β -lactamase AmpC em isolado de *P. aeruginosa*.

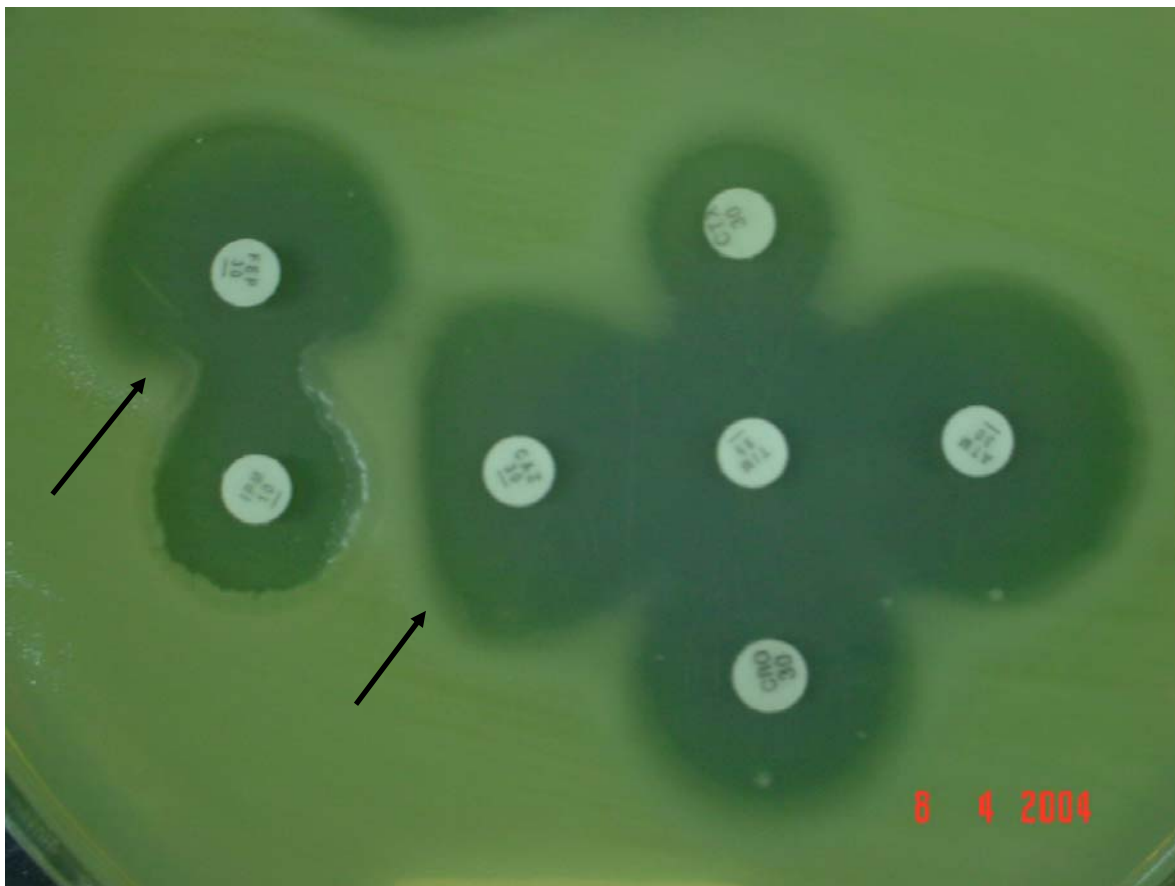


Figura 3 – Teste positivo (seta) para detecção de M- β la em isolado de *P. aeruginosa*

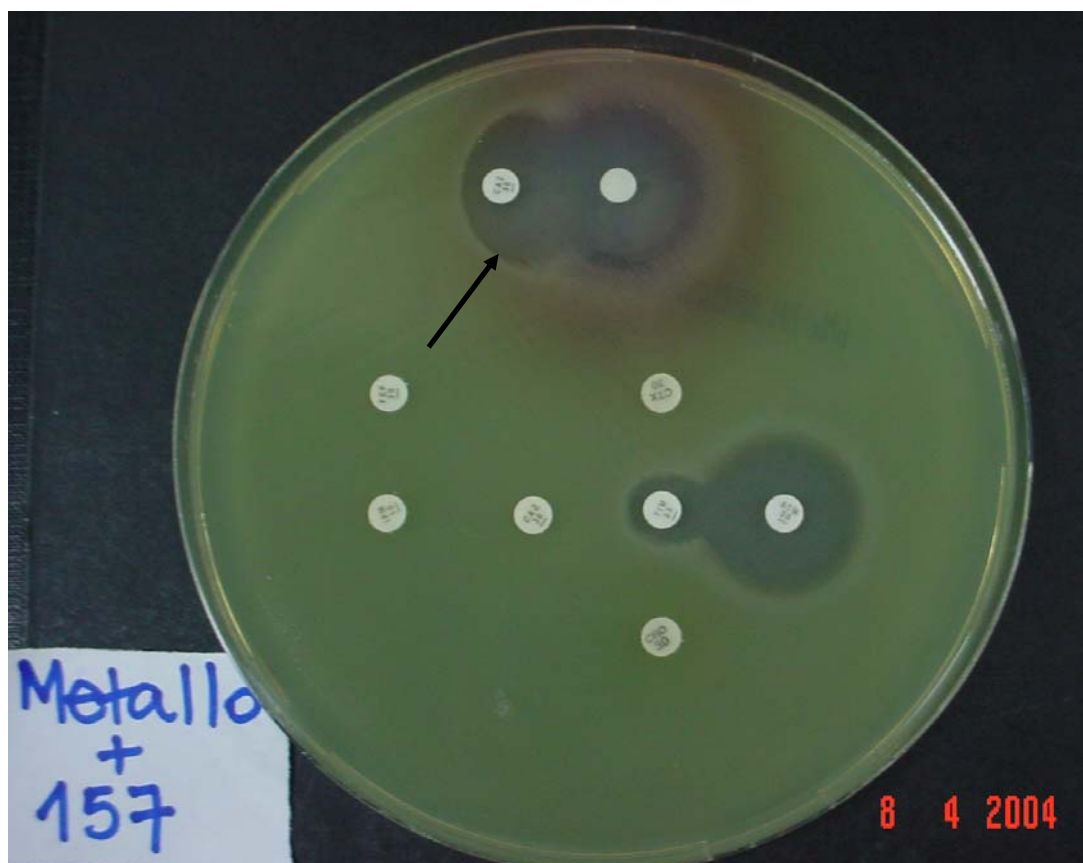
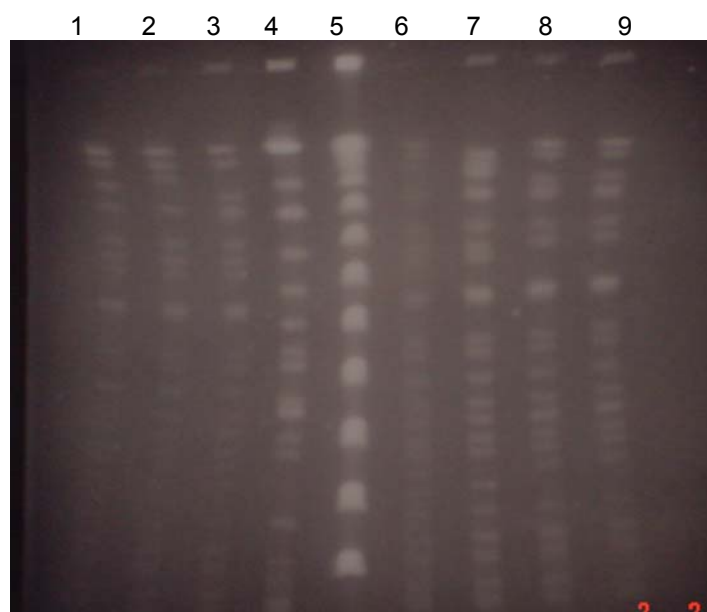
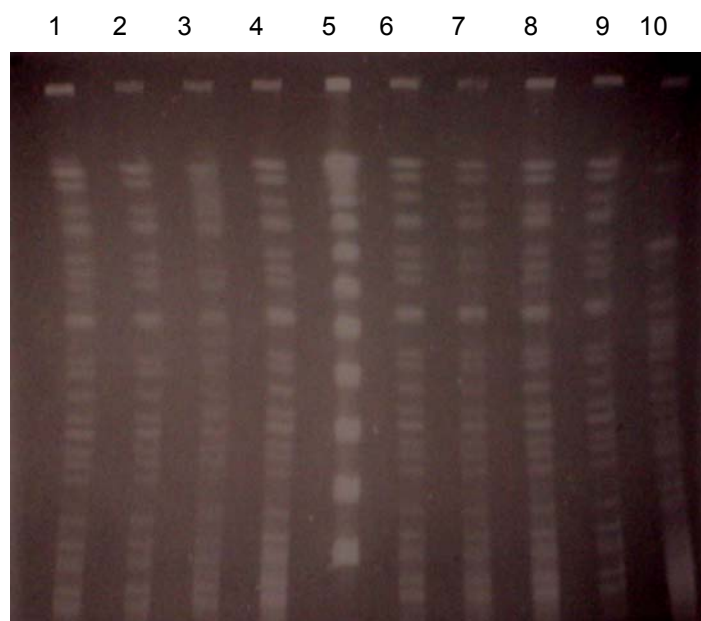


Figura 4 – Perfil de macrorestrição dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de M-βla da ISCMPA.



Linhas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9: clone A e subtipos
Linha 4: clone B
Linha 5: marcador de peso molecular (lambda ladder 48.5 Kb)

Figura 5 – Perfil de macrorestrição dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de M-βla da ISCMPA.



Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: clone A e subtipos
Linha 10: clone C
Linha 5: marcador de peso molecular (lambda ladder 48.5 Kb)

ANEXO

Termo de Compromisso para Utilização de Dados

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

Título do Projeto: MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *Pseudomonas aeruginosa*

Os autores do presente projeto de pesquisa se comprometem a manter o sigilo dos dados coletados em base de dados referentes a pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Concordam igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes.

Porto Alegre, 2001.

Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Ana Lúcia Saraiva Gonçalves