



**Aldina Maria  
Rodrigues Pena**

**Epidemiologia de metalo- $\beta$ -lactamases em isolados  
clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao  
imipenemo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Olga Cardoso, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

*Aos meus pais*

## **o júri**

presidente

**Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos**  
Professora Associada da Universidade de Aveiro

**Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva**  
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso**  
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

A todos quantos contribuíram para a realização deste trabalho quero manifestar o meu agradecimento:

À Professora Doutora Olga Cardoso, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradeço a oportunidade de desenvolver este trabalho, a orientação técnico-científica, o apoio, a motivação, os ensinamentos transmitidos e o tempo dispendido desde o início das actividades experimentais até à revisão da presente dissertação. O meu sincero e profundo obrigado.

Às Professoras Doutoradas Cristina Luxo, Gabriela da Silva e Maria do Céu de Sousa e ao Professor Doutor Rui Leitão, agradeço a disponibilidade demonstrada na minha aceitação e acolhimento no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e todo o apoio e ânimo manifestados durante a realização deste trabalho.

À Dr. Florinda Alves, do Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra, agradeço a cedência dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ao Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos da Faculdade de Ciências de Lisboa agradeço a sequenciação das amostras de DNA.

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Sr. Lúcia e Sr. Sandra, os meus agradecimentos por toda a colaboração que tiveram ao longo do desenvolvimento das actividades experimentais.

## palavras-chave

*Pseudomonas aeruginosa*,  $\beta$ -lactâmicos, carbapenemos, imipenemo, metalo- $\beta$ -lactamases.

## resumo

*Pseudomonas aeruginosa* é um patogénico humano oportunista responsável por infecções nosocomiais, particularmente em doentes imunocomprometidos. Os carbapenemos são agentes antimicrobianos frequentemente utilizados no tratamento de infecções provocadas por *P. aeruginosa*. Contudo, nesta espécie, tem-se verificado um aumento de estirpes resistentes a estes antibióticos. A produção de metalo- $\beta$ -lactamases constitui um dos mecanismos de resistência emergente aos carbapenemos. As metalo- $\beta$ -lactamases caracterizam-se pela eficiente capacidade de hidrolisar a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente os carbapenemos. A observação de isolados produtores das metalo- $\beta$ -lactamases IMP e VIM tem aumentado por todo o mundo. A metalo- $\beta$ -lactamase VIM é a mais frequente na Europa mediterrânica. Recentemente em *P. aeruginosa* foram descritas as metalo- $\beta$ -lactamases SPM-1 no Brasil e GIM na Alemanha. Neste trabalho foram estudados 136 isolados clínicos resistentes ao imipenemo seleccionados a partir de 773 isolados de *P. aeruginosa*, colhidos durante dois anos (Abril de 2003 e Abril de 2005) no Centro Hospitalar de Coimbra. As susceptibilidades destes isolados resistentes ao imipenemo a outros antibióticos foram: meropenemo 20,3%, ceftazidima 56,7%, cefepima 49,6%, piperacilina/tazobactam 47,4%, aztreonamo 37,3%, ampicilina 73,1% e ciprofloxacina 53,0%. O teste de sinergismo do duplo disco foi usado para triagem dos isolados clínicos resistentes ao imipenemo relativamente à presença de metalo- $\beta$ -lactamases, observando-se que 40 (29,4%) isolados apresentaram teste fenotípico positivo. O gene *bla*<sub>VIM</sub> foi detectado em 26 isolados (19,1%). As metalo- $\beta$ -lactamases IMP, SPM e GIM não foram detectadas. Por sequenciação verificou-se a presença de VIM-2 nestes 26 isolados. As CMIs dos isolados que apresentaram VIM-2 foram determinadas e os resultados revelaram que a piperacilina foi o antimicrobiano mais eficaz (84,6%) seguido do aztreonamo (76,9%), ceftazidima (53,8%) e meropenemo (20,3%). O gene *bla*<sub>VIM-2</sub> é encontrado com uma certa frequência em cassetes genéticas inseridas em integrões de classe 1. Em três isolados *bla*<sub>VIM-2</sub> positivos foram detectados estes integrões, verificando-se que o gene *bla*<sub>VIM-2</sub> estava inserido nesses integrões de classe 1 conferindo-lhes potencial de disseminação. A tipagem por RAPD dos isolados *bla*<sub>VIM-2</sub> positivos demonstrou 7 tipos de perfis (A a G), com predominância do perfil A que se encontrava disseminado por 5 Unidades Hospitalares, nomeadamente Medicina, Reanimação, Pneumologia, Neurocirurgia e Ortopedia.

**keywords**

*Pseudomonas aeruginosa*,  $\beta$ -lactam, carbapenems, imipenem, metallo- $\beta$ -lactamases.

**abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen and a leading cause of nosocomial infections, particularly in immunocompromised patients. Carbapenems are important therapeutic agents for the treatment of infection with multidrug-resistant Gram negative bacteria, such as *P. aeruginosa*. The production of metallo- $\beta$ -lactamases is one of the emerging mechanisms of carbapenem resistance in *P. aeruginosa*. The metallo- $\beta$ -lactamases confer efficient hydrolysis of almost all of  $\beta$ -lactam, especially carbapenems. Clinical isolates harbouring the metallo- $\beta$ -lactamases IMP and VIM have been increasingly reported worldwide, and VIM has been reported especially in Mediterranean Europe. Recently, in *P. aeruginosa* another two metallo- $\beta$ -lactamases have been described: SPM-1 in Brazil and GIM in Germany. For this work, 773 clinical isolates of *P. aeruginosa* were collected in Centro Hospitalar of Coimbra, during two years (April 2003 to April 2005). From these, 136 (17.6%) isolates were selected because they were resistant to imipenem. The susceptibilities to others antibiotics of imipenem resistant isolates were: meropenem 20.3%, ceftazidime 56.7%, cefepime 49.6%, piperacillin plus tazobactam 47.4%, aztreonam 37.3%, amikacin 73.1% and ciprofloxacin 53.0%. Clinical isolates of *P. aeruginosa* imipenem resistant were initially screened for the presence of metallo- $\beta$ -lactamases by a double-disk synergy test. Forty (29.4%) isolates had positive phenotypic screening tests. Twenty-six isolates (19.1%) demonstrated the presence of *bla*<sub>VIM</sub>. The others metallo- $\beta$ -lactamases tested were negative. Sequencing demonstrated the presence of VIM-2 enzyme in these 26 isolates.

Among these strains that harboured VIM-2, MICs were determined and the results revealed that piperacillin inhibited 84.6% followed by aztreonam 76.9%, ceftazidime 53.8% and meropenem 20.3%. The *bla*<sub>VIM-2</sub> gene is usually in a gene cassette integrated in class 1 integrons. In the isolates *bla*<sub>VIM-2</sub> positives the class 1 integrons were detected in three isolates. In these isolates *bla*<sub>VIM-2</sub> gene were inserted in class 1 integrons with the potential to spread.

RAPD typing of the isolates *bla*<sub>VIM-2</sub> positives demonstrated seven distinct amplification patterns (A to G), with predominance of pattern A, that was disseminated in 5 wards, namely Medicine, Reanimation, Pneumonology, Neurosurgery and Orthotraumatology.

## ÍNDICE

---





---

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE QUADROS.....	xix
ABREVIATURAS.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	1
1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	3
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> COMO PATOGENICO NOSOCOMIAL.....	3
3. TERAPÉUTICA DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
4. ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS.....	5
4.1. CARBAPENEMOS.....	6
5. MECANISMO DE ACÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS.....	7
6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS.....	8
6.1. REDUÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA EXTERIOR.....	8
6.2. MECANISMO DE EFLUXO.....	8
6.3. ALTERAÇÃO DE <i>PENICILLIN-BINDING PROTEINS</i> .....	9
6.4. $\beta$ -LACTAMASES.....	10
6.4.1. MECANISMOS DE ACÇÃO DAS $\beta$ -LACTAMASES.....	10
6.4.2. CLASSIFICAÇÃO DAS $\beta$ -LACTAMASES.....	10
6.4.2.1. $\beta$ -LACTAMASE Ampc.....	13
6.4.2.2. METALO- $\beta$ -LACTAMASES.....	14
6.4.2.2.1. METALO- $\beta$ -LACTAMASE IMP.....	15
6.4.2.2.2. METALO- $\beta$ -LACTAMASE VIM.....	15
6.4.2.2.3. METALO- $\beta$ -LACTAMASE SPM.....	17
6.4.2.2.4. METALO- $\beta$ -LACTAMASE GIM.....	17
7. AMBIENTE GENÉTICO DAS METALO- $\beta$ -LACTAMASES.....	17

---

7.1. INTEGRÕES .....	18
8. EPIDEMIOLOGIA DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES.....	19
OBJECTIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
1. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	27
3. DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	28
3.1. MÉTODO DE DIFUSÃO: TÉCNICA DE KIRBY-BAUER.....	28
3.2. MÉTODO DO E-TEST.....	28
4. DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES.....	29
4.1. PESQUISA FENOTÍPICA: TESTE DE SINERGISMO DO DUPLO DISCO IMPENEMO-EDTA .....	29
4.2. PESQUISA GENOTÍPICA .....	29
4.2.1. EXTRACÇÃO DE DNA TOTAL POR FERVURA.....	30
4.2.2. AMPLIFICAÇÃO DE GENES POR PCR .....	30
4.2.2.1. DETECÇÃO DE GENES <i>bla</i> .....	30
4.2.2.2. DETECÇÃO DE INTEGRÕES DE CLASSE 1.....	33
4.2.2.3. PESQUISA DE GENES <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> EM INTEGRÕES DE CLASSE 1.....	33
4.2.2.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR.....	34
4.2.2.5. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DE DNA.....	34
5. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA).....	34
5.1. EXTRACÇÃO DE DNA TOTAL PELO KIT AQUAPURE GENOMIC DNA ISOLATION.....	34
5.2. RAPD.....	35
5.3. ELECTROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR RAPD.....	36
RESULTADOS.....	37
1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	40
3. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RESISTENTES AO IMPENEMO.....	40
4. DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES.....	41
4.1. PESQUISA FENOTÍPICA: TESTE DE SINERGISMO DO DUPLO DISCO IMPENEMO-EDTA.....	41
4.2. PESQUISA GENOTÍPICA: DETECÇÃO DE GENES <i>bla</i> POR PCR.....	42
4.3. DIFERENÇA ENTRE OS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ISOLADOS POSITIVOS PELO TESTE FENOTÍPICO E RELAÇÃO COM OS ISOLADOS QUE REVELARAM A PRESENÇA DE VIM.....	43

---

4.4. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO POR PCR.....	44
5. DETERMINAÇÃO DAS CMIS DOS ISOLADOS PRODUTORES DE VIM-2 .....	44
6. DETECÇÃO DE INTEGRÕES DE CLASSE 1.....	45
7. PESQUISA DE GENES <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> EM INTEGRÕES DE CLASSE 1.....	46
8. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD.....	46
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RESISTENTES AO IMPENEMO .....	51
2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RESISTENTES AO IMPENEMO.....	52
3. METALO- $\beta$ -LACTAMASES.....	54
4. SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS PRODUTORES DE VIM-2.....	57
5. GENES <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> E INTEGRÕES DE CLASSE 1.....	58
6. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD.....	59
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>67</b>

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

---



---

<b>FIGURA 1</b>	Estrutura química dos $\beta$ -lactâmicos: penicilinas (A), cefalosporinas (B), monobactâmicos (C) e carbapenemos (D) (adaptado de Sousa, 2001).	<b>Página 5</b>
<b>FIGURA 2</b>	Estrutura química dos carbapenemos: imipenemo (A), meropenemo (B) e ertapenemo (C) (adaptado de Shah <i>et al.</i> , 2003).	<b>Página 7</b>
<b>FIGURA 3</b>	Distribuição (%) dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenemo em indivíduos dos sexos masculino e feminino pelos diversos grupos etários.	<b>Página 40</b>
<b>FIGURA 4</b>	Frequência de susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos em isolados clínicos (n=136) de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenemo.	<b>Página 41</b>
<b>FIGURA 5</b>	Teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA mostrando o efeito inibitório do crescimento do isolado de <i>P. aeruginosa</i> (nº 541) causado pela adição de 10 $\mu$ l EDTA (750 $\mu$ g/ml) ao disco de imipenemo (I) (10 $\mu$ g).	<b>Página 41</b>
<b>FIGURA 6</b>	Separação eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os <i>primers</i> específicos para a detecção dos genes <i>bla</i> <sub>IMP</sub> e <i>bla</i> <sub>VIM</sub> . Linha M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linhas 2, 5 e 7, isolados nº 21800, 429 e 541, respectivamente (amplicões de 815 pb); linhas 1, 3, 4 e 6, isolados nº 20134, 20912, 20463 e 524, respectivamente; linha P, controlo positivo; linha N, controlo negativo.	<b>Página 42</b>
<b>FIGURA 7</b>	Relação entre a diferença dos diâmetros dos halos de inibição dos isolados positivos pelo teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA e dos isolados que revelaram a presença de <i>bla</i> <sub>VIM</sub> por PCR.	<b>Página 43</b>
<b>FIGURA 8</b>	Gel de agarose após separação eletroforética dos produtos amplificados por PCR com os <i>primers</i> específicos para a detecção de integrões de classe 1. Linha M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linha 1 isolado nº 19168 (amplicão de 3 Kb); linhas 2 à 11, isolados nº 19210, 712, 11874, 12321, 15153, 14349, 17053, 18769, 21800 e 429, respectivamente; linha P, controlo positivo, isolado nº 9287 (amplicão de 1 Kb); linha 12, isolado nº 17083 (com amplicão de 3 Kb); Linha N, controlo negativo.	<b>Página 46</b>
<b>FIGURA 9</b>	Perfis de RAPD de 26 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa bla</i> <sub>VIM-2</sub> positivos, obtidos com o <i>primer</i> 272. Linhas M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linhas 1 à 26, isolados.	<b>Página 48</b>





## **ÍNDICE DE QUADROS**

---



<b>QUADRO I</b>	Classificação das $\beta$ -lactamases de Bush-Jacoby-Medeiros (adaptado de Bush <i>et al.</i> , 1995).	<b>PÁGINA 12</b>
<b>QUADRO II</b>	<i>Primers</i> utilizados na detecção de genes de metalo- $\beta$ -lactamases.	<b>PÁGINA 32</b>
<b>QUADRO III</b>	Condições de amplificação utilizadas na pesquisa de genes de metalo- $\beta$ -lactamases.	<b>PÁGINA 32</b>
<b>QUADRO IV</b>	Distribuição (%) dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenemo com origem hospitalar e de ambulatório pelos diferentes produtos biológicos.	<b>PÁGINA 39</b>
<b>QUADRO V</b>	Concentração mínima inibitória dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos (imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina) de 26 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2.	<b>PÁGINA 45</b>
<b>QUADRO VI</b>	Isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 e respectiva informação da data de isolamento, Unidade Hospitalar e perfil RAPD.	<b>PÁGINA 47</b>



## **ABREVIATURAS**

---



<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>E-Test</b>	Epsilon Test
<b>GIM-1</b>	German Imipenemase
<b>IMP</b>	Imipenemase
<b>kb</b>	Kilobases
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>nº</b>	Número
<b>nm</b>	Nanometro
<b>NNIS</b>	National Nosocomial Infection Surveillance System
<b>°C</b>	Graus Célcus
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PBPs</b>	Penicillin-Binding Proteins
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction
<b>q.b.p.</b>	Quanto Baste Para
<b>RND</b>	Resistance-Nodulation-Division
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SPM-1</b>	São Paulo Metalo- $\beta$ -lactamase
<b>T</b>	Temperatura
<b>UCIs</b>	Unidades de Cuidados Intensivos
<b>V</b>	Volt
<b>VIM</b>	Verona Imipenemase
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micramolar





## INTRODUÇÃO

---



## 1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* pertence à família *Pseudomonadaceae*, é um bacilo de Gram negativo, não esporulado e móvel através de um flagelo polar (Sá-Correia, 2000).

O metabolismo é tipicamente respiratório aeróbio, nunca fermentativo, podendo reduzir o nitrato em condições de anaerobiose. A temperatura óptima de crescimento é de 37°C mas consegue crescer até aos 42°C (Todar, 2004). É pouco exigente em termos nutricionais sendo capaz de crescer em meios de cultura contendo apenas acetato como fonte de carbono e sulfato de amónio, como fonte de azoto (Todar, 2004).

Esta espécie produz pigmentos solúveis, sobretudo piocianina e pioverdina que conferem ao meio de cultura a coloração azul fluorescente e amarelo esverdeado, respectivamente (Todar, 2004).

Considera-se um microrganismo ubiqüitário, particularmente em ambientes húmidos, podendo ser isolado da água, solo, plantas, animais e de amostras clínicas. No meio hospitalar pode contaminar água considerada “esterilizada”, soro fisiológico, ventiladores, diversos materiais hospitalares e mesmo alguns antisépticos e detergentes aquosos (Sá-Correia, 2000). Por outro lado, é constantemente introduzida no meio hospitalar através de pessoas e de alimentos contaminados (Todar, 2004).

A patogenicidade de *P. aeruginosa* é conferida por diversos factores de virulência e resistência aos agentes antimicrobianos que contribuem para o seu desenvolvimento como microrganismo oportunista. A aderência das células mediada pelos pili e outras adesinas parece ser importante para a colonização de membranas mucosas e outras superfícies (Ramphal *et al.*, 1985; Diog *et al.*, 1988; Prince *et al.*, 1992). Outro factor relevante é a produção de alginato, um polissacarídeo extracelular mucóide que permite a adesão entre as células bacterianas e o meio e consequentemente o crescimento em biofilme. Desta forma, *P. aeruginosa* fica protegida contra as defesas do sistema imunitário do hospedeiro e da acção dos agentes antimicrobianos (Mai *et al.*, 1993; Boyd & Chakrabarty, 1995; Hoiby *et al.*, 2001; Drenkard & Ausubel, 2002; Olson *et al.*, 2002; Todar, 2004).

A invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro são efectuadas por diversos produtos secretados, incluindo elastases, proteases, citotoxinas, exotoxinas e hemolisinas (Sá-Correia, 2000; Todar, 2004).

## 2. *Pseudomonas aeruginosa* COMO PATOGENICO NOSOCOMIAL

*P. aeruginosa* é um agente patogénico oportunista que raramente causa infecções em indivíduos saudáveis. Na maioria dos casos, para se iniciar uma infecção, é necessário que ocorra alteração ou destruição de barreiras físicas (queimaduras, utilização de cateteres intravenosos e urinários, sondas orotraqueais, feridas cirúrgicas e outros

procedimentos invasivos) e/ou um sistema imunitário deficiente (sobretudo em doentes com SIDA, cancerosos ou sujeitos a tratamento com agentes imunossupressores) (Sá-Correia, 2000).

Outros factores de risco para aquisição de infecções causadas por *P. aeruginosa* são a idade avançada, diabetes mellitus, hospitalização prolongada e uso prévio de agentes antimicrobianos (Rossolini & Mantengoli, 2005).

Entre as infecções nosocomiais mais graves provocadas por *P. aeruginosa* encontram-se infecções do aparelho urinário, otites externas, endocardites, meningites, pneumonias e septicémias. Em doentes com fibrose quística tem incidência elevada, originando infecções respiratórias crónicas (Sá-Correia, 2000).

Nos Estados Unidos da América, *P. aeruginosa* é a primeira causa de pneumonia nosocomial em Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), quarta causa de infecções urinárias e o sexto microrganismo patogénico mais frequentemente isolado da corrente sanguínea de doentes internados em UCIs (NNIS, 1999).

Na Europa, é o terceiro microrganismo patogénico mais comumente isolado de infecções nosocomiais em UCIs (Vicent *et al.*, 1995).

### **3. TERAPÊUTICA DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa***

Os antibióticos frequentemente administrados na terapêutica de infecções causadas por *P. aeruginosa* são os  $\beta$ -lactâmicos (imipenemo, meropenemo, aztreonamo, ceftazidima, cefepima, piperacilina e ticarcilina), os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina) e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina) (Giamarellou & Antoniadou, 2001; Jones *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2005).

A co-administração de agentes antimicrobianos é essencial para reduzir as probabilidades de selecção de mutantes resistentes durante a terapia, assim como para obter sinergia entre alguns agentes (Rossolini & Mantengoli, 2005). Os aminoglicosídeos são frequentemente utilizados em regime terapêutico combinado com um  $\beta$ -lactâmico no tratamento de infecções graves provocadas por *P. aeruginosa*, não sendo recomendada a monoterapia (Carmeli *et al.*, 1999b). Outra alternativa consiste na administração de uma fluoroquinolona com uma penicilina de espectro alargado (Hauser & Sriram, 2005). De referir que deve ser evitada a combinação de dois  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente do imipenemo e piperacilina, devido ao efeito antagonista (Hauser & Sriram, 2005).

O aumento da frequência de estirpes multi-resistentes nos últimos anos e a ausência de novos antimicrobianos eficazes conduziram à reutilização de antibióticos como as polimixinas (polimixina B e colistina), que deixaram de ser prescritos no início dos anos oitenta devido à elevada nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Horton & Pankey, 1982; Giamarellou, 2002; Stein & Raoult, 2002). No entanto, as polimixinas podem constituir

uma opção terapêutica em estirpes que apresentam resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Levin *et al.*, 1999; Giamarellou, 2002).

No tratamento empírico a escolha do agente antimicrobiano deve basear-se nos perfis de susceptibilidade observados na área geográfica e hospital em causa devendo considerar-se o risco de emergência de resistência durante o tratamento (Jones *et al.*, 2002). Adicionalmente, deve evitar-se a administração de antibióticos aos quais o doente esteve recentemente exposto (Hauser & Sriram, 2005).

Uma política mais restritiva na prescrição dos agentes antimicrobianos e também o uso adequado desses agentes na dose e período correctos são práticas essenciais para diminuir a selecção e a disseminação da resistência aos antibióticos.

#### 4. ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representam mais de metade do número total de agentes antimicrobianos disponíveis, sendo utilizados no tratamento de infecções causadas por microrganismos de Gram positivo e de Gram negativo (Kotra & Mobashery, 1998; Page, 1999; Therrien & Levesque, 2000).

A utilização terapêutica generalizada dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é justificada pela eficácia antimicrobiana e baixa toxicidade para as células eucariotas (Sousa & Prista, 1988). No entanto, a eficácia destes antibióticos é constantemente desafiada pela emergência de estirpes bacterianas resistentes.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos caracterizam-se por possuírem uma estrutura cíclica constituída por três átomos de carbono e um de azoto, denominada anel  $\beta$ -lactâmico, que é essencial para a actividade antibacteriana (figura 1). As cadeias laterais determinam parte do espectro antibacteriano e as propriedades farmacológicas de cada um dos compostos (Chambers, 2000).

Esta classe de antibióticos inclui vários grupos nomeadamente, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos.

Nas penicilinas, o anel  $\beta$ -lactâmico encontra-se fundido com um anel tiazolidina e com um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas (Sousa & Prista, 1988; Greenwood, 1998).

Os monobactâmicos têm na sua estrutura um único anel  $\beta$ -lactâmico, sendo o aztreonamo o  $\beta$ -lactâmico monocíclico usado na terapêutica.

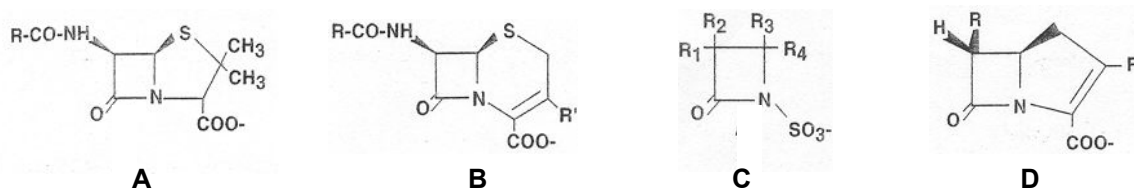


Figura 1. Estrutura química dos  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas (A), cefalosporinas (B), monobactâmicos (C) e carbapenemos (D) (adaptado de Sousa, 2001).

#### 4.1. CARBAPENEMOS

Os carbapenemos apresentam uma estrutura semelhante às penicilinas, excepto no anel que contem uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3, e o átomo de enxofre que é substituído por um carbono, sendo derivados da tienamicina (figura 2) (Sousa & Prista, 1988).

Os carbapenemos disponíveis para uso clínico em Portugal são o imipenemo, o meropenemo e o ertapenemo, sendo os dois primeiros utilizados com maior frequência.

O imipenemo foi o primeiro carbapenemo a ser lançado no mercado (Jones & Pfaller, 1998). Para manter a actividade antibacteriana e diminuir a nefrotoxicidade, o imipenemo deve ser co-administrado com a cilastatina, um inibidor da dihidropeptidase-1 renal humana, que degrada o imipenemo (Hikida *et al.*, 1992, Edwards & Betts, 2000).

A síntese do meropenemo representou um avanço na área de desenvolvimento dos carbapenemos, por ser mais estável à hidrólise pela dihidropeptidase-1 renal humana, permitindo a sua administração como agente único, sem ser necessária a sua associação com cilastatina (Edwards & Betts, 2000).

A administração do ertapenemo também não requer a associação com a cilastatina, e apresenta a vantagem de ser administrado em apenas uma dose diária, enquanto o imipenemo e o meropenemo são administrados diversas vezes por dia (Shah & Isaacs, 2003).

Estudos que compararam a actividade antimicrobiana dos carbapenemos demonstram que o meropenemo e o ertapenemo são intrinsecamente um pouco menos potentes relativamente ao imipenemo contra aeróbios de Gram positivo, mas são mais activos contra aeróbios de Gram negativo, incluindo *P. aeruginosa*, e apresentam actividades semelhantes contra anaeróbios de Gram negativo (Gales *et al.*, 1997; Pfaller & Jones, 1997; Edwards & Betts, 2000; Shah & Isaacs, 2003). Adicionalmente, a administração do imipenemo ou do meropenemo é particularmente adequada em infecções nosocomiais enquanto a administração do ertapenemo é mais apropriada no tratamento de infecções adquiridas na comunidade (Shah & Isaacs, 2003).

Os carbapenemos são os  $\beta$ -lactâmicos usados com maior frequência no tratamento de infecções nosocomiais causadas por *P. aeruginosa*, por apresentarem maior espectro de actividade e maior estabilidade contra a hidrólise pelas  $\beta$ -lactamases (Cornaglia *et al.*, 2000). Contudo, a eficácia terapêutica dos carbapenemos tem sido ameaçada pela emergência de isolados resistentes a estes agentes antimicrobianos, principalmente os produtores de metalo- $\beta$ -lactamases (Peleg *et al.*, 2005).

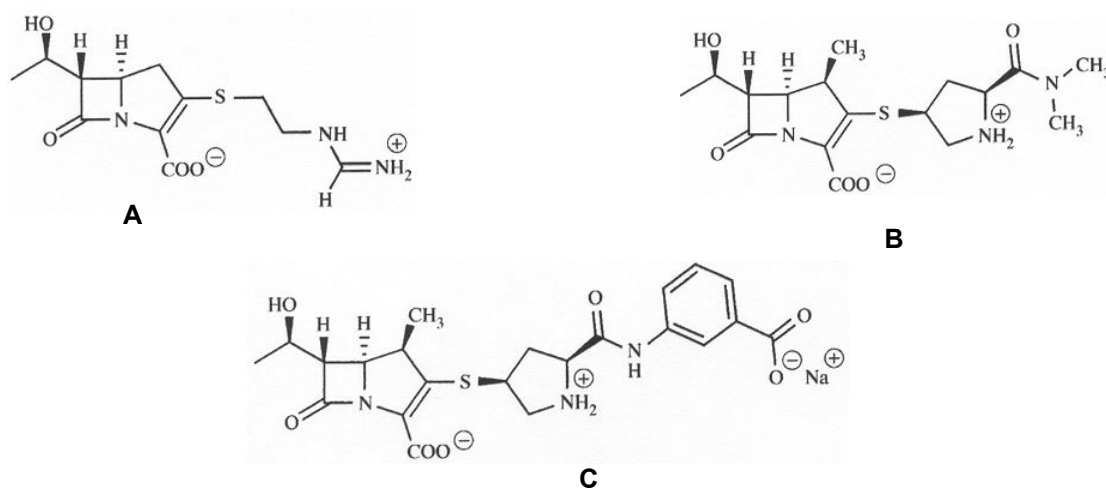


Figura 2. Estrutura química dos carbapenemos: imipenemo (A), meropenemo (B) e ertapenemo (C) (adaptado de Shah *et al.*, 2003).

## 5. MECANISMO DE ACÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS

A actividade dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos depende da capacidade para se difundirem através da parede celular bacteriana, da afinidade para as enzimas alvo designadas por *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs) localizadas no folheto externo da membrana citoplasmática e da estabilidade à hidrólise mediada por enzimas bacterianas (Dever & Dermody, 1991; Bush & Miller, 1998; Kotra & Mobashery, 1999).

As PBPs possuem actividade de carboxipeptidase e de transpeptidase e estão envolvidas em várias fases do processo de construção, manutenção e regulação da matriz de peptidoglicano que assegura a rigidez da parede celular bacteriana, essencial para a sobrevivência da célula (Dever & Dermody, 1991; Spratt, 1994; Sousa *et al.*, 1998; Kotra & Mobashery, 1999).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem a D-alanil-D-alanina transpeptidase por acilação, formando ésteres estáveis entre o anel  $\beta$ -lactâmico aberto e o grupo hidroxilo da enzima. Estes ésteres têm semi-vida de hidrólise de várias horas, por isso, a inactivação é efectivamente permanente (Livermore & Williams, 1996).

A capacidade dos  $\beta$ -lactâmicos em inibir as carboxipeptidases e transpeptidases deve-se à semelhança conformacional da ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico e a ligação peptídica análoga da D-alanil-D-alanina (Livermore & Williams, 1996).

A inibição de diferentes PBPs, por diferentes antibióticos abaixo da respectiva concentração mínima inibitória, interfere com a divisão celular ou altera a forma das células. Doses sub-inibitórias de aztreonamo, que possui uma afinidade muito específica para a PBP-3, interferem com a divisão celular e dão lugar à formação de células filamentosas (Sousa & Prista, 1988). Por outro lado, a inibição da PBP-1 provoca a lise celular enquanto a inibição da PBP-2 forma esferoplastos e não interfere na divisão celular (Sousa & Prista, 1988; Sousa, 2001).

## 6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS

Actualmente são conhecidos quatro mecanismos de resistência de *P. aeruginosa* aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: redução da permeabilidade da membrana exterior, mecanismo de efluxo, alteração de PBPs e produção de  $\beta$ -lactamases.

Em *P. aeruginosa* estes mecanismos de resistência podem ser expressos em simultâneo, limitando as opções terapêuticas no tratamento de infecções causadas por este microrganismo.

### 6.1. REDUÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA EXTERIOR

Os  $\beta$ -lactâmicos são moléculas hidrofílicas que têm de atravessar a membrana exterior das bactérias de Gram negativo para atingirem as PBPs. Portanto, a difusão destes antibióticos para o espaço periplasmático efectua-se devido à existência na membrana exterior de canais aquosos designados de porinas (Nikaido, 2000).

Alterações na permeabilidade da membrana exterior, por ausência ou expressão diminuída de determinadas porinas, estão associadas à redução de susceptibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos (Livingstone *et al.*, 1995; Hancock, 1998; Nikaido, 2003).

Entre as principais porinas descritas em *P. aeruginosa* encontram-se a OprD, que facilita a difusão de aminoácidos básicos e pequenos péptidos através da membrana exterior (Trias & Nikaido, 1990; Huang & Hancock, 1993; Ochs *et al.* 1999). Adicionalmente, também permite a penetração celular de carbapenemos, mas não de outros  $\beta$ -lactâmicos (Huang & Hancock, 1993). A ausência ou níveis diminuídos de OprD conferem resistência ao imipenemo e diminuem a susceptibilidade ao meropenemo (Livermore *et al.*, 2001).

Por outro lado, verificou-se a diminuição dos níveis de OprE em mutantes de *P. aeruginosa* resistentes às cefalosporinas (Yamano *et al.*, 1990). A expressão desta porina é induzida em condições de anaerobiose em que o nitrato funciona como aceitador de electrões (Nikaido, 2003).

A porina OprF está relacionada com a manutenção da forma da célula bacteriana sendo necessária para o crescimento em ambientes de baixa osmolaridade (Rawling *et al.*, 1998). Apesar de abundante, a porina OprF constitui uma via de entrada ineficiente de antibióticos (Hancock, 1998).

### 6.2. MECANISMO DE EFLUXO

A hiperexpressão de sistemas de efluxo constitui um mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa*, através da excreção de antimicrobianos do citoplasma permitindo a redução da concentração no interior da célula bacteriana (Livermore, 2001).



Em *P. aeruginosa* são conhecidos quatro sistemas de efluxo da família *Resistance-Nodulation-Division* (RND) capazes de contribuir para a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, denominados MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (Nikaido, 1998; Livermore, 2002).

Cada sistema de efluxo da família RND é constituído por três proteínas: proteína responsável pelo efluxo de substâncias através da membrana interior (MexB, MexD, MexF, MexY), proteína de fusão membranar (MexA, MexC, MexE, MexX) e proteína que efectua o efluxo através da membrana exterior (OprM, OprJ, OprN) (Nikaido *et al.*, 1998).

O sistema de efluxo MexAB-OprM codificado pelo operão *mexAB-oprM* contribui para a resistência à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, excepto ao imipenemo (Ziha-Zarifi *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2000; Srikumar *et al.*, 2000; Rossolini & Mantengoli, 2005). Neste sentido, o aumento da expressão deste sistema de efluxo aumenta a concentração mínima inibitória de penicilinas, cefalosporinas de espectro alargado, tetraciclinas e também de fluoroquinolonas (Li *et al.*, 2000).

Os sistemas MexCD-OprJ e MexXY-OprM diminuem a susceptibilidade de alguns cefemos, do meropenemo e de fluoroquinolonas (Masuda *et al.*, 2000; Rossolini & Mantengoli, 2005). Adicionalmente, o sistema de efluxo MexXY-OprM contribui para a resistência aos aminoglicosídeos (Livermore, 2002; Rossolini & Mantengoli, 2005).

Por outro lado, o sistema MexEF-OprN efluxa as fluoroquinolonas mas não os  $\beta$ -lactâmicos. No entanto, a hiperexpressão deste sistema diminui a expressão da porina OprD, conferindo indirectamente resistência ao imipenemo e diminuindo a susceptibilidade ao meropenemo (Köhler *et al.*, 1999; Ochs *et al.* 1999; Rossolini & Mantengoli, 2005).

### **6.3. ALTERAÇÃO DE PENICILLIN-BINDING PROTEINS**

A alteração de PBPs, nomeadamente a expressão de PBPs com reduzida afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos ou a diminuição da expressão de PBPs específicas, impede a formação de ligações covalentes entre os  $\beta$ -lactâmicos e as PBPs, conferindo resistência a estes antimicrobianos (Cornaglia *et al.*, 1995).

Apesar da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos causada pela alteração de PBPs se encontrar descrita principalmente em microrganismos de Gram positivo, também ocorre em microrganismos de Gram negativo (Liao & Hancock, 1997).

Em *P. aeruginosa*, o imipenemo apresenta elevada afinidade pela PBP-2 enquanto o meropenemo tem afinidade pela PBP-3, por consequência a alteração destas PBPs contribui para a resistência aos carbapenemos (Cornaglia *et al.*, 1995; Liao & Hancock, 1997).

## 6.4. $\beta$ -LACTAMASES

A principal causa de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é a produção de  $\beta$ -lactamases, nomeadamente em bactérias de Gram negativo como *P. aeruginosa* (Bush, 1989; Livermore, 1995; Nordmann, 1998; Thomson & Bonomo, 2005).

### 6.4.1. MECANISMOS DE ACÇÃO DAS $\beta$ -LACTAMASES

As  $\beta$ -lactamases são hidrolases que actuam na ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tornando-os inactivos, antes destes atingirem as PBPs (Bush, 1989).

A reacção catalisada pelas  $\beta$ -lactamases de centro serina é essencialmente a mesma, independentemente da enzima e substrato envolvidos. Numa primeira etapa forma-se um intermediário reversível, não covalente, enzima-substrato. Seguidamente, o anel  $\beta$ -lactâmico é hidrolisado e forma-se uma nova ligação, covalente, entre a enzima e o substrato, originando um intermediário enzima-acilo. Com a desacilação deste intermediário há regeneração da enzima activa e ocorre libertação do antibiótico inactivo (Sanders, 1989).

A maioria das  $\beta$ -lactamases hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico pela formação de um éster entre a serina do centro activo da enzima e esse anel. No entanto, algumas enzimas utilizam iões de zinco do centro activo para romper o anel  $\beta$ -lactâmico, sendo denominadas metalo-enzimas (Livermore, 1995; Bush, 1998)

As  $\beta$ -lactamases localizam-se principalmente no espaço periplasmático, aptas a interceptar os  $\beta$ -lactâmicos que entram na célula bacteriana (Du Bois *et al.*, 1995), podendo ocorrer alguma libertação extracelular de  $\beta$ -lactamases (Livermore, 1995).

### 6.4.2. CLASSIFICAÇÃO DAS $\beta$ -LACTAMASES

A grande diversidade de  $\beta$ -lactamases, suas propriedades e a constante descoberta de novas enzimas, têm dificultado a sua classificação. Assim, foram propostas várias classificações, umas baseadas em características cinéticas e bioquímicas das enzimas, outras com uma base molecular.

As classificações das  $\beta$ -lactamases de Ambler (Ambler, 1980) e de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995) são consideradas as mais importantes.

A classificação molecular das  $\beta$ -lactamases foi proposta por Ambler (1980) quando apenas se conheciam quatro sequências de aminoácidos de  $\beta$ -lactamases. Existia apenas uma classe de enzimas com centro activo de serina, as  $\beta$ -lactamases de classe A, que incluía a penicilinase PC1 de *Staphylococcus aureus*. A classe B era constituída pela metalo- $\beta$ -lactamase de *Bacillus cereus*. Posteriormente, esta classificação foi

completada com a inclusão de cefalosporinases de Classe C (Jaurin & Grundstrom, 1981) e de oxacilinas, de classe D (Ouellette *et al.*, 1987; Huovinen *et al.*, 1988).

As classes moleculares A, C e D compreendem grupos distintos de enzimas, mas todas apresentam centro activo de serina, enquanto a classe B inclui as metalo- $\beta$ -lactamases que apresentam iões de zinco no centro activo (Livermore, 1995).

A classificação das  $\beta$ -lactamases de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995) baseia-se nas características funcionais das enzimas e na correlação com as respectivas estruturas moleculares. Nesta classificação as  $\beta$ -lactamases são agrupadas de acordo com a classe molecular a que pertencem, com a afinidade para os substratos benzilpenicilina, cefaloridina, carbenicilina, cloxacilina ou oxacilina, cefalosporinas de terceira geração ou aztreonamo e imipenemo e pela inibição pelo ácido clavulânico ou pelo EDTA. Assim, é constituída por quatro grupos principais de enzimas, definidos pelos perfis de substratos e inibidores (quadro I).

O grupo 1 compreende cefalosporinases fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas muitas vezes inibidas por baixas concentrações de aztreonamo ou cloxacilina.

O grupo 2 inclui as penicilinas, cefalosporinas e  $\beta$ -lactamases de espectro hidrolítico alargado, geralmente inibidas por inibidores direccionados ao centro activo destas enzimas e que pertencem às classes moleculares A e D de Ambler. Este grupo compreende uma grande variedade de enzimas que se distribuem por vários subgrupos.

O subgrupo 2a engloba as penicilinas clássicas de bactérias de Gram positivo inibidas pelo ácido clavulânico.

O subgrupo 2b contém enzimas que hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas sendo inibidas pelo ácido clavulânico.

O subgrupo 2be é formado pelas  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, enzimas com capacidade hidrolítica sobre penicilinas e cefalosporinas clássicas, e inibidas pelo ácido clavulânico. Hidrolisam a ceftazidima, cefotaxima e aztreonamo a uma taxa superior a 10% que a benzilpenicilina.

O subgrupo 2br é constituído por  $\beta$ -lactamases derivadas estruturalmente do grupo 2b com reduzida afinidade para os inibidores das  $\beta$ -lactamases.

O subgrupo 2c inclui enzimas que hidrolisam a carbenicilina a uma taxa superior a 60% que a de benzilpenicilina e que hidrolisam a cloxacilina, ou a oxacilina, a uma taxa inferior a 50% que a de benzilpenicilina.

O subgrupo 2d inclui enzimas que hidrolisam a cloxacilina, ou a oxacilina, a uma taxa superior a 50% à que hidrolisam a benzilpenicilina. Também engloba enzimas que hidrolisam a carbenicilina. Estas enzimas não são tão facilmente inibidas pelo ácido clavulânico como a maioria das  $\beta$ -lactamases do grupo 2.

O subgrupo 2e é constituído por cefalosporinas que hidrolisam bem a cefotaxima mas às quais falta uma boa actividade na hidrólise da penicilina e que são inibidas pelo ácido clavulânico.

O subgrupo 2f engloba β-lactamases que hidrolisam carbapenemos e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico.

O grupo 3 é constituído por metalo-β-lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos e que são fracamente inibidas pelos inibidores clássicos das β-lactamases, tais como o ácido clavulânico, o tazobactam ou o sulbactam. São inibidas pelo EDTA e *p*-cloromercuribenzoato.

O grupo 4 é constituído por penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico (Bush *et al.*, 1995).

Quadro I. Classificação das β-lactamases de Bush-Jacoby-Medeiros (adaptado de Bush *et al.*, 1995).

Grupos	Classe molecular	Substratos preferidos	Inibição		Enzimas representativas	
			com AC <sup>a</sup>	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC das bactérias de Gram negativo; MIR-1	
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinases de bactérias de Gram positivo	
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1; TEM-2; SHV-1	
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26; SHV-2 a SHV-6; <i>Klebsiella oxytoca</i> K1	
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36; TRC-1	
2c	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1; PSE-3; PSE-4	
2	2d	D	Penicilinas, cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11; PSE-2 (OXA-10)
	2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinases indutíveis de <i>Proteus vulgaris</i>
	2f	A	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos	+	-	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Maioria dos β-lactâmicos, incluindo carbapenemos	-	+	L1 de <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>	
4	ND <sup>b</sup>	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	

<sup>a</sup>AC, Ácido Clavulânico; <sup>b</sup>ND, Não Determinado.

Globalmente, existe boa correspondência entre as classes definidas na classificação fenotípica de Bush-Jacoby-Medeiros e as reconhecidas no esquema molecular, excepto no facto de o grupo 2d incluir algumas  $\beta$ -lactamases de classe A de actinomicetes assim como todas as de classe D de bacilos de Gram negativo (Livermore, 1995).

Presentemente, classificam-se as  $\beta$ -lactamases de acordo com a sua sequência nucleotídica (Livermore, 1995; Bush *et al.*, 1995). Esta classificação molecular é mais estável, porque reflecte relações fundamentais e não pode ser distorcida por mutações. Além disso, actualmente, a classificação baseada na sequência nucleotídica reconhece apenas quatro classes moleculares (Livermore, 1995).

#### 6.4.2.1. $\beta$ -LACTAMASE AmpC

A  $\beta$ -lactamase AmpC inclui-se na classe C de Ambler (Ambler, 1980), grupo 1 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995).

Esta  $\beta$ -lactamase é codificada pelo gene *ampC* (Lodge *et al.*, 1990) cuja expressão ocorre de forma constitutiva ou indutível. A produção desta enzima em estirpes selvagens ocorre, normalmente, em níveis baixos.

Em algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, assim como em *P. aeruginosa*, estas enzimas são induzidas quando expostas a alguns agentes  $\beta$ -lactâmicos (Livermore & Williams, 1996; Jones *et al.*, 1997). Assim, a  $\beta$ -lactamase AmpC inactiva a maioria das penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (aztreonamo) que induzem a sua expressão (Livermore, 1995; Poole, 2004).

A ocorrência de mutações em genes de controlo da expressão do gene *ampC* podem determinar uma produção desreprimida da enzima (Lodge & Piddock, 1991; Bennet & Chopra, 1993). A desrepressão da AmpC de *P. aeruginosa* é normalmente parcial, ou seja, o nível basal da enzima é mais elevado do que na maioria das estirpes, mantendo ainda um potencial de indução (Livermore, 1982; Williams *et al.*, 1984; Sanders & Sanders, 1992).

Os carbapenemos são fortes indutores e estáveis à hidrólise pela AmpC (Livermore & Yang, 1987) e, por isso, permanecem activos independentemente do nível de expressão desta  $\beta$ -lactamase. O grau de indução de *ampC* é dependente do  $\beta$ -lactâmico indutor e da sua concentração (Minami *et al.*, 1980; Sanders & Sanders, 1985; Curtis *et al.*, 1986; Farmer & Reading, 1987).

#### 6.4.2.2. METALO- $\beta$ -LACTAMASES

As metalo- $\beta$ -lactamases são enzimas da classe B de Ambler (Ambler, 1980), grupo 3 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995).

São enzimas que possuem a mesma estrutura tridimensional, com resíduos conservados que coordenam iões metálicos, geralmente dois iões de zinco (Murphy *et al.*, 2003). Estes iões funcionam como cofactor para a actividade catalítica, pois coordenam moléculas de água que servem de nucleófilos hidrolisando a ligação amida cíclica do anel  $\beta$ -lactâmico, tornando desta forma o antibiótico inactivo biologicamente (Walsh *et al.*, 2003).

As metalo- $\beta$ -lactamases caracterizam-se pela eficiente capacidade de hidrolisar os carbapenemos, enquanto a ticarcilina e o aztreonamo são substratos fracamente hidrolisáveis. Algumas metalo- $\beta$ -lactamases conseguem também inactivar a maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, mesmo cefalosporinas de largo espectro (Bush *et al.*, 1995; Rasmussen & Bush, 1997; Bush, 1998; Livermore & Woodford, 2000). Não são inibidas pelos inibidores convencionais das  $\beta$ -lactamases serínicas, como o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam (Bush *et al.*, 1995). No entanto, são inibidas por quelantes de iões metálicos, como o EDTA (Bush *et al.*, 1995; Bush, 1998; Rasmussen & Bush, 1997). Neste sentido, as metalo- $\beta$ -lactamases representam um problema de resistência à terapêutica disponível actualmente. Por outro lado, tem-se verificado um aumento da resistência aos carbapenemos causada pela produção de metalo- $\beta$ -lactamases.

A primeira metalo- $\beta$ -lactamase foi identificada em meados dos anos 60 em *Bacillus cereus* (Sabath & Abraham, 1966). No entanto, em *P. aeruginosa* a primeira metalo- $\beta$ -lactamase foi descrita em 1991 (Watanabe *et al.*, 1991), e posteriormente novos genes que codificam estas enzimas têm sido detectados em isolados clínicos importantes, nomeadamente dos géneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, e espécies da família *Enterobacteriaceae* (Peleg *et al.*, 2005).

Actualmente, em *P. aeruginosa* são conhecidos quatro tipos de metalo- $\beta$ -lactamases: IMP, **imipenemase** (Watanabe *et al.*, 1991); VIM, **Verona imipenemase** (Lauretti *et al.*, 1999); SPM-1, **São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase** (Toleman *et al.*, 2002) e GIM-1, **German imipenemase** (Castanheira *et al.*, 2004).

Mais recentemente, na Coreia foi detectado um novo tipo de metalo- $\beta$ -lactamase, designado de SIM-1 em *Acinetobacter baumannii* (Lee *et al.*, 2005).

As metalo- $\beta$ -lactamases IMP e VIM apresentam grande distribuição geográfica, sendo mais frequentes, no Sudeste Asiático e Europa, respectivamente. Por outro lado, a metalo- $\beta$ -lactamases SPM-1 foi detectada no Brasil enquanto a GIM-1 foi descrita na Alemanha.

#### 6.4.2.2.1. METALO- $\beta$ -LACTAMASE IMP

No Japão, em 1991 Watanabe e colaboradores descreveram uma metalo- $\beta$ -lactamase, produzida por uma estirpe clínica de *P. aeruginosa* resistente ao imipenemo e cefalosporinas de espectro alargado. Esta enzima foi caracterizada bioquimicamente, mas não sequenciada e denominada, contudo os resultados experimentais indicam que seria IMP-1 (Livermore & Woodford, 2000). Em 1994, a enzima IMP-1 foi formalmente sequenciada e encontrada em isolados de *Serratia marcescens* colhidos em 1991 no Japão (Osano *et al.*, 1994).

Após a primeira publicação da metalo- $\beta$ -lactamase IMP-1, foram descritas novas variantes alélicas do gene *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> a *bla*<sub>IMP-23</sub> (Jacoby & Bush, 2006) identificadas sobretudo em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2005).

A metalo- $\beta$ -lactamase IMP-1 foi descrita principalmente no Japão, disseminada em vários hospitais (Watanabe *et al.*, 1991; Senda *et al.*, 1996a; Senda *et al.*, 1996b; Shibata *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2005) onde se estima que cerca de 1,3% das estirpes de *P. aeruginosa* produzam esta enzima (Kurokawa *et al.*, 1999). Adicionalmente, no Japão foram descritas em *P. aeruginosa*, as metalo- $\beta$ -lactamase IMP-2 (Shibata *et al.*, 2003), IMP-10 (Iyobe *et al.*, 2002; Shizuko *et al.*, 2002) e IMP-11 (Walsh *et al.*, 2005).

As metalo- $\beta$ -lactamases do tipo IMP foram também descritas noutros países Asiáticos, nomeadamente, na China [IMP-1 (Wang & Mi, 2004) e IMP-9 (Nordmann & Poirel, 2002)] e Singapura [IMP-1 (Koh *et al.*, 2004)]. Adicionalmente, a metalo- $\beta$ -lactamase IMP-7 foi detectada na Malásia (Ho *et al.*, 2002) e na Tailândia (Nordmann & Poirel, 2002).

Em Itália, foram observadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* as enzimas IMP-1 (Laraki *et al.*, 1999) e IMP-13 (Toleman *et al.*, 2003; Toleman *et al.*, 2005; Pagani *et al.*, 2005).

No continente Americano, designadamente no Brasil foram descritas as metalo- $\beta$ -lactamases IMP-1 (Castanheira *et al.*, 2003) e IMP-16 (Mendes *et al.*, 2004); no Canadá a IMP-7 (Gibb *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005) e no Novo México a IMP-18 (Hanson, 2004).

Peleg e colaboradores (2004) verificam também a disseminação da metalo- $\beta$ -lactamase IMP-4 na Austrália.

#### 6.4.2.2.2. METALO- $\beta$ -LACTAMASE VIM

Actualmente são conhecidas 13 variantes de metalo- $\beta$ -lactamases do tipo VIM, VIM-1 a VIM-13 (Jacoby & Bush, 2006) descritas em *P. aeruginosa* e noutras espécies isoladas sobretudo na Europa, mas também no continente Americano e Sudeste Asiático, revelando elevada distribuição geográfica.

A metalo- $\beta$ -lactamase VIM-1 foi descoberta num isolado clínico de *P. aeruginosa* colhido em Itália (Lauretti *et al.*, 1999). Posteriormente ocorreram surtos infecciosos provocados por *P. aeruginosa* produtora desta metalo- $\beta$ -lactamase em Itália (Cornaglia *et al.*, 2000) e na Grécia (Tsakris *et al.*, 2000).

A metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 foi inicialmente identificada num isolado de *P. aeruginosa* colhido em 1996 de uma doente neutropénica hospitalizada em Marseille, França (Poirel *et al.*, 2000). Este isolado apresentava resistência à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo ceftazidima, cefepima, meropenemo e imipenemo, excepto ao aztreonamo (Poirel *et al.*, 2000). Posteriormente, em França, o gene *bla*<sub>VIM-2</sub> foi detectado por outros investigadores (Poirel *et al.*, 2001; Nordmann & Poirel, 2002; Aubron *et al.*, 2005).

Cardoso e colaboradores (1999) descreveram três isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo responsáveis por infecções urinária e do tracto respiratório inferior em doentes internados no Hospital do Vale de Sousa, norte de Portugal. Nestes três isolados e noutro colhido de um doente de ambulatório foi detectada a metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 (Cardoso *et al.*, 2002).

Mais recentemente em Portugal, foram descritos isolados clínicos produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 colhidos no Centro Hospitalar de Coimbra (Pena *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2006), Hospitais da Universidade de Coimbra (Quinteira *et al.*, 2005) e no Hospital Infante D. Pedro em Aveiro (Carvalho *et al.*, 2005).

Outros estudos efectuados em isolados de *P. aeruginosa* demonstraram a emergência da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 na Europa, sobretudo em Itália (Rossolini *et al.*, 2000; Lagatolla *et al.*, 2004), mas também na Grécia (Mavroidi *et al.*, 2000; Pallecchi *et al.*, 2001; Giakkoupi *et al.*, 2003; Pournaras *et al.*, 2003), Espanha (Prats *et al.*, 2002), Croácia (Sardelic *et al.*, 2003) e Polónia (Walsh *et al.*, 2003).

Um outro foco da enzima VIM-2 encontra-se no Sudeste Asiático, nomeadamente no Japão (Nishio *et al.*, 2004, Kimura *et al.*, 2005), China (Wang *et al.*, 2006) e Coreia (Lee *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005).

De referir que a metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 foi também encontrada no continente Americano, designadamente no Brasil (Mendes *et al.*, 2004b; Sader *et al.*, 2005), Canadá (Laupland *et al.*, 2005), Chile (Mendes *et al.*, 2004b), Venezuela (Mendes *et al.*, 2004b) e Colômbia (Villegas *et al.*, 2006).

Em *P. aeruginosa* encontram-se descritas outras variantes de VIM, a saber, VIM-3 na Tailândia (Yan *et al.*, 2001); VIM-4 na Polónia (Patzner *et al.*, 2004) e Grécia (Pounaras *et al.*, 2002; Pournaras *et al.*, 2003); VIM-5 na Turquia (Bahar *et al.*, 2004); VIM-7 nos Estados Unidos da América (Toleman *et al.*, 2004); VIM-8 na Colômbia (Crespo *et al.*, 2004), VIM-9 e VIM-10 no Reino Unido (Walsh *et al.*, 2005) e VIM-11 na Argentina (Pasteran *et al.*, 2005).



#### 6.4.2.2.3. METALO- $\beta$ -LACTAMASE SPM

Toleman e colaboradores (2002) identificaram e caracterizaram a nível molecular uma nova metalo- $\beta$ -lactamase distinta dos tipos IMP e VIM, designada SPM-1. Esta metalo- $\beta$ -lactamase foi identificada numa estirpe clínica de *P. aeruginosa* (designada clone SP) causadora de infecção urinária numa doente em São Paulo, Brasil.

Estudos posteriores foram desenvolvidos em isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos colhidos em diversos hospitais brasileiros com o objectivo de avaliar a disseminação do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> (Gales *et al.*, 2003). A enzima SPM-1 foi detectada em 15 isolados que apresentaram um perfil genético idêntico ao clone SP, associado à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro, incluindo aos carbapenemos. O facto dos isolados produtores de SPM-1 serem colhidos em sete hospitais localizados em cinco Estados sugere disseminação do clone SP (Gales *et al.*, 2003).

Outros investigadores verificaram também a disseminação do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> em isolados de *P. aeruginosa* brasileiros resistentes aos carbapenemos, nomeadamente no Hospital de São Paulo (Sader *et al.*, 2004), em diferentes hospitais do Recife (Poirel *et al.*, 2004) e em São Luís do Maranhão (Vieira *et al.*, 2005).

#### 6.4.2.2.4. METALO- $\beta$ -LACTAMASE GIM

Estudos realizados em cinco isolados de *P. aeruginosa* colhidos num hospital em Dusseldorf na Alemanha demonstraram a existência de uma nova metalo- $\beta$ -lactamase designada de GIM-1 (Castanheira *et al.*, 2004). Estes isolados apresentavam resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas sendo apenas susceptíveis à polimixina B.

A tipagem genética dos cinco isolados de *P. aeruginosa* produtores de GIM-1, colhidos de diferentes doentes no mesmo hospital pertenciam a um único clone indicando um surto nosocomial (Castanheira *et al.*, 2004).

### 7. AMBIENTE GENÉTICO DAS METALO- $\beta$ -LACTAMASES

As metalo- $\beta$ -lactamases são codificadas por genes *bla* que se podem encontrar em cassetes genéticas localizadas no cromossoma ou em plasmídios (Senda, 1996b; Lauretti *et al.*, 1999). Adicionalmente, podem associar-se a integroões (Fluit & Schmitz, 1999; Recchia & Hall, 1995; Bennett, 1999) ou ainda a transposões (Yatsuyanagi *et al.*, 2004a; Walsh *et al.*, 2003), aumentando o potencial de disseminação das metalo- $\beta$ -lactamases (Arakawa *et al.*, 1995; Poirel *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2005).

## 7.1. INTEGRÕES

Integrões são elementos que contêm determinantes genéticos de componentes de um sistema específico de recombinação, capaz de capturar e mobilizar genes inseridos em elementos móveis designados cassetes genéticas (Hall & Collis, 1995). Os componentes essenciais de um integrão incluem o gene *int* que codifica uma integrase, o local adjacente de recombinação *attI* reconhecido pela integrase (Hall & Collis, 1995). A integrase *IntI* é uma recombinase sítio-específica responsável pela inserção das cassetes genéticas no local de recombinação *attI* (Collis *et al.*, 2002).

Os integrões não incluem necessariamente cassetes genéticas, mas quando estão integradas fazem parte do integrão (Fluit & Schmitz, 1999). A expressão das cassetes genéticas depende do promotor do integrão,  $P_{ANT}$  (Fluit & Schmitz, 1999). As cassetes genéticas são elementos móveis que incluem um gene, que pode codificar resistência aos agentes antimicrobianos, e um local de recombinação específico da integrase denominado “elemento de 59 pares de bases” (59-be) (Hall & Collis, 1995; Recchia & Hall, 1995). As cassetes genéticas podem existir na forma livre circular, mas normalmente são sequências lineares integradas no *attI* fazendo parte de um integrão (Hall & Collis, 1995; Recchia & Hall, 1995).

A ausência de promotores nas cassetes genéticas torna a expressão dos genes dependente do promotor  $P_{ANT}$  localizado no integrão, a montante do local de inserção das cassetes genéticas (Collis & Hall, 1995; Hall & Collis, 1995; Fluit & Schmitz, 1999; Collis *et al.*, 2002).

Os integrões de classe 1 contêm, a montante das cassetes genéticas inseridas, um segmento 5' conservado (5'-CS) idêntico que inclui o gene da integrase *intI1*, o local de recombinação da cassete *attI1* e o promotor  $P_{ANT}$  (Fluit & Schmitz, 1999). O segmento 3' conservado (3'-CS) é constituído pelo gene *sul1* que codifica resistência às sulfonamidas, o gene *qacEΔ1* que confere resistência a compostos de amônio quaternário e duas *open reading frames*, *orf5* e *orf6*, que codificam proteínas de função desconhecida (Bennett, 1999).

Nos integrões de classe 1, a região promotora  $P_{ANT}$  contém dois potenciais promotores, denominados P1 e P2, que se localizam na região 5'-CS. Foram descritos quatro tipos do promotor P1, que diferem na força de expressão e dois tipos de promotores P2 provavelmente inativos (Fluit & Schmitz, 1999).

A expressão dos genes de resistência aos antibióticos depende também da posição da cassete genética no integrão. Assim, o nível de resistência conferido é tanto maior quanto mais próximo a cassete genética se encontrar do  $P_{ANT}$  e mais reduzido quando a cassete genética se encontrar a jusante de uma ou mais cassetes genéticas (Collis & Hall, 1995).

Os integrões de classe 1 foram detectados sobretudo em isolados clínicos de Gram negativo, incluindo *P. aeruginosa*, associados a cassetes genéticas que expressam

resistência a diversos grupos de antibióticos (Martinez-Freijo *et al.*, 1998; Fluit & Schmitz, 2004), nomeadamente aos  $\beta$ -lactâmicos e aos aminoglicosídeos, restringindo as opções terapêuticas (Poirel & Nordmann, 2002; Walsh, 2005).

Em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, diversos autores descreveram os genes *bla* em cassetes genéticas localizadas em integrões de classe 1 (Castanheira *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2005; Walsh, 2005; Quinteira *et al.*, 2005; Quinteira & Peixe, 2006; Villegas *et al.*, 2006).

## 8. EPIDEMIOLOGIA DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES

O aumento da resistência aos antibióticos de largo espectro em isolados clínicos importantes, particularmente em *P. aeruginosa*, e a ausência de novos agentes antimicrobianos activos, é preocupante tendo em vista o futuro da terapêutica antimicrobiana (Rossolini & Mantengoli, 2005).

Diversos estudos descrevem a emergência de metalo- $\beta$ -lactamases como sendo um factor determinante no aumento da resistência aos agentes antimicrobianos em diversas Unidades Hospitalares (Pournaras *et al.*, 2003; Lagatolla *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2005). As bactérias de Gram negativo produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases estão entre os microrganismos nosocomiais patogénicos mais importantes (Bush, 1998).

As metalo- $\beta$ -lactamases representam um risco epidemiológico sobretudo porque conferem resistência não apenas aos carbapenemos, mas também aos outros  $\beta$ -lactâmicos com excepção do aztreonamo (Bush *et al.*, 1995; Rasmussen & Bush, 1997; Bush, 1998; Livermore & Woodford, 2000). Adicionalmente, os genes *bla* são com frequência associados a genes que codificam para a resistência a outros grupos de antibióticos, geralmente aos aminoglicosídeos (Poirel & Nordmann, 2002; Quinteira *et al.*, 2005; Walsh, 2005). De referir que a grande maioria dos genes que codificam as metalo- $\beta$ -lactamases encontram-se em cassetes genéticas inseridas em integrões de classe 1 que podem disseminar-se horizontalmente entre estirpes diferentes causando surtos nosocomiais (Giakkoupi *et al.*, 2003; Pournaras *et al.*, 2003; Luzzaro *et al.*, 2004).

Considerando o perfil de substratos das metalo- $\beta$ -lactamases, é compreensível que a sua disseminação em microrganismos patogénicos seja extremamente preocupante. A contaminação cruzada é a forma mais frequente de transmissão de todas as infecções nosocomiais (Edmond *et al.*, 2000). As mãos e luvas contaminadas do pessoal clínico constituem formas de transmissão de *P. aeruginosa* de doente para doente (Ozkurt *et al.*, 2005). Neste sentido, medidas de prevenção de contaminação cruzada devem ser cumpridas, como a lavagem e desinfeção das mãos, luvas e equipamento médico, isolamento de doentes, e se possível, redução do tempo de internamento hospitalar (Ozkurt *et al.*, 2005; Villegas *et al.*, 2006).

No meio hospitalar a detecção e tipagem molecular de isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases permite estabelecer a origem destes isolados no ambiente hospitalar e a forma de disseminação conduzindo à implementação de medidas adequadas para prevenir a disseminação destes microrganismos patogénicos (Lagatolla *et al.*, 2004).

Existem várias técnicas de tipagem molecular disponíveis para analisar a relação clonal entre isolados. O método RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido utilizado com frequência na tipagem de isolados de *P. aeruginosa* (Renders *et al.*, 1996; Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000; Giakkoupi *et al.*, 2003; Lagatolla *et al.*, 2004; Ortiz-Herrera *et al.*, 2004). Este método apresenta elevada especificidade, reprodutividade, rapidez e simplicidade (Renders *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000; Menon *et al.*, 2003) pelo que é extremamente útil em estudos epidemiológicos de isolados de *P. aeruginosa*.

A escolha da terapêutica antimicrobiana empírica deve basear-se na avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos resultante de estudos de vigilância locais actualizados (Rossolini & Mantengoli, 2005). Por outro lado, para que os antibióticos sejam utilizados adequadamente é necessário o conhecimento dos mecanismos de resistência envolvidos e como estes responderão à pressão selectiva exercida por diferentes grupos de antibióticos (Hancock *et al.*, 1998).

## **OBJECTIVOS**

---



1. Determinar a susceptibilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n=136) resistentes ao imipenemo a diversos grupos de antibióticos, nomeadamente, outros  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.
2. Pesquisar os genes que codificam as metalo- $\beta$ -lactamases IMP, VIM, SPM e GIM, nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo.
3. Verificar a localização genética dos genes que codificam as metalo- $\beta$ -lactamases, designadamente em integrações de classe 1.
4. Estudar a relação clonal entre os isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases.





## **MATERIAL E MÉTODOS**

---



## 1. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Neste trabalho foram estudados 136 isolados clínicos resistentes ao imipenemo seleccionados a partir de 773 isolados de *P. aeruginosa*, colhidos entre Abril de 2003 e Abril de 2005 de doentes hospitalizados e de ambulatório em diversas Unidades do Centro Hospitalar de Coimbra.

No Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra efectuou-se o isolamento, identificação e determinação da susceptibilidade a diversos agentes antimicrobianos dos referidos isolados de *P. aeruginosa* através do sistema automatizado MicroScan WalkAway (DadeBehring) permitindo a selecção dos 136 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo.

As estirpes foram isoladas de vários produtos biológicos, nomeadamente, expectoração; exsudatos de ferida, escara e meato; urina; secreções; aspirados traqueal e brônquico; sangue; ponta de dreno; cateter; líquidos abdominal e peritonal e lavado brônquico. Adicionalmente, para cada isolado procedeu-se ao registo da data de colheita, Unidade Hospitalar, idade e sexo do doente.

De referir que neste estudo apenas se incluiu uma amostra de cada indivíduo e foram excluídas as amostras provenientes de doentes com diagnóstico de fibrose quística.

## 2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

No Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra as 136 amostras de *P. aeruginosa* seleccionadas foram novamente isoladas em caixa de gelose MacConkey e incubados a 37°C durante 18 horas.

A partir de colónias puras procedeu-se à confirmação da identificação através de provas clássicas características desta espécie: aeróbios não fermentadores da glicose, crescimento a 42°C e testes positivos da oxidase e da nitratase.

Quando o teste da oxidase (Oxoid, Inglaterra) era positivo, procedeu-se à inoculação da seguinte bateria de meios: um tubo de gelose tripticase de soja (Oxoid, Inglaterra) inclinado; uma caixa de gelose tripticase de soja (Oxoid, Inglaterra); um tubo de Kligler (bioMérieux, France); um tubo de caldo nitratado (Merck, Alemanha) com tubo de Durham; dois tubos de Hugh e Leifson (bioMérieux, França), um dos quais coberto com parafina estéril (bioMérieux, França). Os tubos e as caixas de gelose tripticase de soja foram incubados durante 18-24 horas a 37°C e a 42°C, respectivamente.

Quando estes testes confirmavam a presença de *P. aeruginosa* procedeu-se ao congelamento inoculando um criotubo que continha 0,6 ml de caldo tripticase de soja (Oxoid, Inglaterra) de dupla força e 0,6 ml de glicerol (Merck, Alemanha) 30%.

Nos casos em que surgiram dúvidas na identificação através das provas clássicas procedeu-se à identificação através de API 20 E e API 20 NE (bioMérieux, França).

### 3. DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

#### 3.1. MÉTODO DE DIFUSÃO: TÉCNICA DE KIRBY-BAUER

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo foi determinada pela técnica de Kirby-Bauer.

A partir de uma cultura bacteriana pura com 18-24 horas de incubação a 37°C, preparou-se uma suspensão em água destilada estéril com uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Embebeu-se nesta suspensão uma zaragatoa, e procedeu-se à inoculação de placas de Petri, por espalhamento (sementeira em toalha) à superfície do meio de cultura, gelose Mueller Hinton (bioMérieux, França). Deixou-se secar o inóculo (nunca ultrapassando os 15 minutos) e aplicaram-se os discos impregnados com antibióticos na superfície do meio de cultura inoculado com o auxílio de uma pinça estéril.

Os discos dos agentes antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) utilizados foram: imipenemo (10  $\mu$ g), meropenemo (10  $\mu$ g), aztreonamo (30  $\mu$ g), cefepima (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), piperacilina/tazobactam (100  $\mu$ g/10  $\mu$ g), amicacina (30  $\mu$ g) e ciprofloxacina (5  $\mu$ g).

A concentração de cada antibiótico nos discos é estabelecida segundo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

A escolha dos antibióticos testados teve por base a utilização clínica e a importância como marcadores de resistência.

As placas de Petri foram incubadas a 37°C durante 18 horas. Após incubação, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram medidos com uma craveira.

O tamanho dos halos, expresso em mm, foi traduzido em susceptível, intermédio e resistente, de acordo com normas padronizadas (CLSI, 2005).

De referir que na avaliação da actividade dos diferentes antibióticos consideraram-se os isolados intermédios como resistentes.

#### 3.2. MÉTODO DO E-TEST

A metodologia do E-Test (*Epsilon Test*) é semelhante à descrita anteriormente, pois baseia-se também na difusão dos antibióticos, mas os discos são substituídos por tiras de plástico (tiras de E-Test: AB Biodisk, Solna, Suécia) impregnadas com um gradiente de concentração do antibiótico.

Um dos lados da tira está calibrado com uma escala de concentração mínima inibitória [CMI ( $\mu$ g/ml)] e o outro lado da tira contém um gradiente contínuo de concentração de antibiótico que varia entre 0,002 a 32  $\mu$ g/ml ou 0,016 a 256  $\mu$ g/ml, dependendo do antibiótico testado.

A preparação do inóculo e inoculação das placas foram efectuadas segundo a técnica de Kirby-Bauer. As tiras foram aplicadas sobre gelose de Mueller-Hinton (bioMérieux, França) inoculada com a bactéria em estudo evitando a formação de bolhas.

Após incubação a 37°C durante 18-24 horas observou-se uma elipse de inibição do crescimento microbiano. A CMI foi lida onde o vértice da elipse interceptava a tira de E-Test.

As CMIs foram determinadas para os seguintes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: imipenemo, meropenemo, aztreonamo, ceftazidima e piperacilina.

Salienta-se que na avaliação da actividade dos antibióticos referidos consideraram-se os isolados intermédios como resistentes.

#### **4. DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES**

##### **4.1. PESQUISA FENOTÍPICA: TESTE DE SINERGISMO DO DUPLO DISCO IMPENEMO-EDTA**

Atendendo ao facto da actividade enzimática das metalo- $\beta$ -lactamases ser inibida por agentes quelantes como o EDTA, procedeu-se à triagem dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo utilizando o teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA.

Este teste foi efectuado pela técnica de Kirby-Bauer, em que sobre a gelose de Mueller-Hinton (bioMérieux, France) inoculada com a bactéria em estudo se aplicaram dois discos de imipenemo, um dos quais impregnado com 10  $\mu$ l de EDTA 750  $\mu$ g/ml (Yong *et al.*, 2002).

Após incubação a 37°C durante 18-24 horas o diâmetro dos halos de inibição dos discos de imipenemo com e sem EDTA foram medidos e comparados.

Considerou-se como critério de positividade o aumento igual ou superior a 7 mm do diâmetro do halo de inibição do disco de imipenemo em que se aplicou 10  $\mu$ l de EDTA 750  $\mu$ g/ml (Yong *et al.*, 2002).

##### **4.2. PESQUISA GENOTÍPICA**

Os isolados de *P. aeruginosa* cujo teste de detecção fenotípica de metalo- $\beta$ -lactamases se revelou positivo, constituem potenciais produtores destas enzimas, pelo que foram seleccionados para se proceder à pesquisa dos genes *bla*. Adicionalmente, estes genes também foram pesquisados em isolados cuja diferença entre os diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA se situava entre 5 e 6 mm.

#### 4.2.1. EXTRACÇÃO DE DNA TOTAL POR FERVURA

##### “BOILING METHOD” - ADAPTADO DO MÉTODO DE SAMBROOK E COLABORADORES (1989)

Para a execução deste método semearam-se os isolados em gelose tripticase de soja (Oxoid, Inglaterra) e incubaram-se a 37°C durante 18-24 horas. Com uma ansa de 1 µl estéril de plástico raspou-se um pouco da massa bacteriana superficial para um tubo *ependorf* que continha 20 µl de uma solução de SDS (0,25%) e NaOH 0,05 M em partes iguais. Incubou-se o tubo no banho de água a 95°C durante 15 minutos, ocorrendo lise celular. Adicionaram-se 180 µl de TE (Tris, 10 mM; EDTA, 1 mM; pH 8) estéril e misturou-se. Posteriormente centrifugou-se durante 3 minutos a 12000 *g* e recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo *ependorf* estéril. Conservou-se no congelador para posterior utilização nas reacções de amplificação em cadeia (PCR).

#### 4.2.2. AMPLIFICAÇÃO DE GENES POR PCR

##### 4.2.2.1. DETECÇÃO DE GENES *bla*

Nas reacções de PCR utilizou-se o DNA total extraído dos isolados de *P. aeruginosa* cujo teste de detecção fenotípica de metalo-β-lactamases se revelou positivo e de isolados cuja diferença entre os diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA se situava entre 5 e 6 mm.

No quadro II encontram-se descritos os *primers* específicos utilizados na detecção dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub>, que codificam as metalo-β-lactamases VIM, IMP, SPM e GIM, respectivamente.

As reacções de amplificação para pesquisa dos genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> foram efectuadas num volume final de 25 µl constituído por 22,0 µl de *Mix* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA), 0,5 µl de amostra de DNA e 1,25 µl de cada *primer* (0,5 µM de concentração no volume final). Adicionalmente, foram efectuados dois controlos em que na mistura reaccional o DNA das amostras foi substituído por DNA que amplificava com os *primers* *bla*<sub>VIM</sub> (controlo positivo) e água estéril (controlo negativo). Os tubos com as misturas reaccionais foram colocados no termociclador MasterCycler (Eppendorf) programado com as condições de amplificação das metalo-β-lactamases IMP/VIM descritas no quadro III. No final os tubos foram arrefecidos para a temperatura de 4°C.

As reacções de amplificação para pesquisa do gene *bla*<sub>SPM</sub> foram efectuadas num volume final de 25 µl em que se adicionaram 22,0 µl de *Mix* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA), 0,5 µl de amostra de DNA e 1,25 µl de cada *primer* (0,5 µM de concentração no volume final). Realizou-se também um controlo negativo em que na mistura reaccional o DNA das amostras foi substituído água estéril. Os tubos com as misturas reaccionais foram colocados no termociclador MasterCycler (Eppendorf)

programado com as condições de amplificação da metalo- $\beta$ -lactamases SPM descritas no quadro III. No final os tubos foram arrefecidos para a temperatura de 4°C.

As reacções de amplificação para pesquisa do gene *bla*<sub>GIM</sub> foram efectuadas num volume final de 25  $\mu$ l constituído por 22,0  $\mu$ l de *Mix* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA), 0,5  $\mu$ l de amostra de DNA e 0,75  $\mu$ l de cada *primer* (0,5  $\mu$ M de concentração no volume final). Realizou-se também um controlo negativo em que na mistura reaccional o DNA das amostras foi substituído por água estéril. Os tubos com as misturas reaccionais foram colocados no termociclador MasterCycler (Eppendorf) programado com as condições de amplificação da metalo- $\beta$ -lactamases GIM descritas no quadro III. No final os tubos foram arrefecidos para a temperatura de 4°C.

Os produtos das reacções de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Agarose NA, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia). Dependendo do tamanho dos fragmentos a separar, os géis de agarose foram preparados com concentrações de 0,7% (*bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub>) ou 0,8% (*bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>SPM</sub>), em tampão TBE 1X (89 mM Tris base (Merck, Alemanha), 89 mM ácido bórico (Sigma, EUA) e 2 mM EDTA (Biochrom KG Berlin, Alemanha) e com brometo de etídio (Amersham Pharmacia Biothech, Suécia) (0,5  $\mu$ g/ml).

Aplicaram-se 10  $\mu$ l de DNA de cada produto resultante da reacção de PCR misturado com 2  $\mu$ l de uma solução de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 25% e água q.b.p. 10 ml).

A electroforese dos géis decorreu a 80 V durante 1 hora e 30 minutos a 2 horas, em tampão de corrida TBE 0,5X.

O DNA amplificado foi visualizado num transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat) de 260 nm de comprimento de onda e fotografado com máquina fotográfica polaróide (Polaroid Gel Cam).

O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pela reacção de PCR foram estimado por comparação com a migração do marcador de DNA de peso molecular conhecido, 1 Kb DNA Ladder (Bioron).

Quadro II. Primers utilizados na detecção de genes de metalo- $\beta$ -lactamases.

GENE	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO PRIMER	TAMANHO DO AMPLIÇÃO (pb)	REFERÊNCIA
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	F1 (5'-CTACCGCAGAGTCTTTG-3') R1 (5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3')	587	Senda <i>et al.</i> , 1996b
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	F2 (5'-ACTCACCCCATGGAGTTTT-3') R2 (5'-ACGACTGAGCGATTTGTGTG-3')	815	Cardoso <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	F3 (5'-CCTACAATCTAACGGCGACC -3') R3 (5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3')	650	Gales <i>et al.</i> , 2003
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	F4 (5'-AGAACCTTGACCGAACGCAG-3') R4 (5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3')	753	Castanheira <i>et al.</i> , 2004

Quadro III. Condições de amplificação utilizadas na pesquisa de genes de metalo- $\beta$ -lactamases.

GENE (REFERÊNCIA)	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO				
	DESNATURAÇÃO INICIAL	DESNATURAÇÃO	HIBRIDAÇÃO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL
<i>bla</i> <sub>IMP</sub> e <i>bla</i> <sub>VIM</sub> (Cardoso <i>et al.</i> , 2002)	94°C 2 minutos	94°C 1 minuto	55°C 1 minuto	72°C 3 minutos	72°C 7 minutos
			35 CICLOS		
<i>bla</i> <sub>SPM</sub> (Gales <i>et al.</i> , 2003)	95°C 5 minutos	95°C 1 minuto	40°C 1 minuto	68°C 1 minutos	68°C 7 minutos
			30 CICLOS		
<i>bla</i> <sub>GIM</sub> (Toleman <i>et al.</i> , 2002; Gales <i>et al.</i> , 2003)	95°C 5 minutos	95°C 1 minuto	40°C 1 minuto	68°C 1 minuto	68°C 5 minutos
			30 CICLOS		



#### 4.2.2.2. DETECÇÃO DE INTEGRÕES DE CLASSE 1

Os genes *bla* têm sido detectados em cassetes genéticas inseridas em integrões de classe 1 (Lauretti *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 2000).

Por este motivo, testaram-se *primers* específicos para a pesquisa de integrões de classe 1 em DNA extraído dos isolados nos quais se detectou o gene *bla*<sub>VIM-2</sub> (quadro III).

As reacções de amplificação por PCR para pesquisa integrões de classe 1 foram efectuadas num volume final de 25 µl em que se adicionaram 21,5 µl de *Mix* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µl de amostra de DNA e 1,25 µl de cada um dos *primers* (0,5 µM de concentração no volume final) 5'-CS (5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3') e 3'-CS (5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3') (Lévesque *et al.*, 1995).

De referir que foram efectuados dois controlos em que na mistura reaccional o DNA das amostras foi substituído por: DNA extraído do isolado nº 9287 não produtor de VIM-2 que amplificava com os *primers* testados (controlo positivo) e água estéril (controlo negativo).

Os tubos com as misturas reaccionais foram colocados no termociclador MasterCycler (Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 53°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 8 minutos; e uma extensão final de 16 minutos a 72°C (Lévesque *et al.*, 1995). No final os tubos foram arrefecidos para a temperatura de 4°C.

#### 4.2.2.3. PESQUISA DE GENES *bla*<sub>VIM-2</sub> EM INTEGRÕES DE CLASSE 1

Com o objectivo de verificar a inserção de genes *bla*<sub>VIM-2</sub> em integrões de classe 1, após purificação com o kit MiniElute PCR Purification (Quiagen, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante, dos produtos amplificados com *primers* específicos para a pesquisa destes integrões efectuou-se uma nova reacção de amplificação por PCR com *primers* específicos para a detecção de gene *bla*<sub>VIM</sub> (quadro II).

Neste sentido, as reacções de amplificação por PCR para pesquisa do gene *bla*<sub>VIM-2</sub> foram efectuadas num volume final de 25 µl em que se adicionaram 21,5 µl de *Mix* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µl da amostra de DNA (produto amplificado por com *primers* 5'-CS e 3'-CS) e 1,25 µl de cada *primer* (0,5 µM de concentração no volume final).

Adicionalmente foram efectuados dois controlos em que na mistura reaccional o DNA das amostras foi substituído por: DNA que amplificava os *primers* (controlo positivo) e água estéril (controlo negativo). Procedeu-se à amplificação no termociclador MasterCycler (Eppendorf) com as seguintes condições: desnaturação inicial de 3 minutos

a 94°C; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 58°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 2 minutos; e uma extensão final de 7 minutos a 72°C (Cardoso *et al.*, 2002). No final os tubos foram arrefecidos para a temperatura de 4°C.

A análise dos produtos amplificados foi efectuada de igual forma à descrita anteriormente para a pesquisa de genes *bla* (sub-capítulo 4.2.2.1. Detecção de genes *bla*).

#### **4.2.2.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR**

Os produtos amplificados por PCR destinados a sequenciação foram purificados com o kit MiniElute PCR Purification (Quiagen, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante, obtendo-se no final o amplicão purificado em 10  $\mu$ l de água destilada estéril.

#### **4.2.2.5. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DE DNA**

As seqüências nucleotídicas constituintes das duas cadeias de DNA resultantes dos produtos de PCR purificados, foram determinados através do Sequenciador automático de DNA ALF Express (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), no Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos da Faculdade de Ciências de Lisboa.

As seqüências de nucleótidos foram analisadas com os programas BLAST acessível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

### **5. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)**

#### **5.1. EXTRACÇÃO DE DNA TOTAL PELO KIT AQUAPURE GENOMIC DNA ISOLATION**

Utilizou-se o Kit AquaPure Genomic DNA Isolation (BioRad, EUA) com o intuito de obter DNA total com pureza elevada necessária à tipagem genética dos isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2.

Semearam-se os isolados em gelose tripticase de soja (Oxoid, Inglaterra) e incubaram-se a 37°C durante 18-24 horas.

A partir destas culturas procedeu-se à extracção do DNA seguindo o protocolo do fabricante, cuja metodologia teve início com a lise das células seguida do tratamento com RNase, precipitação das proteínas, precipitação e hidratação do DNA.

Para cada uma das culturas preparou-se uma suspensão bacteriana com 500  $\mu$ l de soro fisiológico estéril num tubo estéril de 1,5 ml e colocou-se em gelo. Centrifugou-se durante 15 segundos a 13000 g para sedimentar as células. Removeu-se o sobrenadante

e adicionaram-se 300 µl de solução de lise (Genomic DNA lysis). Resuspenderam-se as células e incubou-se o tubo no banho de água a 80°C para lisar as células.

Adicionou-se 1,5 µl da solução RNase A 4 (mg/ml) às células lisadas. Misturou-se invertendo o tubo 25 vezes e incubou-se a 37°C durante 45 minutos.

Colocou-se o tubo à temperatura ambiente e adicionaram-se 100 µl da solução de precipitação de proteínas. Misturou-se por vortex durante 20 segundos. Centrifugou-se a 13000 g durante 3 minutos. Quando as proteínas não formavam um sedimento compacto, misturava-se novamente no vortex durante 20 segundos, incubava-se em gelo durante 5 minutos e centrifugava-se novamente a 13000 g durante 3 minutos.

O protocolo continuou a ser seguido colocando o sobrenadante que incluía o DNA num tubo estéril de 1,5 ml que continha 300 µl de isopropanol (100%). Misturou-se invertendo o tubo suavemente 50 vezes. Centrifugou-se a 13000 g durante 1 minuto. O DNA formava um pequeno sedimento visível. Removeu-se o sobrenadante e secou-se o tubo em papel absorvente. Adicionaram-se 300 µl de etanol (70%) e inverteu-se o tubo diversas vezes para lavar o sedimento de DNA. Centrifugou-se a 13000 g durante 1 minuto. Removeu-se cuidadosamente o etanol. Inverteu-se o tubo em papel absorvente e deixou-se evaporar o etanol à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Adicionaram-se 50 µl de solução de hidratação de DNA. Incubou-se a amostra em banho de água a 65°C durante 5 minutos para acelerar a hidratação. Misturou-se por vortex durante 5 segundos. Centrifugou-se de forma a depositar a amostra no fundo do tubo.

Conservaram-se as amostras de DNA à temperatura de -20°C.

## 5.2. RAPD

O DNA total dos isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo-β-lactamase VIM-2 extraído pelo kit AquaPure Genomic DNA Isolation foi utilizado nas reacções de amplificação por PCR.

Na metodologia RAPD utilizou-se o *primer* 272 (5'-AGCGGGCCAA-3') específico para discriminar isolados de *P. aeruginosa* (Mahenthiralingam *et al.*, 2000).

Para a realização desta técnica utilizou-se o Kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), em que os tubos que continham a mistura reaccional liofilizada foram hidratados com água, *primer* e o respectivo DNA.

O volume final de cada reacção foi de 25 µl, constituído por 22,75 µl de água, 1,25 µl do *primer* 272 (0,5 µM de concentração no volume final) e 1 µl de amostra de DNA.

Os tubos com as misturas reaccionais foram colocados no termociclador MasterCycler (Eppendorf) programado com as condições de amplificação descritas pelo fabricante do kit Amersham: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos seguida de 45 ciclos de

amplificação (desnaturação a 95°C durante 1 minuto, hibridação a 36°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 2 minutos) e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. No final os tubos foram arrefecidos para a temperatura de 4°C.

### 5.3. ELECTROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR RAPD

Os produtos das reacções de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Agarose NA, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia). Este gel foi preparado com concentração de 1,5%, em tampão TBE 1X e brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/ml).

Aplicaram-se 10  $\mu$ l de DNA de cada produto resultante da reacção de PCR misturado com 2  $\mu$ l de uma solução de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 25%, água q.b.p. 10 ml).

A electroforese do gel decorreu a 80 V durante 2 horas, em tampão de corrida TBE 0,5X.

Os perfis de DNA obtidos foram visualizados num transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat) de 260 nm de comprimento de onda e fotografados com máquina fotográfica polaróide (Polaroid Gel Cam).

O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pelas reacções de PCR foram estimados por comparação com a migração do marcador de DNA de peso molecular conhecido, 1 Kb DNA Ladder (Bioron).

Os perfis RAPD obtidos foram analisados visualmente, sendo atribuída uma letra maiúscula indicativa do tipo de perfil RAPD (Campbell *et al.*, 2000). Neste sentido, dois ou mais isolados foram considerados idênticos quando mostravam perfis de bandas iguais. Por outro lado, os isolados que apresentaram apenas uma banda mais intensa ou três bandas menos intensas de diferença foram considerados semelhantes e possivelmente muito relacionados (Campbell *et al.*, 2000).

## **RESULTADOS**

---



### 1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Durante um período de dois anos (Abril de 2003 a Abril de 2005) do total de 773 isolados de *P. aeruginosa* colhidos no Centro Hospitalar de Coimbra, foram seleccionados 136 (17,6%) isolados resistentes ao imipenemo.

Dos 136 isolados clínicos estudados, 125 (91,9%) eram provenientes de doentes hospitalizados e 11 (8,1%) de doentes de ambulatório. A maior parte das amostras foram isoladas a partir da expectoração (49,3%), exsudatos (15,4%), aspirados (11,8%), urina (11,0%), sangue (2,9%) e de outros produtos biológicos (9,6%), designadamente secreções, líquido abdominal e fezes.

As amostras com origem hospitalar foram isoladas a partir da expectoração (50,4%), exsudatos (15,2%), aspirados (12,8%), urina (8,8%), sangue (3,2%) e de outros produtos biológicos (9,6%), nomeadamente secreções, líquido abdominal e fezes.

As amostras com origem em ambulatório foram isoladas a partir da expectoração (36,4%), urina (36,4%), exsudatos (18,1%) e um de lavado brônquico (9,1%).

A distribuição dos isolados pelos diversos produtos biológicos encontra-se no Quadro IV.

Quadro IV. Distribuição (%) dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo com origem hospitalar e de ambulatório pelos diferentes produtos biológicos.

Origem	Distribuição (%) dos isolados por produtos biológicos (nº isolados)					
	Expectoração	Exsudatos	Aspirados	Urina	Sangue	Outros
<b>Hospitalar</b> (n=125)	50,4 (n=63)	15,2 (n=19)	12,8 (n=16)	8,8 (n=11)	3,2 (n=4)	9,6 (n=12)
<b>Ambulatório</b> (n=11)	36,4 (n=4)	18,1 (n=2)	0 (n=0)	36,4 (n=4)	0 (n=0)	9,1 (n=1)

Os isolados pertenciam maioritariamente a indivíduos do sexo masculino (72,2%), existindo predominância em idades superiores a 40 anos (68,2%). Em relação aos isolados colhidos de indivíduos do sexo feminino (27,8%), verificou-se maior incidência em idades superiores a 60 anos (17,8%), enquanto dos 21 aos 40 anos não se obtiveram isolados. De referir que em doentes de ambos os sexos, a grande parte (51,9%) dos isolados foram colhidos do grupo etário dos 61 aos 80 anos.

A figura 3 representa a distribuição (%) dos 136 isolados de *P. aeruginosa* colhidos de indivíduos dos sexos masculino e feminino pelos diversos grupos etários.

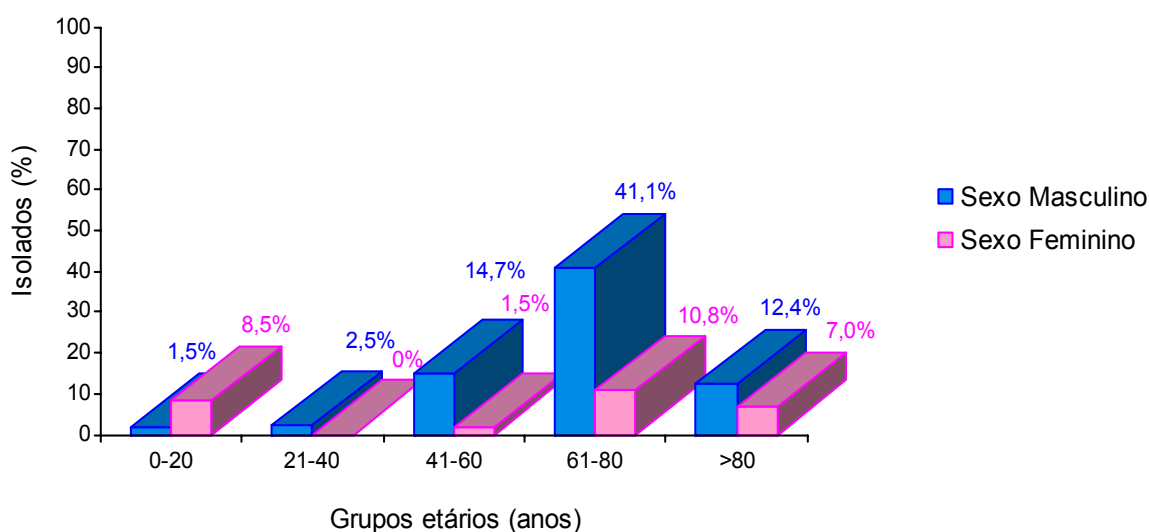


Figura 3. Distribuição (%) dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo em indivíduos dos sexos masculino e feminino pelos diversos grupos etários.

## 2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Em todos os isolados de *P. aeruginosa* seleccionados foi confirmada a identificação através de provas clássicas, observando-se as características desta espécie: teste positivo da oxidase e da nitratase, aeróbios, não fermentadores da glicose e crescimento a 42°C.

## 3. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES AO IMIPENEMO

A susceptibilidade dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos,  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos foi determinada através do método de difusão pela técnica de Kirby-Bauer.

Relativamente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a cefalosporina de 3ª geração, ceftazidima, apresentou a melhor actividade (56,7%), seguida da cefepima (49,6%) (figura 4). A associação de piperacilina com tazobactam inibiu 47,4% dos isolados e o aztreonamo inibiu 37,3%. O meropenemo apesar de pertencer ao mesmo grupo que o imipenemo, ainda demonstrou alguma actividade (20,3%).

A fluoroquinolona ciprofloxacina apresentou actividade em 53,0% dos isolados.

Considerando a totalidade de agentes antimicrobianos avaliados, salienta-se o aminoglicosídeo, amicacina que apresentou a melhor actividade (73,1%).

De referir que 3,7% dos isolados apresentaram resistência a todos os antibióticos testados, nomeadamente ao imipenemo, meropenemo, aztreonamo, cefepima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, amicacina e ciprofloxacina.



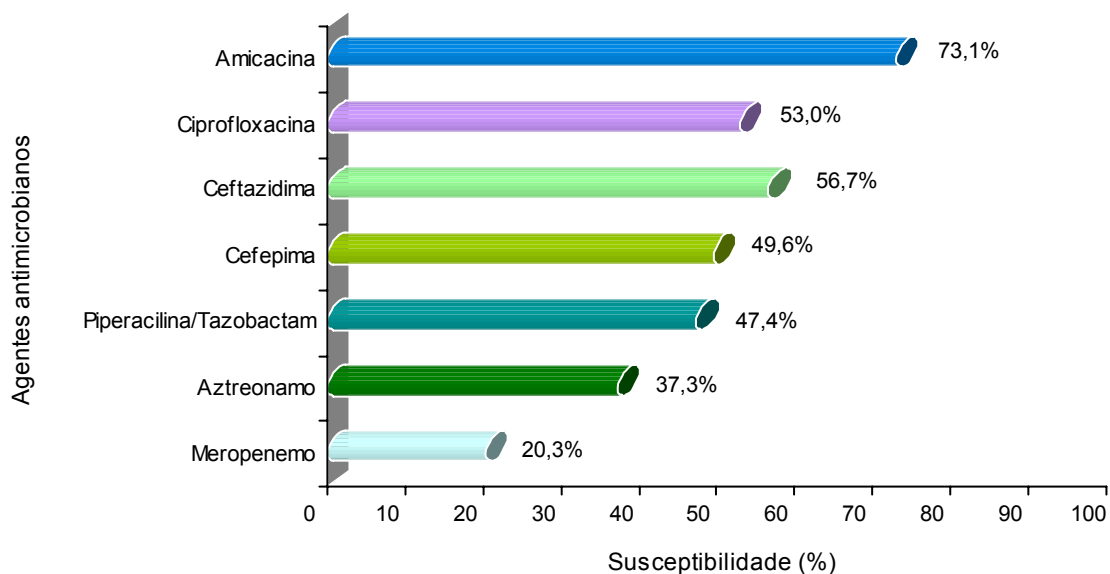


Figura 4. Frequência de susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos em isolados clínicos (n=136) de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo.

#### 4. DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES

##### 4.1. PESQUISA FENOTÍPICA: TESTE DE SINERGISMO DO DUPLO DISCO IMPENEMO-EDTA

Verificou-se que 29,4% (n=40) dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo apresentaram uma diferença de diâmetro dos halos de inibição dos discos de imipenemo com e sem EDTA maior ou igual a 7 mm, sendo considerados potenciais produtores de metalo- $\beta$ -lactamases.

Os restantes 70,6% (n=96) isolados testados apresentaram uma diferença inferior a 7 mm, ou seja, apresentaram teste fenotípico negativo.

A figura 5 mostra o resultado positivo do teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA em um isolado de *P. aeruginosa*.

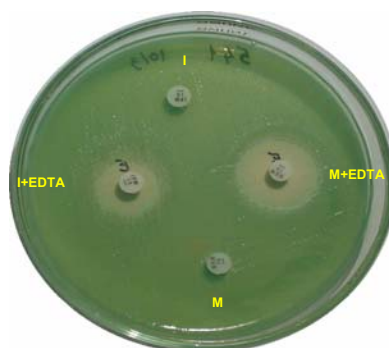


Figura 5. Teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA mostrando o efeito inibitório do crescimento do isolado de *P. aeruginosa* (nº 541) causado pela adição de 10  $\mu$ l EDTA (750  $\mu$ g/ml) ao disco de imipenemo (I) (10  $\mu$ g).

#### 4.2. PESQUISA GENOTÍPICA: DETECÇÃO DE GENES *bla* POR PCR

Em 40 isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA positivo foram pesquisados os genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub> que codificam as metalo-β-lactamases IMP, VIM, SPM e GIM, respectivamente. Estes genes também foram investigados em 11 isolados cuja diferença entre os diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA se situava entre 5 e 6 mm, ou seja, considerados negativos pelo teste de sinergismo.

Recorrendo à técnica PCR com *primers* específicos para detecção dos genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> foi amplificado um fragmento com o tamanho aproximado de 815 pb em 26 isolados. Destes 26 isolados, 25 tinham revelado positividade pelo teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA e apenas 1 tinha sido considerado negativo pelo teste de sinergismo.

A figura 6 apresenta os resultados obtidos para a detecção dos genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> em 7 isolados, dos quais três revelaram o amplicão de 815 pb.

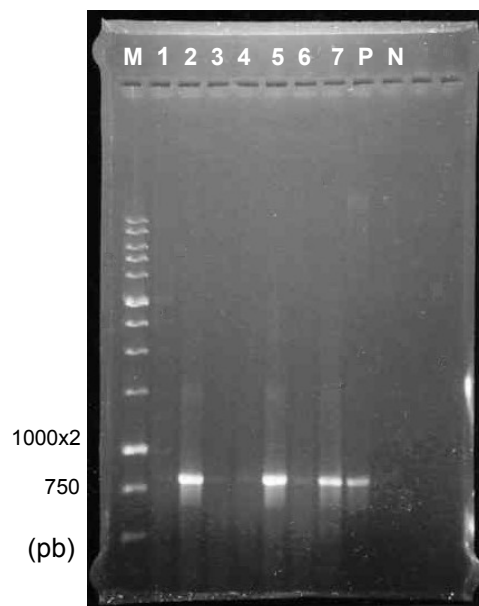


Figura 6. Separação eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para a detecção dos genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub>. Linha M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linhas 2, 5 e 7, isolados nº 21800, 429 e 541, respectivamente (amplicões de 815 pb); linhas 1, 3, 4 e 6, isolados nº 20134, 20912, 20463 e 524, respectivamente; linha P, controlo positivo; linha N, controlo negativo.

Relativamente ao total dos isolados resistentes ao imipenemo, 19,1% (n=26) apresentaram o gene *bla*<sub>VIM</sub>, sendo de origem hospitalar.

Os 26 isolados *bla*<sub>VIM</sub> positivos foram colhidos de doentes internados em diferentes Unidades Hospitalares: Reanimação (n=7), Medicina (n=5), Pneumologia (n=5), Infecções (n=3), Medicina do Hospital de Pombal (n=2), Neurocirurgia (n=1), Ortopedia (n=1), Hospital Pediátrico (n=1) e Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico (n=1).

É importante salientar que a maior parte destas amostras foram isoladas a partir de expectoração (n=7), aspirado brônquico (n=4), urina (n=4), aspirado traqueal (n=2), exsudato de escara (n=3), ponta de um dreno (n=2), exsudato de meato (n=1), secreções (n=1), reanimação (n=1) e líquido (n=1).

Dos 26 isolados produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM, 18 (69,2%) pertenciam a indivíduos do sexo masculino e os restantes 8 (30,8%) correspondiam ao sexo feminino. Contudo, em doentes de ambos os sexos a maior parte (34,6%) dos isolados clínicos foram colhidos do grupo etário de 71 a 80 anos.

Não se observou nenhum produto de amplificação utilizando os *primers* específicos dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub>.

#### 4.3. DIFERENÇA ENTRE OS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ISOLADOS POSITIVOS PELO TESTE FENOTÍPICO E RELAÇÃO COM OS ISOLADOS QUE REVELARAM A PRESENÇA DE VIM

Através do teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA 40 isolados foram considerados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases e destes, 25 revelaram a presença do gene *bla*<sub>VIM</sub> por PCR, registando-se uma sensibilidade de 62,5%.

Constatou-se que 22 (55%) isolados positivos por teste fenotípico apresentaram a diferença do diâmetro dos halos de inibição entre 11 e 15 mm, dos quais 17 (42,5%) revelaram posteriormente o gene *bla*<sub>VIM</sub> (figura 7), observando-se uma sensibilidade de 77,3%.

Quando a diferença do diâmetro dos halos estava compreendida entre 7 e 10 mm, dos 10 (25%) isolados positivos por teste fenotípico, apenas 2 (5%) apresentaram o gene *bla*<sub>VIM</sub> (figura 7), o que corresponde a uma sensibilidade de 20%.

Relativamente a diferenças do diâmetro dos halos superiores a 16 mm, dos 8 (20%) isolados positivos por teste fenotípico, 6 (15%) revelaram a presença do gene *bla*<sub>VIM</sub> (figura 7). Neste caso observou-se uma sensibilidade de 75%.

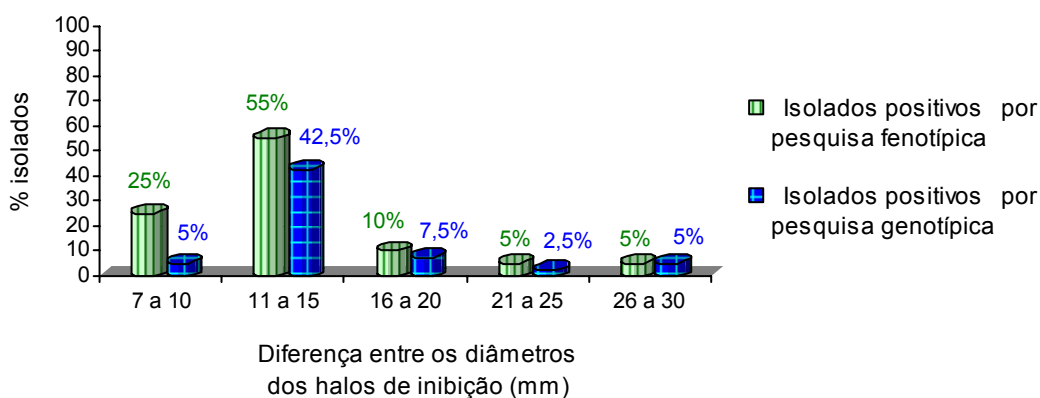


Figura 7. Relação entre a diferença dos diâmetros dos halos de inibição dos isolados positivos pelo teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA e dos isolados que revelaram a presença de *bla*<sub>VIM</sub> por PCR.

#### 4.4. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO POR PCR

Os produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para detecção do gene *bla<sub>VIM</sub>* foram purificados e analisados, revelando a presença da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 nos 26 isolados avaliados.

#### 5. DETERMINAÇÃO DAS CMIS DOS ISOLADOS PRODUTORES DE VIM-2

A susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foi avaliada de forma quantitativa pela metodologia do E-Test. Neste sentido, foram determinadas as CMIs dos antibióticos imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina em 26 isolados que apresentaram o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*.

Os resultados mostraram que o E-Test confirmou a resistência ao imipenemo em todos os isolados produtores de VIM-2 (CMI > 32  $\mu$ g/ml).

Em 84,6% dos isolados observou-se resistência ao meropenemo, dos quais 76,9% apresentaram CMI  $\geq$  32  $\mu$ g/ml e 7,7% mostraram CMI = 8  $\mu$ g/ml e CMI = 6  $\mu$ g/ml. Este antibiótico mostrou-se eficaz nos restantes 15,4% dos isolados avaliados (CMI  $\leq$  4  $\mu$ g/ml).

Verificou-se que 84,6% dos isolados produtores de VIM-2 apresentaram resistência aos dois carbapenemos (imipenemo e meropenemo) testados.

A maioria (92,3%) dos isolados avaliados revelou resistência à ceftazidima. Assim, este antibiótico inibiu o crescimento em apenas 7,7% dos isolados avaliados.

O aztreonamo apresentou eficácia em 76,9% dos isolados testados, enquanto que os restantes 23,1% mostraram resistência.

Considerando a totalidade dos antibióticos avaliados, a piperacilina apresentou melhor actividade, inibindo 84,6% dos isolados cujas CMIs variaram entre 4 e 48  $\mu$ g/ml. Os restantes 15,4% dos isolados apresentaram um nível de resistência muito elevado (CMI > 256  $\mu$ g/ml).

É de salientar que 15,4% dos isolados apresentaram um fenótipo multi-resistente a todos os antibióticos avaliados, nomeadamente, imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina.

No quadro V encontra-se descrita a CMI dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados de 26 isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2.

Quadro V. Concentração mínima inibitória dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina) de 26 isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2.

Nº isolado	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	IPM	MEM	CAZ	ATM	PIP
5783/03	> 32	3	24	1	48
7147/03	> 32	4	2,5	3	4
14593/03	> 32	32	>256	16	>256
17000/03	> 32	> 32	32	3	24
17083/03	> 32	> 32	64	3	48
17735/03	> 32	32	24	3	16
17872/03	> 32	> 32	24	3	8
18441/03	> 32	6	16	2	16
19168/03	> 32	> 32	64	2	16
19210/03	> 32	> 32	24	3	24
712/04	> 32	> 32	24	3	16
1801/04	> 32	4	32	2	16
1891/04	> 32	> 32	2	3	24
1825/04	> 32	> 32	32	256	32
3647/04	> 32	> 32	32	2	16
4584/04	> 32	> 32	32	2	24
6741/04	> 32	> 32	24	16	24
11874/04	> 32	> 32	>256	96	>256
12321/04	> 32	> 32	32	3	16
14349/04	> 32	3	16	2	12
15153/04	> 32	> 32	32	>256	>256
17053/04	> 32	8	32	1,5	32
18769/04	> 32	> 32	24	64	>256
21800/04	> 32	> 32	32	4	16
429/05	> 32	> 32	32	6	32
541/05	> 32	> 32	16	3	32

IPM, imipenemo; MEM, meropenemo; CAZ, ceftazidima;  
ATM, aztreonamo; PIP, piperacilina.

## 6. DETECÇÃO DE INTEGRÕES DE CLASSE 1

Foram detectados integrões de classe 1 em 3 dos 26 (11,5%) isolados testados. Os amplicões obtidos apresentaram tamanhos de 1000 pb (isolado nº 5783) e de 3000 pb (isolados nº 17083 e nº 19168). Nos restantes isolados não se observou nenhuma banda.

A figura 8 apresenta os resultados obtidos para a detecção de integrões de classe 1 em 12 isolados, dos quais os isolados nº 19168 e nº 17083 apresentaram um amplicão de 3 Kb.

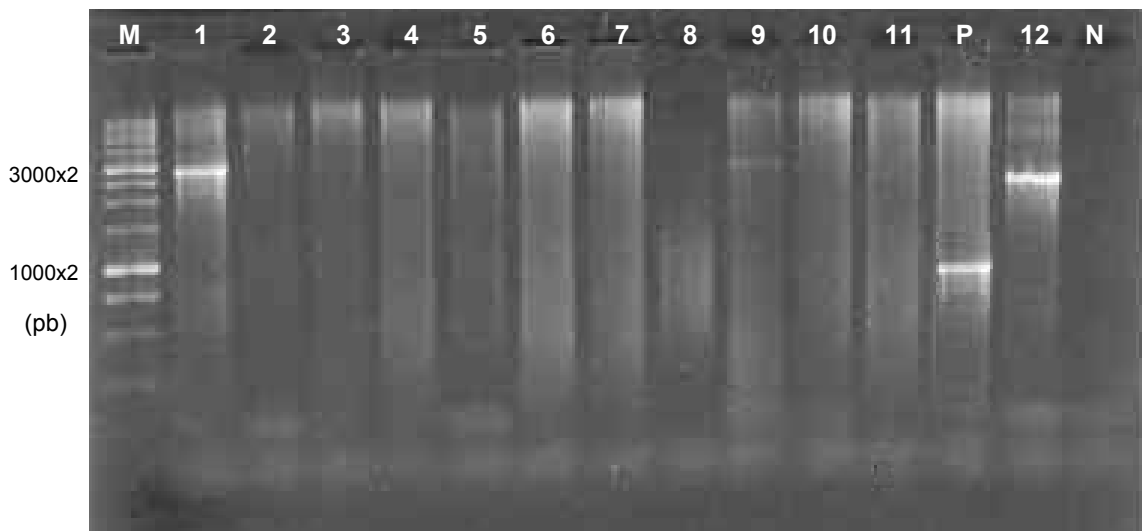


Figura 8. Separação eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para a detecção de integrons de classe 1. Linha M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linha 1 isolado nº 19168 (amplificação de 3 Kb); linhas 2 à 11, isolados nº 19210, 712, 11874, 12321, 15153, 14349, 17053, 18769, 21800, 429 e 541, respectivamente; linha P, controlo positivo, isolado nº 9287 (amplificação de 1 Kb); linha 12, isolado nº 17083 (amplificação de 3 Kb); Linha N, controlo negativo.

## 7. PESQUISA DE GENES *bla*<sub>VIM-2</sub> EM INTEGRÕES DE CLASSE 1

Após purificação dos produtos amplificados com *primers* 5'-CS e 3'-CS efectuaram-se novas reacções de amplificação por PCR com *primers* específicos para a detecção do gene *bla*<sub>VIM</sub>. Em todos os isolados testados (nº 5783, nº 17083 e nº 19168) observou-se um fragmento com o tamanho de 815 pb.

Os produtos amplificados por PCR com os *primers* do gene *bla*<sub>VIM</sub> foram purificados e analisados, revelando a presença de VIM-2 nos três isolados testados.

Estes resultados demonstraram a inserção dos genes *bla*<sub>VIM-2</sub> em integrons de classe 1.

## 8. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD

Foram tipados os 26 isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 colhidos de doentes internados em 9 Unidades Hospitalares entre Setembro de 2003 e Janeiro de 2005 (quadro VI). É de salientar que 65,4% (n=17) das amostras foram isoladas de produtos biológicos provenientes do tracto respiratório, 15,4% (n=4) de urina e 19,2% (n=5) de outros produtos.

Tendo em conta o critério descrito por Campbell e colaboradores (2000), foi possível distinguir 7 tipos de perfis RAPD (figura 9), identificados de A a G.

No perfil A incluem-se 65,4% (n=17) dos isolados colhidos entre Setembro de 2003 e Janeiro de 2005 em 5 Unidades Hospitalares, nomeadamente Medicina, Reanimação, Pneumologia, Neurocirurgia e Ortopneumatologia.

O perfil B é constituído por 7,7% (n=2) dos isolados obtidos em Setembro de 2004 e em Janeiro de 2005 nas Unidades Hospitalares de Reanimação e de Pneumologia, sendo considerados semelhantes aos isolados do perfil A, atendendo aos critérios descritos no capítulo Material e Métodos (Campbell *et al.*, 2000).

Na Unidade de Medicina do Hospital de Pombal nos meses de Agosto e Novembro de 2004 foram isoladas 7,7% (n=2) *P. aeruginosa* que apresentaram perfis idênticos classificados com o tipo C.

Na Unidade das Infecções nos meses de Outubro de 2003 e Julho de 2004 foram isoladas 7,7% (n=2) *P. aeruginosa* que apresentaram perfis idênticos classificados com o tipo E.

Quadro VI. Isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 e respectiva informação da data de isolamento, Unidade Hospitalar e perfil RAPD.

Nº Isolado	Data de isolamento	Unidade Hospitalar	Perfil RAPD
14593/03	25/09/03	Reanimação	A
17000/03	22/10/03	Reanimação	A
18441/03	19/11/03	Reanimação	A
19210/03	03/12/03	Reanimação	A
1891/04	04/02/04	Reanimação	A
12321/04	14/07/04	Reanimação	A
17053/04	29/09/04	Reanimação	B
17735/03	05/11/03	Neurocirurgia	A
17872/03	05/11/03	Ortopneumatologia	A
712/04	21/01/04	Medicina	A
1825/04	18/02/04	Medicina	A
3647/04	10/03/04	Medicina	A
4584/04	16/03/04	Medicina	A
6741/04	14/04/04	Medicina	A
1801/04	04/02/04	Pneumologia	A
14349/04	15/08/04	Pneumologia	A
21800/04	13/12/04	Pneumologia	A
429/05	11/01/05	Pneumologia	A
541/05	26/01/05	Pneumologia	B
15153/04	15/08/04	Med. H. Pombal	C
18769/04	02/11/04	Med. H. Pombal	C
5783/03	10/04/03	Infecções	D
17083/03	22/10/03	Infecções	E
11874/04	14/07/04	Infecções	E
7147/03	08/05/03	H. Pediátrico	F
19168/03	03/12/03	UCI H. Pediátrico	G

UCI H. Pediátrico, Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico;  
Med. H. Pombal, Medicina do Hospital de Pombal;  
H. Pediátrico, Hospital Pediátrico.

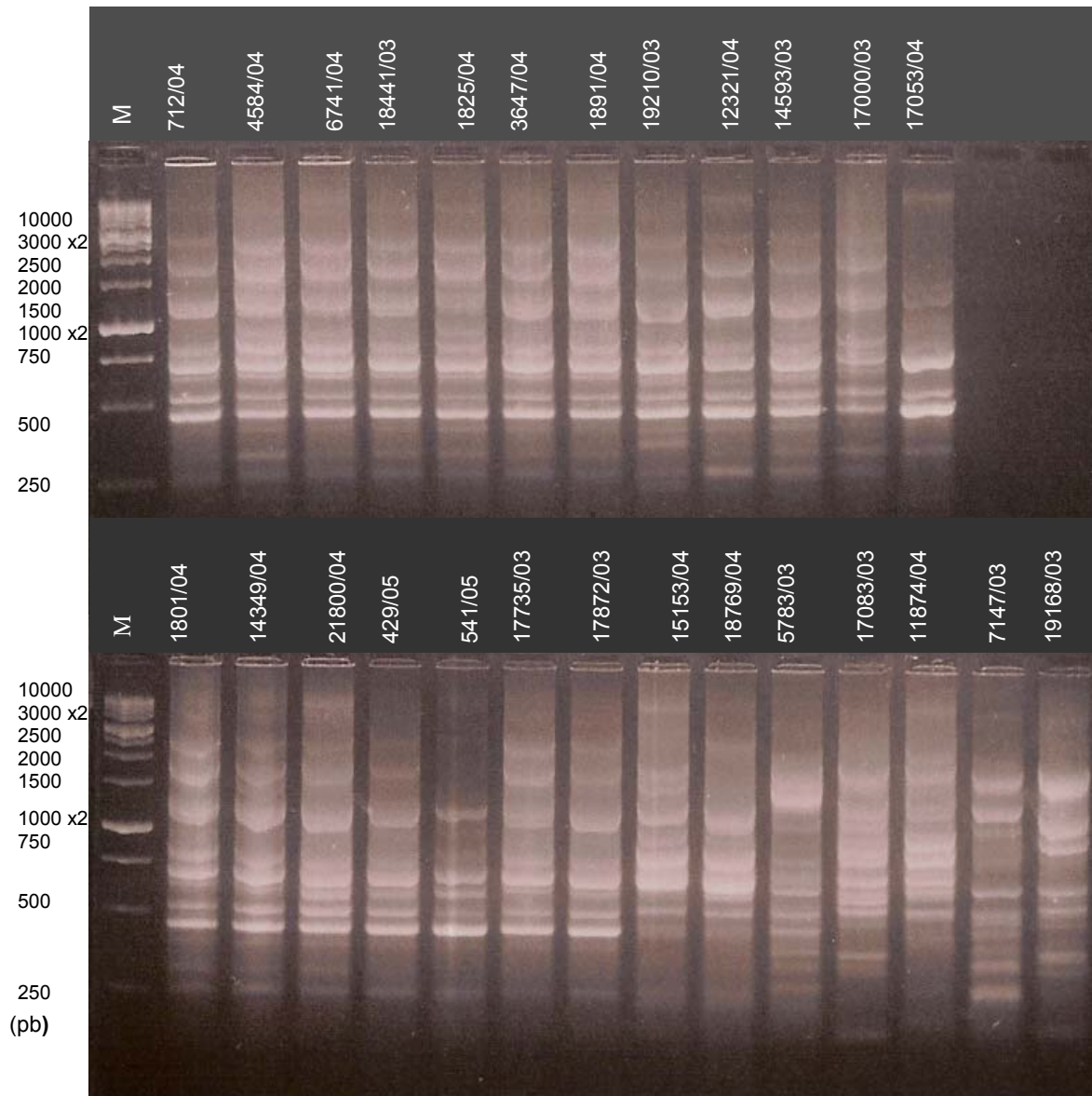


Figura 9. Perfis de RAPD de 26 isolados clínicos de *P. aeruginosa*  $bla_{VIM-2}$  positivos, obtidos com o *primer* 272. Linhas M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linhas 1 à 26, isolados.

Os restantes 3 isolados (11,5%), provenientes da Unidade das Infecções (Abril de 2003), Hospital Pediátrico (Maio de 2003) e Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico (Dezembro de 2003), apresentaram perfis diferentes entre si e relativamente aos anteriores, sendo identificados com os perfis D, F e G, respectivamente.



## **DISCUSSÃO**

---



## 1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES AO IMPENEMO

Os carbapenemos apresentam amplo espectro de actividade constituindo uma importante opção terapêutica em infecções graves provocadas por *P. aeruginosa*, especialmente em estirpes multi-resistentes (Edwards & Betts, 2000). A estrutura molecular destes agentes antimicrobianos permite uma excelente permeabilidade através da membrana exterior de bactérias de Gram negativo, uma boa afinidade com os alvos PBPs e uma grande estabilidade à hidrólise pela maioria das  $\beta$ -lactamases (Spratt, 1994; Livermore, 1996; Hancock *et al.*, 1998).

O antimicrobiano imipenemo/cilastatina inclui-se na primeira geração de carbapenemos e actualmente ainda constitui um dos agentes antimicrobianos mais eficazes. Contudo, diversos estudos têm demonstrado um aumento significativo da frequência de resistência ao imipenemo em *P. aeruginosa* (Deshpande *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2002).

Cardoso e colaboradores (2002) verificaram que 10% dos 525 isolados clínicos de *P. aeruginosa* colhidos entre 1995 e 1998 em centros hospitalares do Porto e zonas limítrofes apresentaram resistência ao imipenemo.

Em 2004 nos Hospitais da Universidade de Coimbra a frequência de resistência ao imipenemo foi superior, registando-se em 21% dos 1107 isolados de *P. aeruginosa* (Ribeiro *et al.*, 2004).

No presente trabalho verificou-se que 17,6% do total de isolados de *P. aeruginosa* colhidos entre Abril de 2003 a Abril de 2005 no Centro Hospitalar de Coimbra apresentaram resistência ao imipenemo.

No Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Trieste, norte de Itália, registou-se um aumento significativo da frequência de resistência ao imipenemo, 19% em 2000 para 29% em 2001 (Lagatolla *et al.*, 2004).

Em Unidades de Cuidados Intensivos, onde *P. aeruginosa* é uma das causas mais importantes de infecções nosocomiais graves, os níveis de susceptibilidade aos carbapenemos são geralmente inferiores relativamente às outras Unidades Hospitalares (Karlowsky *et al.*, 2003). Por outro lado, nestas Unidades Hospitalares em 2002, verificou-se um aumento de 32% da frequência de resistência ao imipenemo em isolados de *P. aeruginosa* relativamente ao período 1997-2001 (National Nosocomial Infection Surveillance System Report, 2003) e em 2003 um aumento de 15% relativamente ao período 1998-2002 (National Nosocomial Infection Surveillance System Report, 2004).

No presente estudo 91,9% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo eram provenientes de doentes hospitalizados e apenas 8,1% de doentes de ambulatório. A maior percentagem de isolados hospitalares poderá ser causada pelo uso intensivo do antimicrobiano imipenemo em doentes hospitalizados relativamente a doentes de ambulatório (Troillet *et al.*, 1997). Por outro lado, a contaminação cruzada em ambiente

hospitalar também poderá explicar a maior frequência de isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo neste local (Gulay *et al.*, 2001).

Em amostras hospitalares, o produto biológico a partir do qual se isolaram maior número de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo foi a expectoração (50,4%), seguido de exsudatos (15,2%), aspirados (12,8%), urina (8,8%) e sangue (3,2%). Estes resultados estão de acordo com outros estudos que obtiveram maior frequência para secreções respiratórias (50%) seguida de urina (15%), feridas (11%) e sangue (7%) (Harris *et al.*, 2002).

Relativamente às amostras de ambulatório, os produtos biológicos com maior frequência foram a expectoração e a urina seguido de exsudatos.

Neste sentido, a maior parte dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo foram obtidos a partir da expectoração (49,3%). Estes resultados podem ser justificados por esta espécie ser um dos patogénicos mais importantes em infecções do tracto respiratório (Eldere, 2003), sendo a segunda espécie mais frequentemente isolada de secreções respiratórias (Ribeiro *et al.*, 2004). Adicionalmente, estirpes isoladas de produtos patológicos provenientes do tracto respiratório terão mais facilidade em disseminar-se devido ao maior contacto com o meio exterior.

Neste trabalho foram registadas as idades e sexos dos doentes com infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo, sendo possível estabelecer uma relação entre os grupos etários/sexos dos doentes e incidência de infecções. Assim, verificou-se que a maioria (72,2%) dos isolados clínicos foram colhidos de doentes do sexo masculino. Esta percentagem é superior à descrita por Laupland e colaboradores (2005) que obtiveram 53%, indicando que o risco de infecção em indivíduos do sexo masculino é mais significativo no presente trabalho.

Em doentes de ambos os sexos, a grande parte (51,9%) dos isolados foram colhidos do grupo etário dos 61 aos 80 anos, o que poderá ser explicado pelo maior número de hospitalizações destes indivíduos e ainda pelo sistema imunitário mais debilitado devido à idade avançada. Estes resultados são consistentes com os obtidos por Laupland e colaboradores (2005), que observaram um significativo aumento de infecções com a idade, registando maior incidência em indivíduos com idades iguais ou superiores a 75 anos.

## **2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES AO IMIPENEMO**

Quando se suspeita que uma infecção é causada por *P. aeruginosa*, a terapêutica empírica adequada deve iniciar-se enquanto se aguarda a identificação bacteriana e os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro*.

A antibioterapia empírica deve ser baseada, sempre que possível, em normas ou recomendações de terapêutica publicadas, salientando que idealmente devem reflectir os perfis de susceptibilidade aos antibióticos observados na área geográfica e hospital em causa. Portanto, é necessário conhecer a susceptibilidade das espécies bacterianas a vários agentes antimicrobianos, uma vez que existem variações entre países, e também entre hospitais (Rossolini & Mantengoli, 2005).

No tratamento empírico de infecções graves causadas por *P. aeruginosa*, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como os carbapenemos, cefalosporinas de 3ª geração e piperacilina são frequentemente prescritos como monoterapia ou em combinação com quinolonas ou aminoglicosídeos (Jones *et al.* 2002). Contudo, o aumento da prevalência de infecções causadas por *P. aeruginosa* e das frequências de resistência aos antimicrobianos utilizados empiricamente têm dificultado a escolha da terapêutica para o tratamento destas infecções (Diekema *et al.*, 1999).

Em Portugal, tal como noutros países, *P. aeruginosa* tem vindo a ser isolada com maior frequência, sendo a terceira espécie mais isolada nos Hospitais da Universidade de Coimbra (Ribeiro *et al.*, 2004).

Neste trabalho verificou-se que em isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo, o agente antimicrobiano com maior actividade foi a amicacina (73,1%), seguido da ceftazidima (56,7%), ciprofloxacina (53,0%), cefepima (49,6%), piperacilina/tazobactam (47,4%), aztreonamo (37,3%) e meropenemo (20,3%). Estes resultados indicam que o aminoglicosídeo amicacina poderá ser uma boa opção na terapêutica empírica de infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo.

Estudos similares desenvolvidos em hospitais europeus também demonstraram que o agente antimicrobiano mais activo foi a amicacina (72,1%), seguido da ceftazidima (40,7%), ciprofloxacina (31,1%) e piperacilina/tazobactam (30,7%) (Higgins *et al.*, 2002); enquanto o meropenemo apenas apresentou eficácia em 24,1% dos isolados de *P. aeruginosa* testados (Turner, 2005).

O estudo espanhol desenvolvido por Sánchez e colaboradores (2004) mostrou que os antibióticos piperacilina/tazobactam e aztreonamo apresentaram eficácias superiores, respectivamente 58,6% e 52,6%. No entanto, as susceptibilidades apresentadas pela cefepima (49,6%), ceftazidima (41,4%), ciprofloxacina (33,8%) e meropenemo (17,3%) foram inferiores às verificadas no presente trabalho.

Os diferentes valores percentuais observados nestes estudos podem estar associados ao diferente número de isolados e/ou à distinta origem geográfica.

Foram obtidas percentagens de susceptibilidade superiores para o meropenemo relativamente ao imipenemo o que está de acordo com outros estudos que compararam a actividade antimicrobiana destes dois carbapenemos, demonstrando que o meropenemo apresenta actividade *in vitro* superior contra microrganismos de Gram negativo, como

*P. aeruginosa* (Gales *et al.*, 1997; Pfaller & Jones, 1997; Edwards & Betts, 2000). A resistência ao meropenemo é mais difícil de acontecer relativamente ao imipenemo, porque no caso do meropenemo são necessárias perda de OprD e aumento da expressão de MexAB-OprM para aquisição de resistência, enquanto no caso do imipenemo a perda de OprD é suficiente para aquisição de resistência (Livermore, 2001).

De referir que 3,7% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo apresentaram resistência simultânea a todos os antibióticos testados. Esta resistência elevada a diferentes grupos de antibióticos é resultado da combinação de diferentes mecanismos de resistência, como sejam a impermeabilidade da membrana exterior, efluxo e produção de  $\beta$ -lactamases.

A melhor forma de combater a resistência e conseguir terapia eficaz é otimizar o uso dos agentes antimicrobianos disponíveis actualmente. No entanto, é imperioso o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com actividade contra bacilos multi-resistentes de Gram negativo como *P. aeruginosa* (Jones, 2000; Giamarellou, 2002).

### 3. METALO- $\beta$ -LACTAMASES

Na última década verificou-se um aumento do número de publicações sobre a detecção de metalo- $\beta$ -lactamases em bacilos de Gram negativo, sobretudo em isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos da Ásia (Senda *et al.*, 1996b; Kimura *et al.*, 2005) Europa (Cornaglia *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2002; Pournaras *et al.*, 2003; Castanheira *et al.*, 2004; Toleman *et al.*, 2005), América do Norte (Lolans *et al.*, 2005), América do Sul (Toleman *et al.*, 2002; Gales *et al.*, 2003; Crespo *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004; Sader *et al.*, 2005; Villegas *et al.*, 2006) e Austrália (Peleg *et al.*, 2004; Peleg *et al.*, 2005). Este facto denota o interesse e preocupação pelas infecções nosocomiais causadas por este microrganismo sobretudo devido ao aumento da resistência aos carbapenemos mediada por metalo- $\beta$ -lactamases.

A produção de metalo- $\beta$ -lactamases é um dos mecanismos de resistência aos antibióticos que possibilita a hidrólise de todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos, com excepção dos monobactâmicos, sendo de realçar a eficiente actividade anti-carbapenemos (Bush *et al.*, 1995; Rasmussen & Bush, 1997; Bush, 1998; Livermore & Woodford, 2000).

A dificuldade em reconhecer isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases pelos laboratórios de microbiologia clínica pode conduzir à prescrição de terapêuticas antimicrobianas inadequadas. Neste sentido, existe a necessidade de detectar rapidamente os isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases de forma a controlar a infecção e prevenir a disseminação dos genes que codificam estas enzimas em bactérias patogénicas.

As metalo- $\beta$ -lactamases necessitam de iões divalentes, geralmente o zinco, como cofactor na reacção de hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (Jones *et al.*, 2005). Este facto permite a detecção destas enzimas por meio de testes fenotípicos que utilizem um agente quelante como o EDTA. A inibição da actividade enzimática pelo EDTA é uma importante característica utilizada para distinguir metalo- $\beta$ -lactamases de outras  $\beta$ -lactamases (Payne *et al.*, 1994).

O teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA é simples de executar e apresenta elevada sensibilidade e especificidade na detecção de isolados de *P. aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamases (Yong *et al.*, 2002), tendo sido utilizado por diversos autores na triagem destes isolados (Poirel *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2004; Pitout *et al.*, 2005).

Tendo como critério de positividade o aumento igual ou superior a 7 mm do diâmetro do halo de inibição do disco de imipenemo em que se aplicou EDTA (Yong *et al.*, 2002), utilizando o teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA considerou-se 40 (29,4%) isolados de *P. aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamases, relativamente aos 136 isolados testados.

Na Europa, a metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 é o sub-tipo dominante, tendo sido detectada em isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos oriundos de Portugal (Cardoso *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2005; Quinteira *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2006; Quinteira & Peixe, 2006), Espanha (Prats *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004), França (Poirel *et al.*, 2000), Itália (Pallecchi *et al.*, 2001; Luzzaro *et al.*, 2004), Grécia (Mavroidi *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2003), Polónia (Walsh *et al.*, 2003) e Croácia (Sardelic *et al.*, 2003).

A presença de *bla*<sub>VIM-2</sub> em isolados de *P. aeruginosa* em diversos países europeus pode reflectir a disseminação de estirpes através de pessoas que viajam entre esses países.

Em Portugal, o primeiro estudo relativo a isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 foi desenvolvido por Cardoso e colaboradores (2002). Esta metalo- $\beta$ -lactamase foi detectada em quatro isolados resistentes ao imipenemo na região norte, três colhidos de doentes internados no hospital do Vale de Sousa e um colhido de um doente de ambulatório no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (Cardoso *et al.*, 2002).

No Centro Hospitalar de Coimbra o gene *bla*<sub>VIM-2</sub> foi detectado em 19,1% dos isolados resistentes ao imipenemo e em 3,4% dos isolados de *P. aeruginosa* totais.

A resistência ao imipenemo nos isolados de *P. aeruginosa* não produtores de metalo- $\beta$ -lactamases (80,9%), poderá explicar-se devido à presença de outros mecanismos de resistência, nomeadamente a deficiente expressão ou ausência da porina OprD, outras  $\beta$ -lactamases, como a AmpC, efluxo e/ou mutações nos alvos PBPs (Livermore, 2001).

Estes resultados indicam que a produção de metalo- $\beta$ -lactamases em *P. aeruginosa* é um importante mecanismo de resistência aos carbapenemos. Assim, a rápida detecção destas enzimas por PCR contribui para o tratamento eficaz da infecção e prevenção da disseminação dos genes *bla*.

É importante salientar que 62,5% dos isolados de *P. aeruginosa* positivos por teste fenotípico apresentaram o gene *bla*<sub>VIM-2</sub>. A falsa positividade dos restantes 37,5% isolados poderá dever-se à existência de uma nova metalo- $\beta$ -lactamase cujo gene não foi amplificado com os *primers* testados.

O teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA registou, na globalidade, uma sensibilidade de 62,5%. Os resultados mostraram um aumento da sensibilidade deste teste com o aumento da diferença do diâmetro dos halos de inibição. Assim, registaram-se as sensibilidades de 20%, 77,3% e 75%, quando a diferença do diâmetro dos halos estava compreendida entre 7 e 10 mm, 11 e 15 mm e superior a 16 mm, respectivamente. A menor sensibilidade registada, quando a diferença do diâmetro dos halos de inibição era superior a 16 mm relativamente a diâmetros compreendidas entre 11 e 15 mm poderá dever-se ao diferente número de isolados testados.

Verificou-se ainda, a presença de um isolado falso negativo por pesquisa fenotípica, ou seja, a pesquisa por teste fenotípico resultou negativa mas por PCR observou-se amplificação do gene *bla*<sub>VIM</sub>. Este resultado poderá dever-se à reduzida expressão do gene *bla*<sub>VIM</sub>, apoiando a observação feita por outros autores (Marchiaro *et al.*, 2005) relativamente à baixa sensibilidade de testes fenotípicos na detecção de isolados de *P. aeruginosa* com reduzida expressão de metalo- $\beta$ -lactamases.

A incidência do gene *bla*<sub>VIM-2</sub> em 3% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos num hospital espanhol foi relativamente inferior à observada no Centro Hospitalar de Coimbra (Sánchez *et al.*, 2004). No entanto, um estudo italiano descreve a presença deste gene em 20% dos isolados de *P. aeruginosa* totais e em 70% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo (Lagatolla *et al.*, 2004).

Através da técnica PCR não foram detectados os genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub>, embora diversos estudos tenham demonstrado a presença de *bla*<sub>IMP</sub> na Ásia, sobretudo no Japão, onde inicialmente foi descrito (Watanabe *et al.*, 1991), mas também na Europa (Laraki *et al.*, 1999; Toleman *et al.*, 2003; Pagani *et al.*, 2005; Toleman *et al.*, 2005), e mais recentemente, na América do Norte (Gibb *et al.*, 2002), América do Sul (Castanheira *et al.*, 2003; Hanson, 2004; Mendes *et al.*, 2004) e Austrália (Peleg *et al.*, 2004; Peleg *et al.*, 2005). Por outro lado, os genes *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub> apenas foram detectados em isolados de *P. aeruginosa* no Brasil (Toleman *et al.*, 2002) e na Alemanha (Castanheira *et al.*, 2004), respectivamente.

A técnica PCR apresenta limitações práticas importantes para a aplicação diária nos laboratórios clínicos, nomeadamente o elevado custo (Arakawa *et al.*, 2000; Gibb *et al.*, 2002) e a emergência de novos tipos de metalo- $\beta$ -lactamases. Assim sendo, testes



simples e baratos como o teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA são uma boa opção para a triagem das amostras produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases.

#### 4. SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS PRODUTORES DE VIM-2

Neste trabalho, todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 apresentaram resistência ao imipenemo. Apesar da maioria destes isolados também apresentar resistência ao meropenemo, verificou-se que 15,4% dos isolados mostraram susceptibilidade a este agente antimicrobiano. A melhor actividade do meropenemo face ao imipenemo foi observada também por outros investigadores (Poirel *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002; Prats *et al.*, 2002).

A ceftazidima constituiu uma alternativa terapêutica em apenas 7,7% dos isolados testados. Por outro lado, um estudo japonês observou resistência à ceftazidima em todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 (Yatsuyanagi *et al.*, 2004). A resistência à ceftazidima foi ainda descrita por outros autores (Mavroidi *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2001; Prats *et al.*, 2002; Aubron *et al.*, 2005; Lolans *et al.*, 2005). Estes resultados desaconselham o uso de ceftazidima na terapêutica empírica de infecções provocadas por *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 porque a probabilidade de insucesso terapêutico é elevada.

O aztreonamo revelou boa actividade em 76,9% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2. Num estudo desenvolvido por Cardoso e colaboradores (2002) a susceptibilidade a este antimicrobiano verificou-se em todos os isolados testados. A susceptibilidade ao aztreonamo foi também descrita em isolados de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 colhidos noutros países, nomeadamente em França (Poirel *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2001; Aubron *et al.*, 2005), Itália (Pallecchi *et al.*, 2001), Espanha (Prats *et al.*, 2002) e Estados Unidos da América (Lolans *et al.*, 2005). Por outro lado, estudos experimentais efectuados num modelo animal mostraram que elevadas doses de aztreonamo são eficazes no tratamento de pneumonia causada por isolados de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 (Bellais *et al.*, 2002).

Embora a utilização de aztreonamo seja considerada uma das terapêuticas de eleição, no presente trabalho 23,1% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 apresentaram resistência ao aztreonamo. Estudos similares descreveram também isolados resistentes ao aztreonamo (Mavroidi *et al.*, 2000, Kimura *et al.*, 2005; Lolans *et al.*, 2005). A resistência ao aztreonamo nestes isolados pode dever-se a mecanismos adicionais de resistência como alteração de PBPs, a hiperprodução de AmpC e mutações nas porinas (Lolans *et al.*, 2005).

Relativamente à totalidade dos antibióticos avaliados, a piperacilina apresentou melhor actividade inibindo 84,6% dos isolados. A eficácia da piperacilina foi ainda superior num

estudo japonês, pois todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 apresentaram susceptibilidade (Yatsuyanagi *et al.*, 2004b). Outros países, nomeadamente em França (Poirel *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2001), descreveram isolados de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 susceptíveis à piperacilina.

É importante salientar que 15,4% dos isolados testados apresentaram um fenótipo multi-resistente a todos os antibióticos avaliados. Estudos desenvolvidos por Lagatolla e colaboradores (2004) descreveram 76% de isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 com fenótipo multi-resistente.

Assim, para o tratamento eficaz de infecções nosocomiais causadas por isolados multi-resistentes, terá de se recorrer à combinação de diferentes antibióticos (Mayer & Nagy, 1999). Por outro lado, o aumento da frequência de estirpes multi-resistentes levou à reutilização de antibióticos como a colistina, que deixaram de ser prescritos no início dos anos oitenta devido a problemas de toxicidade (Giamarellou, 2002; Stein & Raoult, 2002).

## 5. GENES *bla*<sub>VIM</sub> E INTEGRÕES DE CLASSE 1

Integrões de classe 1 são frequentemente detectados em isolados resistentes aos antibióticos, nomeadamente em isolados clínicos de *P. aeruginosa* que expressam genes *bla*<sub>VIM</sub> (Poirel *et al.*, 2000; Mavroidi *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2001; Pallecchi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Giakkoupi *et al.*, 2003; Pournaras *et al.*, 2003; Sardelic *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003; Yatsuyanagi *et al.*, 2004a; Aubron *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2005; Quinteira & Peixe, 2006; Villegas *et al.*, 2006). As cassetes genéticas localizadas em integrões adquirem maior potencial para se expressarem e disseminarem entre populações bacterianas da mesma espécie e de espécies diferentes (Nordmann & Poirel, 2002).

No presente trabalho foram detectados integrões de classe 1 em 11,5% dos isolados produtores de VIM. Contudo, um estudo grego de âmbito idêntico descreveu 94,4% de integrões de classe 1 (Giakkoupi *et al.*, 2003).

Neste estudo a pesquisa de integrões de classe 1 revelou a presença de amplicões com os tamanhos de 1 Kb e 3 Kb, resultados em concordância com os descritos por Giakkoupi e colaboradores (2003), cujos tamanhos variaram entre 1 Kb e 3 Kb.

A diferença de tamanhos dos integrões de classe 1 detectados sugere a evolução de um integrão único ou a aquisição de cassetes genéticas *bla*<sub>VIM</sub> por diferentes integrões de classe 1 (Giakkoupi *et al.*, 2003; Quinteira *et al.*, 2005).

## 6. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD

No meio hospitalar a detecção da origem da infecção assim como a relação entre estirpes isoladas é essencial para a implementação de medidas adequadas para prevenir a disseminação de microrganismos patogénicos (Talon *et al.*, 1998).

O método RAPD tem sido utilizado com frequência na tipagem de isolados de *P. aeruginosa* (Renders *et al.*, 1996; Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000; Giakkoupi *et al.*, 2003; Lagatolla *et al.*, 2004; Ortiz-Herrera *et al.*, 2004).

Este método tem demonstrado elevada especificidade, reprodutividade, rapidez e simplicidade (Renders *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000; Menon *et al.*, 2003) pelo que é extremamente útil em estudos epidemiológicos, nomeadamente em isolados de *P. aeruginosa*.

Com base no critério descrito por Campbell e colaboradores (2000), foi possível distinguir 7 tipos de perfis RAPD, classificados de A a G, demonstrando uma certa diversidade genética entre os isolados tipados.

A maioria (65,4%) dos isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 apresentou perfis RAPD idênticos (perfil A), pressupondo-se, por isso, que um mesmo clone poderá ter-se disseminado por vários doentes internados nas 5 Unidades Hospitalares (Medicina, Reanimação, Pneumologia, Neurocirurgia e Ortopneumologia) entre Setembro de 2003 e Janeiro de 2005.

O perfil B é constituído por 7,7% dos isolados colhidos em Setembro de 2004 e em Janeiro de 2005 nas Unidades Hospitalares de Reanimação e de Pneumologia, verificando-se que estes isolados são semelhantes aos do perfil A, sugerindo uma pequena mutação nestes isolados dando origem ao perfil B (Campbell *et al.*, 2000).

Na Unidade de Medicina do Hospital de Pombal nos meses de Agosto e Novembro de 2004 foram isoladas duas amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram perfis idênticos classificados com o tipo C indicando a presença da mesma estirpe nesta Unidade Hospitalar. O facto dos isolados que apresentaram o perfil C serem diferentes dos isolados classificados com o tipo A pode dever-se à distância física entre os respectivos Hospitais.

Na Unidade das Infecções foram isoladas duas amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram perfis idênticos classificados com o tipo E, sugerindo que esta Unidade tem esse clone e que é único pois não se encontra nas outras Unidades Hospitalares.

O isolamento de *P. aeruginosa* com perfis moleculares idênticos sugere que esses microrganismos tenham origem num único clone, tornando mais provável a hipótese de transmissão de um doente para outro através de uma fonte e/ou mecanismo comum. Estudos descrevem que doentes colonizados constituem a maior fonte de contaminação cruzada de outros doentes (Gulay *et al.*, 2001). As mãos e luvas contaminadas do pessoal clínico são a forma mais comum de transmissão de *P. aeruginosa* (Takeyama *et*

*al.*, 2002). Esta disseminação indica que existem falhas na implementação de medidas de controlo de infecções como a lavagem das mãos do pessoal clínico, desinfecção de equipamento e material médico-cirúrgico, isolamento de doentes contaminados e/ou infectados. Neste sentido, nas Unidades Hospitalares avaliadas devem ser instituídas medidas de prevenção e controlo de infecções mais eficazes.

Um outro factor que pode contribuir para a transmissão nosocomial de *P. aeruginosa* é a capacidade deste microrganismo colonizar superfícies inanimadas por longos períodos de tempo (Grundmann *et al.*, 1993; Bosshammer *et al.*, 1995), permitindo a permanência em meio hospitalar. Assim, estabelecem-se condições que facilitam a disseminação e, por consequência, a repetição de surtos infecciosos.

Os restantes 3 isolados, provenientes da Unidade das Infecciosas (Abril de 2003), Hospital Pediátrico (Maio de 2003) e Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico (Dezembro de 2003), apresentaram perfis diferentes entre si e relativamente aos anteriores, sendo identificados com os perfis D, F e G, respectivamente. A presença de isolados com perfis diferentes nas Unidades Pediátricas relativamente às restantes Unidades Hospitalares, pode dever-se à ausência de transferência de doentes entre as Unidades Pediátricas e as outras Unidades Hospitalares.

Na Unidade das Infecciosas não foi encontrado o clone A, sugerindo que nesta Unidade Hospitalar as medidas de prevenção e controlo da disseminação de microrganismos patogénicos são mais eficazes.

De referir que na Unidade das Infecciosas foram colhidos dois isolados que apresentaram integrões de classe 1 com tamanhos diferentes, de 1 Kb e de 3 Kb, e observou-se ainda uma distância temporal (o isolado 5783 foi colhido em Abril de 2003 e o isolado 17083 em Outubro de 2003), eventualmente pode ter acontecido a aquisição de outras cassetes genéticas pelo integrão de 1 Kb durante este período de tempo (Quinteira *et al.*, 2005). Neste sentido, a diferença de tamanho dos integrões detectados poderá reflectir a evolução de um integrão ou a aquisição da cassette genética *bla*<sub>VIM-2</sub> por diferentes integrões de classe 1 (Giakkoupi *et al.*, 2003).

De facto, quando um surto infeccioso ocorre num hospital, é importante perceber se foi causado por uma ou várias estirpes, no sentido de minimizar a sua transmissão e disseminação.

## **CONCLUSÕES**

---



---

A ANÁLISE DO PRESENTE TRABALHO PERMITIU RETIRAR AS SEGUINTE CONCLUSÕES:

- ✓ Os isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo surgem mais frequentemente em ambiente hospitalar (91,9%).
- ✓ O produto biológico mais representativo foi a expectoração (49,3%).
- ✓ Os isolados resistentes ao imipenemo infectam com maior frequência indivíduos do sexo masculino (72,2%), existindo predominância em idades superiores a 40 anos (68,2%).
- ✓ Em doentes de ambos os sexos, grande parte (51,9%) dos isolados foram colhidos do grupo etário dos 61 aos 80 anos, indicando maior risco de aquisição de infecção causada por isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo.
- ✓ Na avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos em isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo, observou-se que:
  - O meropenemo também apresentou baixa actividade (20,3%).
  - O aminoglicosídeo amicacina mostrou melhor eficácia (73,1%).
  - A fluoroquinolona ciprofloxacina apresentou actividade em 53,0% dos isolados testados.
  - Relativamente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a ceftazidima apresentou boa actividade (56,7%), seguida da cefepima (49,6%). A associação de piperacilina com tazobactam e o aztreonamo inibiram 47,4% e 37,3% dos isolados, respectivamente.
  - A presença 3,7% de isolados resistentes a todos os antibióticos testados, nomeadamente ao imipenemo, meropenemo, aztreonamo, cefepima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, amicacina e ciprofloxacina, torna imperioso o aparecimento de alternativas terapêuticas.
- ✓ A detecção fenotípica de metalo- $\beta$ -lactamases através do teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA, revelou-se positiva em 29,4% dos isolados resistentes ao imipenemo.
- ✓ O teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA registou uma sensibilidade de 62,5% constituindo uma boa opção para a triagem inicial de amostras produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases.

- ✓ Relativamente ao total dos isolados resistentes ao imipenemo 19,1% apresentaram o gene *bla*<sub>VIM</sub>, sendo de origem hospitalar.
- ✓ 65% das amostras produtoras da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 foram isoladas de produtos biológicos provenientes do tracto respiratório.
- ✓ Não se observou a presença dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>GIM</sub>.
- ✓ Na determinação das CMI's aos agentes antimicrobianos em isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2, observou-se que:
  - O meropenemo também apresentou baixa actividade (15,4%).
  - A piperacilina e o aztreonamo mostraram maior eficácia, inibindo 84,6% e 76,9% dos isolados, respectivamente.
  - A maioria (92,3%) dos isolados avaliados revelou resistência à ceftazidima.
  - 15,4% dos isolados apresentaram um fenótipo multi-resistente aos carbapenemos, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina.
  - A emergência de isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases reduz as opções terapêuticas em infecções hospitalares.
- ✓ Foram detectados integrões de classe 1 em 11,5% dos isolados produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2. A inserção dos genes *bla*<sub>VIM-2</sub> nestes integrões possibilita a disseminação horizontal de metalo- $\beta$ -lactamases, aumentando a relevância clínica destas enzimas.
- ✓ A tipagem genética dos isolados de *P. aeruginosa* produtores da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2 colhidos de doentes internados em 9 Unidades Hospitalares entre Setembro de 2003 e Janeiro de 2005, permitiu distinguir 7 tipos de perfis RAPD, identificados de A a G:
  - Existem indicações de disseminação de três estirpes, que apresentaram os perfis A, B e C:
    - O perfil A apresentado pela maioria (65,4%) dos isolados sugere disseminação clonal em doentes internados em 5 Unidades Hospitalares (Medicina, Reanimação, Pneumologia, Neurocirurgia e Ortopneumatologia).
    - O perfil B apresentado por 7,7% dos isolados, indica um clone semelhante ao clone de perfil A, encontrando-se nas Unidades Hospitalares de Reanimação e de Pneumologia.



- O perfil C representado por isolados da Unidade de Medicina do Hospital de Pombal é único e não se encontra nos outros hospitais do Centro Hospitalar de Coimbra.
  - O perfil E ostentado por isolados da Unidade das Infecções também é único relativamente às outras Unidades Hospitalares.
  - Necessidade de medidas preventivas da disseminação de estirpes produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases.
- Os perfis D, F e G foram apresentados por 11,5% dos isolados provenientes da Unidade das Infecções, do Hospital Pediátrico e da Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico, respectivamente.
- ✓ No Centro Hospitalar de Coimbra a resistência elevada aos carbapenems em *P. aeruginosa* deve-se a um conjunto de factores, incluindo a presença da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2.



## **BIBLIOGRAFIA**

---



- Ambler, R. P. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **289**: 321-331.
- Arakawa, Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fujiwara e M. Goto. 2000. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-Negative bacteria by using thiol compounds. *Journal Clinical Microbiology* **38**: 40-43.
- Aubron, C., L. Poirel, N. Fortineau, P. Nicolas, L. Collet e P. Nordmann. 2005. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in a Hematology Unit of a French hospital. *Microbial Drug Resistance* **11**: 254-259.
- Bahar, G., A. Mazzariol, R. Koncan, A. Mert, R. Fontana, G. M. Rossolini e G. Cornaglia. 2004. Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 282-283.
- Bellais, S., O. Mimos, S. Leotard, A. Jacolot, O. Petitjean e P. Nordmann. 2002. Efficacy of  $\beta$ -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 2032-2034.
- Bennett, P. M. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**: 1-4.
- Bennett, P. M. e I. Chopra. 1993. Molecular basis of  $\beta$ -lactamase induction in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**: 153-158.
- Bosshammer, J., B. Fiedler, P. Gudowius, H. von der Hardt, U. Romling e B. Tummeler. 1995. Comparative hygienic surveillance of contamination with pseudomonads in a cystic fibrosis ward over a three year period. *Journal of Hospital Infection* **31**: 261-274.
- Boyd, A. e A. M. Chakrabarty. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology* **15**: 162-168.
- Bush, K. 1989. Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 259-263.
- Bush, K. 1998. Metallo- $\beta$ -lactamases: a class apart. *Clinical Infectious Disease* **27**: S48-S53.

- Bush, K. e G. Miller. 1998. Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 509-515.
- Bush, K., G. Jacoby e A. A. Medeiros. 1995. A functional classification for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 1211-1233.
- Campbell, M., E. Mahenthiralingam e D. P. Speert. 2000. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 4614-4615.
- Cardoso, O., J. C. Sousa, R. Leitão e L. Peixe. 1999. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**: 135.
- Cardoso, O., R. Leitão, A. Figueiredo, J. C. Sousa, A. Duarte e L. V. Peixe. 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance* **8**: 93-97.
- Carmeli, Y., N. Troillet, A. W. Karchmer e M. H. Samore. 1999a. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Internal Medicine* **159**: 1127-1132.
- Carmeli, Y., N. Troillet, G. M. Eliopoulos e M. H. Samore. 1999b. Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1379-1382.
- Carvalho, M. J., M. J. Saavedra, A. Correia, A. P. Castro e A. Duarte. 2005. Metallo- $\beta$ -lactamase in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate in a Portuguese hospital and identification of a new VIM-2 like enzyme. *Clinical Microbiology and Infection. Clinical Microbiology and Infection* **11(Suppl 2)**: 99.
- Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt e T. R. Walsh. 2004. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4654-4661.
- Castanheira, M., R. E. Mendes, T. Murphy *et al.* 2003. Characterization of mobile elements carrying metallo- $\beta$ -lactamase genes, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-16</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, from Latin American medical centres: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program [abstract C2-2023], p. **153**. In Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents

- and Chemotherapy (Chicago). American Society for Microbiology. Washington, DC.
- Chambers, H. 2000. Penicillins, p. 261-274. *In* G. Mandell, J. Bennett e R. Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5<sup>a</sup> edição, Vol 1. Churchill Livingstone, EUA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement M100-S15. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.*
- Collis, C. M., M.-J. Kim, H. W. Stokes e R. M. Hall. 2002. Integron-encoded Intl integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-bp site. *Molecular Microbiology* **46**: 1415-1427.
- Conejo, M. C., I. Garcia, L. Martinez-Martinez, L. Picabea e A. Pascual. 2003. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 2313-2315.
- Cornaglia, G., A. Mazzariol, L. Lauretti, G. M. Rossolini e R. Fontana. 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- $\beta$ -lactamase. *Clinical Infectious Diseases* **31**: 1119-1125.
- Cornaglia, G., K. Russell, G. Satta e R. Fontana. 1995. Relative importances of outer membrane permeability and group 1  $\beta$ -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 350-355.
- Cornaglia, G., M. L. Riccio, A. Mazzariol, L. Lauretti, R. Fontana e G. M. Rossolini. 1999. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* **353**: 899-900.
- Crespo, M. P., N. Woodford, A. Sinclair, M. E. Kaufmann, J. Turton, J. Glover, J. D. Velez, C. R. Castañeda, M. Recalde e D. M. Livermore. 2004. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing Vim-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5094-5101.
- Curtis, N. A. C., R. L. Eisenstadt, C. Rudd e A. J. White. 1986. Inducible type I  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **17**: 51-61.

- Deshpande, L. M., T. R. Fritsche e R. N. Jones. 2004. Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: a global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **49**: 231-236.
- Dever, L. e T. Dermody. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Archives in International Medicine* **151**:886-895.
- Doig, P., T. Todd, P. A. Sastry, K. K. Lee, R. S. Hodges, W. Paranchych e R. T. Irvin. 1988. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity* **56**: 1641-1646.
- Drenkard, E. e F. M. Ausubel. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**: 740-743.
- Du Bois, S. K., M. S. Marriot e S. G. B. Amyes. 1995. TEM- and SHV-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: relationship between selection, structure and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**: 7-22.
- Edmond M.B. e R. P. Wenzel. 2000. Isolation, p.2991-3004. In G. L. Mandell, J. E. Bennett e Dolin (eds). Principles and practice of infectious diseases, 5th ed., Churchill Livingstone, New York.
- Edwards, J. R. e M. J. Betts. 2000. Carbapenems: the pinnacle of the  $\beta$ -lactam antibiotics or room for improvement? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**: 1-4.
- Eldere, J. V. 2003. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 347-352.
- Farmer, T. H. e C. Reading. 1987. Induction of the beta-lactamases of a strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii* and *Enterobacter cloacae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **19**: 401-404.
- Fluit, A. C. e F.-J. Schmitz. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **18**: 761-770.
- Fluit, A. C. e F.-J. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and infectious Diseases* **10**: 272-288.
- Gales, A. C., H. S. Sader, S. M. Dainesi, I. I. Mimica, J. Sampaio, C. Zoccoli, C. Oplustil e C. Mendes. 1997. Comparative in vitro activity of meropenem versus other



- extended-spectrum antimicrobial agents against 2,085 clinical isolates tested in 13 Brazilian centers. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **1**: 294-305.
- Gales, A. C., L. C. Menezes, S. Silbert e H. S. Sader. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 699-702.
- Giakkoupi, P., G. Petrikos, L. S. Tzouveleki, S. Tsonas, The Whonet Greece Study Group, N. J. Legakis e A. C. Vatopoulos. 2003. Spread of integron associated VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 822-825.
- Giamarellou, H. 2002. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 229-233.
- Giamarellou, H. e A. Antoniadou. 2001. Antipseudomonal antibiotics. *The Medical clinics of North America* **85**: 19-42.
- Gibb, A. P., C. Tribuddharat, R. A. Moore, T. J. Louie, W. Krulicki, D. M. Livermore, M.- F. Palepou e N. Woodford. 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*<sub>IMP</sub> allele, *bla*<sub>IMP-7</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 255-258.
- Greenwood, D. 1998. Antibiotics and chemotherapeutic agents used in the therapy of bacterial infection. In L. Collier, A. Balows e M. Sussman (eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9<sup>th</sup> edition. Arnold, London.
- Grundmann, H., A. Kropec, D. Hartung, R. Berner e F. Daschner. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. *Journal of Infectious Diseases* **168**: 943-947.
- Gulay, Z, T. Atay e S. G. Amyes. 2001. Clonal spread of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit of a Turkish hospital. *Journal of Chemotherapy* **13**: 546-554.
- Hall, R. M. e C. M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology* **15**: 593-600.
- Hancock, R. E. W. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Disease* **27** (Suppl. 1): S93-S99.

- Hanson, N. D., A. Hossain, L. L. Buck, E. S. Moland, K. S. Thomson. 2004. Presented at the 44 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 64. Washington DC.
- Harris, A. D., D. Smith, J. A. Johnson, D. D. Bradham e M. C. Roghmann. 2002. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* **34**: 340-345.
- Hauser, A. R. e P. Sriram. 2005. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections: tackling the conundrum of drug resistance. *Postgraduate Medicine* **117**: 41-48.
- Hikida, M., K. Kawashima, M. Yoshida e S. Mitsuhashi. 1992. Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase-I from porcine and human renal cortex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **30**: 129-134.
- Ho, S. E., G. Subramaniam, S. Palasubramaniam e P. Navaratnam. 2002. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia producing IMP-7  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 3286-3287.
- Hoiby, N., H. K. Johansen, C. Moser, Z. Song, O. Ciofu e A. Kharazmi. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes and Infection* **3**: 23-35.
- Horton, J. e G. A. Pankey. 1982. Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. *Medical Clinics of North América* **66**: 135-142.
- Huang, H. e R. E. Hancock. 1993. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **175**: 7793-7800.
- Huovinen, P., S. Huovinen e G. A. Jacoby. 1988. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**: 134-136.
- Iyobe, S., H. Kusadokoro, A. Takahashi, S. Yomoda, T. Okubo, A. Nakamura, e K. O'Hara. 2002. Detection of a variant metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylooxidans* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 2014-2016.
- Jacoby, G. e K. Bush. 2006. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases. *Lahey Clinic*. In: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>.
- Jaurin, B., T. Grundstrom 1981. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamase of the penicillinase

- type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 4897-4901.
- Jones, R. N. 2000. Detection of emerging resistance patterns within longitudinal surveillance systems: data sensitivity and microbial susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46 (Suppl B)**: S1-S8.
- Jones, R. N., D. J. Biedenbach, H. S. Sader, T. R. Fritsche, M. A. Toleman e T. R. Walsh. 2005. Emerging epidemic of metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **51**: 77-84.
- Jones, R. N., F. Baquero, G. Privitera, M. Inoue e B. Wiedemann. 1997. Inducible  $\beta$ -lactamase mediated resistance to third-generation cephalosporins. *Clinical Microbiology and Infection* **3 (Suppl.1)**: S7-S20.
- Jones, R. N., J. T. Kirby, M. L. Beach, D. J. Biedenbach e M. A. Pfaller. 2002. Geographic variations in activity of broad-spectrum  $\beta$ -lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: summary of the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **43**: 239-243.
- Jones, R. N., M. L. Beach, M. A. Pfaller. 2001. Spectrum and activity of three contemporary fluoroquinolones tested against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Europe and the Americas; 2000): More alike than different! *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **41**: 161-163.
- Karlowsky, J. A., D. C. Draghi, M. E. Jones, C. Thornsberry, I. R. Friedland e D. F. Sahm. 2003. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 1681-1688.
- Kim, I.-S., N. Y. Lee, C.-S. Ki, W. S. Oh, K. R. Peck e J.-H. Song. 2005. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo- $\beta$ -lactamase producers in a Korean Hospital. *Microbial Drug Resistance* **11**: 355-359.
- Kimura, S., J. Alba, K. Shiroto, R. Sano, Y. Niki, S. Maesaki, K. Akizawa, M. Kaku, Y. Watanuki, Y. Ishii e K. Yamaguchi. 2005. Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 458-461.

- Koh, T. H., G. C. Y. Wang e L.-H. Sng. 2004. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5378-5380.
- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, F. E. Simone e J. C. Pechere. 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contribution of OprD and efflux systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 424-427.
- Kotra, L. e S. Mobashery. 1998. Beta-lactam antibiotics, beta-lactamases and bacterial resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **96**: 139-150.
- Kotra, L. e S. Mobashery. 1999. Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **47**: 211-266.
- Kurokawa, H., T. Yagi, N. Shibata, K. Shibayama e Y. Arakawa. 1999. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* **354**: 955.
- Lagatolla, C., E. A. Tonin, C. Monti-Bragadin, L. Dolzani, F. Gombac, C. Bearzi, E. Edalucci, F. Gionchetti e G. M. Rossolini. 2004. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospital. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 535-538.
- Laraki, N., N. Franceschini, G. M. Rossolini, P. Santucci, C. Meunier, E. de Pauw, G. Amicosante, J.-M. Frère e M. Galleni. 1999. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 813-817.
- Laupland, K. B., M. D. Parkins, D. L. Church, D. B. Gregson, T. J. Louie, J. M. Conly, S. Elsayed e J. D. D. Pitout. 2005. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-Producing Strains. *The Journal of Infectious Diseases* **192**: 1606-1612.
- Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana e G. M. Rossolini. 1999. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1584-1590.
- Lee, K., J. B. Lim, J. H. Yum, D. Yong, Y. Chong, J. M. Kim e D. M. Livermore. 2002. *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing

- Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1053-1058.
- Lee, K., J. H. Yum, D. Yong, H. M. Lee, H. D. Kim, J.-D. Docquier, G. M. Rossolini e Y. Chong. 2005. Novel acquired metallo- $\beta$ -Lactamase gene, *bla*<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 4485-4491.
- Lévesque, C., L. Piché, C. Larose e P. H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 185-191.
- Levin, A. S., A. A. Barone, J. Penço, M. V. Santos, I. S. Marinho, E. A. G. Arruda, E. I. Manrique e S. F. Costa. 1999. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases* **28**: 1008-1011.
- Li, X. Z., L. Zhang e K. Poole. 2000. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**: 433-436.
- Liao, X. e R. E. W. Hancock. 1997. Susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 1158-1161.
- Livermore, D. M. 1982.  $\beta$ -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **10**: 168-171.
- Livermore, D. M. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **8**: 557-584.
- Livermore, D. M. 1996. Are all  $\beta$ -lactams created equal? *Scandinavian Journal of Infectious Diseases (Suppl 101)*: 33-43.
- Livermore, D. M. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**: 247-250.
- Livermore, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases* **34**: 634-640.
- Livermore, D. M. e J. D. Williams. 1996.  $\beta$ -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance, p. 502-578. In V. Lorian (eds.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4 th. ed. Williams & Wilkins Baltimore, Maryland.

- Livermore, D. M. e N. Woodford. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology* **3**: 489-495.
- Livermore, D. M. e Y. J. Yang. 1987. Beta-lactamase lability and inducerpower of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases* **155**: 775-782.
- Livingstone, D., M. J. Gill e R. Wise. 1995. Mechanisms of resistance to the carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**: 1-5.
- Lodge, J., S. Busby e L. Piddock. 1993. Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa ampR* gene and its role at the chromosomal *ampC* beta-lactamase promoter. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **111**: 315-320.
- Lodge, J. M. e L. J. V. Piddock. 1991. The control of class I β-lactamase expression in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **28**: 167-172.
- Lodge, J. M., S. D. Minchin, L. J. V. Piddock e S. J. W. Busby. 1990. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal *ampC* beta-lactamase. *Biochemical Journal* **272**: 627-631.
- Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, J. Foster, J. S. Lam e D. P. Speert. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 1129-1135.
- Mai, G. T., W. K. Scow, G. B. Pier, J. G. McCormack, e Y. H. Thong. 1993. Suppression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infection and Immunity* **61**: 559-564.
- Marchiaro, P., M. A. Mussi, V. Ballerini, F. Pasteran, A. M. Viale, A. J. Vila, A. S. Limansky. 2005. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo-β-lactamases in nonfermentative Gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 5648-5652.
- Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F.-J. Schmitz, V. S. C. Grek, J. Verhoef, M. E. Jones. 1998. Class I integrons in gram-negative isolates from different European

- hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**: 689-696.
- Massova, I. e S. Mobashery. 1998. Kindship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 1-17.
- Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto e T. Nishino. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 3322-3327.
- Mavroidi, A., A. Tsakris, E. Tzelepi, S. Pournaras, V. Loukova e L. S. Tzouveleki. 2000. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 1037-1046.
- Mayer, I. e E. Nagy. 1999. Investigation of the synergic effects of aminoglycoside-fluoroquinolone and third-generation cephalosporin combinations against clinical isolates of *Pseudomonas* spp.. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**: 651-657.
- Mendes, R. E., M. A. Toleman, J. Ribeiro, H. S. Sader, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2004a. Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4693-4702.
- Mendes, R. E., M. Castanheira, P. Garcia, M. Guzman, M. A. Toleman, T. R. Walsh e R. N. Jones. 2004b. First Isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1433-1434.
- Menon, P. K., S. P. Eswaran, S. S. Pant, R. Bharadwaj e A. Nagendra. 2003. Random Amplification of Polymorphic DNA based typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Medical Journal Armed Forces India* **59**: 25-28.
- Minami, S., A. Yotsugi, H. Inoue e S. Mitsuashi. 1980. Induction of  $\beta$ -lactamase by various  $\beta$ -lactam antimicrobials in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**: 382-385.
- Murphy, T. A., A. M. Simm, M. A. Toleman, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2003. Biochemical Characterization of the acquired metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 582-587.

- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report: data summary from January 1990 to May 1999, issued June 1999. *American Journal of Infection Control* **27**: 520-532.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *American Journal of Infection Control* **31**: 481-498.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control* **32**: 470-485.
- Nishio, H., M. Komatsu, N. Shibata, K. Shimakawa, N. Sueyoshi, T. Ura, K. Satoh, M. Toyokawa, T. Nakamura, Y. Wada, T. Orita, T. Kofuku, K. Yamasaki, M. Sakamoto, S. Kinoshita, M. Aihara e Y. Arakawa. 2004. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki Region of Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5256-5263.
- Nikaido, H. 1998. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infectious Diseases* **27 (Suppl. 1)**: 32-41.
- Nikaido, H. 2000. Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clinical Microbiology and Infection* **6 (Suppl. 3)**: 22-26.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 593-656.
- Nordmann, P. 1998. Trends in  $\beta$ -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clinical Infectious Diseases* **27(Suppl.1)**: 100-106.
- Nordmann, P., e L. Poirel. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **8**: 321-331.
- Ochs, M. M., M. P. McCusker, M. Bains e E. Hancock. 1999. Negative regulation of de *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1085-1090.
- Olson, M. E., H. Ceri, D.W. Morck, A.G. Buret e R. R. Read. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research* **66**: 86-92.



- Ortiz-Herrera, M., A. Gerónimo-Gallegos, F. Cuevas-Schacht, L. Pérez-Fernández e R. Coria-Jiménez. 2004. Caracterización por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Salud Pública México* **46**: 149-157.
- Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura e N. Kato. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 71-78.
- Ozkurt, Z., M. Ertek, S. Erol, U. Altöparlak e M. N. Akcay. 2005. The risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the burn unit. *Burns* **31**: 870-873.
- Ouellette, M., L. Bissonnette e P. H. Roy. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1  $\beta$ -lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 7378-7382.
- Pagani, L., C. Colín, R. Migliavacca, M. Labonia, J.-D. Docquier, E. Nucleo, M. Spalla, M. L. Bergoli e G. M. Rossolini. 2005. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 3824-3828.
- Page, M. 1999. The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design* **5**: 895-913.
- Pallecchi, L., M. L. Riccio, J.-D. Docquier, R. Fontana, G. M. Rossolini. 2001. Molecular heterogeneity of *bla*<sub>VIM-2</sub>-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamases. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **195**: 145-150.
- Pasteran, F., D. Faccone, A. Petroni, M. Rapoport, M. Galas, M. Vázquez e A. Procopio. 2005. Novel Variant (*bla*<sub>VIM-11</sub>) of the metallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>VIM</sub> family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 474-475.
- Patzer, J., M. A. Toleman, L. M. Deshpande, W. Kamińska, D. Dzierżanowska, P. M. Bennett, R. N. Jones e T. R. Walsh. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*<sub>VIM-4</sub> gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). 2004. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**: 451-456.

- Payne, D. J., R. Cramp, J. H. Bateson, J. Neale e D. Knowles. 1994. Rapid identification of metallo- and serine  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 991-996.
- Peleg, A. Y., C. Franklin, J. Bell e D. W. Spelman. 2004. Emergence of IMP-4 metallo- $\beta$ -lactamase in a clinical isolate from Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 699-700.
- Peleg, A. Y., C. Franklin, J. M. Bell e D. W. Spelman. 2005. Dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP-4</sub> among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia clinical infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* **41**: 1549-1556.
- Pena, A., A. F. Alves, R. M. Leitão, O. Cardoso. 2006. Phenotypic and molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Centro Hospitalar of Coimbra in Portugal. *Clinical Microbiology and Infection* **12 (Suppl 4)**: P 1419.
- Pena, A., J. Martins, A. Donato, R. Leitão e O. Cardoso. 2005. Occurrence of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates resistant to carbapenems in a hospital in central Portugal. *Clinical Microbiology and Infection* **11 (Suppl 2)**: 107-108.
- Pfaller, M. A. e R. N. Jones. 1997. A review of the in vitro activity of meropenem and comparative antimicrobial agents tested against 30,254 aerobic and anaerobic pathogens isolated world wide. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **28**: 157-163.
- Pitout, J. D. D., D. B. Gregson, L. Poirel, J.-A. McClure, P. Le e D. L. Church. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 3129-3135.
- Poirel, L., M. Magalhaes, M. Lopes e Patrice Nordmann. 2004. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>SPM-1</sub>-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1406-1409.
- Poirel, L. e P. Nordmann. 2002. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **3**: 117-127.
- Poirel, L., T. Lambert, S. Türkoglu, E. Ronco, J.-L. Gaillard e P. Nordmann. 2001. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two

- novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 546-552.
- Poirel, L., T. Naas, D. Nicolas, L. Collet, S. Bellais, J. D. Cavallo e Nordmann. 2000. Characterization of VIM-2, carbapenem-hydrolysing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 891-897.
- Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3**: 255-264.
- Poole, K. 2004. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 2200-2223.
- Pournaras, S., A. Tsakris, M. Maniati, L. S. Tzouvelekis e A. N. Maniatis. 2002. Novel variant ( $bla_{VIM-4}$ ) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene  $bla_{VIM-1}$  in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 4026-4028.
- Pournaras, S., M. Maniati, E. Petinaki, L. S. Tzouvelekis, A. Tsakris, N. J. Legakis e A. N. Maniatis. 2003. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants  $bla_{VIM-2}$  and  $bla_{VIM-4}$ . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 1409-1414.
- Prats, G., E. Miro, B. Mirelis, L. Poirel, S. Bellais e P. Nordmann. 2002. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 932-933.
- Prince, A. 1992. Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microbial Pathogenesis* **13**: 251-260.
- Quinteira S. e L. Peixe. 2006. Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the Hospital setting: an ongoing dispersion process? *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3743-3745.
- Ramphal, R., e G. B. Pier. 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infection and Immunity* **47**: 1-4.
- Rasmussen, B. A. e K. Bush. 1997. Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 223-232.

- Recchia, G. D. e R. M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile elements. *Microbiology* **141**: 3015-3027.
- Renders, N., U. Römling, H. Verbrugh e A. V. Belkum. 1996. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 3190-3195.
- Ribeiro, M. G., R. Velho, C. Vieira, L. Boaventura, C. Pontes, R. Tomé, I. Ladeira, M. F. Cardoso, M. C. Vital, M. L. Costa, I. Batista, O. Santos M. N. Barata, M. Coroa, P. Neves, C. Oliveira, L. Tavares, A. Sofia e P. Silva. 2004. Agentes microbianos associados com infecções ocorridas em doentes assistidos nos H.U.C. em 2004. *Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra*.
- Rossolini, G. M. e E. Mantengoli. 2005. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection* **11 (Suppl. 4)**: 17-32.
- Rossolini, G. M., M. L. Riccio, G. Cornaglia, L. Pagani, C. Lagatolla, L. Selan, e R. Fontana. 2000. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired *bla<sub>VIM</sub>* metallo- $\beta$ -lactamase determinants, Italy. *Emerging Infectious Diseases* **6**: 312-313.
- Sabath, L. D. e E. P. Abraham. 1966. Zinc as a cofator for cephalosporinase form *Bacillus cereus*. *Biochemical Journal* **98**: 11-13.
- Sá-Correia, I. 2000. *Pseudomonadaceae. Pseudomonas*, p. 123-136. In W. C. Ferreira e J. C. F. de Sousa (eds.). *Microbiologia*, vol. **2**. Lidel Edições Técnicas, Lisboa.
- Sader, H. S., A. O. Reis, S. Silbert e A. C. Gales. 2005. IMPs VIMs and SPMs : the diversity of metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **11**: 63-82.
- Sader, H. S., M. Castanheira, R. E. Mendes, M. Toleman, T. R. Walsh e R. N. Jones. 2005. Dissemination and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *International Journal of Antimicrobial Agents* **25**: 57-61.
- Sánchez, A., S. Salso, E. Culebras e J. J. Picazo. 2004. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Española de Quimioterapia*. **17**: 336-340.

- Sanders, C. C. 1989. The chromosomal beta-lactamases, p. 129-149. *In* L. E. Bryan (eds.). Microbial resistance to drugs. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Sanders, C. C. e W. E. Sanders. 1985. Microbial resistance to newer generation beta-lactam antibiotics: clinical and laboratory implications. *The Journal of Infectious Diseases* **151**: 399-406.
- Sanders, C. C. e W. E. Sanders. 1992.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases* **15**: 824-839.
- Sardelic, S., L. Pallecchi, V. Punda-Polic e G. M. Rossolini. 2003. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase determinants, Croatia. *Emerging Infectious Diseases* **9**: 1022-1023.
- Senda, K., Y. Arakawa, K. Nakashima, H. Ito, S. Ichiyama, K. Shimokata, N. Kato e M. Ohta. 1996a. Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 349-353.
- Senda, K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashima, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shimokata, N. Kato, M. Ohta. 1996b. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla*<sub>IMP</sub>) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *Journal Clinical Microbiology* **34**: 2909-2913.
- Shah, P. M. e R. D. Isaacs. 2003. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 538-542.
- Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, T. Yagi, H. Kurokawa, K. Shibayama, H. Kato, K. Kai e Y. Arakawa. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 5407-4413.
- Shizuko, I., H. Kusadokoro, A. Takahashi, S. Yomoda, T. Okubo, A. Nakamura e K. O'Hara. 2002. Detection of a variant metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 2014-2016.
- Sousa, J. C. F. e L. V. N. Prista. 1988. Antibióticos inibidores da biossíntese do peptidoglicano. *Edição Ordem dos Farmacêuticos*.
- Sousa, J. C., L. V. Peixe, H. Ferreira, M. E. Pinto, M. S. J. Nascimento, M. I. Sousa e M. Cabral. 1998. Antimicrobianos, p. 239-269. *In* W. C. Ferreira e J. C. F. de Sousa (eds.). Microbiologia, vol. **1**. Lidel Edições Técnicas, Lisboa.

- Sousa, J. C. 2001. Antibióticos antibacterianos. Publicações Farmácia Portuguesa. Associação Nacional de Farmácias. Faculdade de Farmácia do Porto.
- Spratt, G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**: 388-393.
- Srikumar, R., C. J. Paul e K. Poole. 2000. Influence of Mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **182**: 1410-1414.
- Stein, A. e D. Raoult. 2002. Colistin: an antimicrobial for 21 st century? *Clinical Infectious Diseases* **35**: 901-902.
- Thomson, J. M. e R. A. Bonomo. 2005. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril! *Current Opinion in Microbiology* **8**: 518-524.
- Todar, K. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. In: <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>.
- Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 673-679.
- Toleman, M. A., D. Biedenbach, D. Bennett, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2003. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-13</sub>, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 583-590.
- Toleman, M. A., D. Biedenbach, D. M. C. Bennett, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2005. Italian metallo- $\beta$ -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 61-70.
- Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones e T. R. Walsh. 2004. *bla*<sub>VIM-7</sub>, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 329-332.
- Tsakris, A., S. Pournaras, N. Woodford, M.-F. I. Palepou, G. S. Babini, J. Douboyas e D. M. Livermore. 2000. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 1290-1292.

- Turner, P. J. 2005. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997-2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **51**: 281-289.
- Vicent, J. L., D. J. Bihari, P. M. Suter, H. A. Bruining, J. White, M. H. Nicolas-Chanoin, M. Wolff, R. C. Spencer e M. Hemmer. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *The Journal of the American Medical Association* **274**: 639-644.
- Vieira, V. V., É. L. Fonseca e A. C. P. Vicent. 2005. Metallo- $\beta$ -Lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **11**: 937.
- Villegas, M. V., K. Lolans, M. R. Olivera, C. J. Suarez, A. Correa, A. M. Queenan, J. P. Quinn e Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2006. First detection of metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 226-229.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel e P. Nordmann. 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* **18**: 306-325.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, W. Hryniewicz, P. M. Bennett e R. N. Jones. 2003. Evolution of an integron carrying *bla*<sub>VIM-2</sub> in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 116-119.
- Wang, C., J. Wang e Z. Mi. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamases and carrying two aminoglycoside-modifying enzymes in China. *Journal of Hospital Infection* **64**: 522-524.
- Wang, C.-X. e Z.-H. Mi. 2004. IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in the People's Republic of China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 1159-1160.
- Watanabe, M., S. Iyobe, M. Inoue e S. Mitsuhashi. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**: 147-151.
- Williams, R. J., D. M. Livermore, M. A. Lindridge, A. A. Said e J. D. Williams. 1984. Mechanisms of beta-lactam resistance in British isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Medical Microbiology* **17**: 283-293.

- Yamano, Y., T. Nishikawa e Y. Komatsu. 1990. Outer membrane proteins responsible for the penetration of beta-lactams and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**: 175-184.
- Yan, J.-J., P.-R. Hsueh, W.-C. Ko, K.-T. Luh, S.-H. Tsai, H.-M. Wu, e J.-J. Wu. 2001. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2224-2228.
- Yatsuyanagi, J., S. Saito, S. Harata, N. Suzuki, Y. Ito, K. Amano e K. Enomoto. 2004a. Class 1 Integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 626-628.
- Yatsuyanagi, J., S. Saito, Y. Ito, K. Ohta, J. Kato, S. Harata, N. Suzuki e K. Amano. 2004b. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains harboring the *bla*<sub>VIM-2</sub> metallo- $\beta$ -lactamase gene in Akita Prefecture, Japan. *Japanese journal of infectious diseases* **57**: 130-132.
- Yong, D., K. Lee, J. H. Yum, H.B. Shin, G.M. Rossolini e Y. Chong. 2002. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3798-3801.
- Ziha-Zarifi, I., C. Llanes, T. Köhler, J.-C. Pechere e P. Plesiat. 1999. In Vivo emergence of Multidrug-Resistant Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active Efflux System MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 287-29.