



FACULDADE DE FARMÁCIA

UNIVERSIDADE DO PORTO

**Metallo- $\beta$ -Lactamases VIM-2 em Isolados Clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa***

---

Teresa Moreira dos Reis

2008





FACULDADE DE FARMÁCIA

UNIVERSIDADE DO PORTO

**Metallo- $\beta$ -Lactamases VIM-2 em Isolados Clínicos de  
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada à Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas, realizada sob orientação da Professora Doutora Olga Cardoso, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e co-orientação do Professor Doutor Franklim Marques, Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

---

Teresa Moreira dos Reis

2008



*Aos Meus Pais  
e  
Ao Rui*



## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Olga Cardoso, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o meu agradecimento sincero por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação técnico-científica, pelos ensinamentos transmitidos e pelo tempo generosamente despendido desde o início das actividades experimentais até à revisão do presente estudo.

Ao Professor Doutor Franklim Marques, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, co-orientador deste trabalho, pela compreensão e interesse e também pelo empenho dedicado ao Mestrado em Análises Clínicas.

Às Professoras Doutoradas Cristina Luxo, Gabriela Silva, Maria do Céu Sousa e Dra. Ana Miguel Silva agradeço a amizade com que me receberam, a disponibilidade que sempre demonstraram para me ajudar e as palavras de incentivo.

À Dra Graça Ribeiro, Chefe de Serviço e Responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra agradeço o apoio ao meu trabalho e a pronta disponibilização dos isolados clínicos para sua execução. Deixo também um agradecimento especial à Dra. Clementina Vital, Farmacêutica deste Serviço, pelo seu empenho, dedicação e amizade.

Agradeço ainda ao Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra a cedência dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, sem os quais este estudo não teria sido possível.

À Guida Bento, à Márcia Klauck, à Joana Paixão e ao João Frade pelas longas horas de companhia, amizade e entreajuda.

Aos meus amigos que se mostraram interessados e solícitos em ajudar-me e tiveram sempre uma palavra de ânimo.

A todos um MUITO OBRIGADO.



## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno humano oportunista com uma capacidade extraordinária para resistir aos antibióticos, quer intrinsecamente quer pela aquisição de genes de resistência sendo, por estes motivos, considerada uma das maiores causas de infecções nosocomiais. As metalo- $\beta$ -lactamases adquiridas podem conferir resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, em especial aos carbapenemos, que não é reversível pelos inibidores convencionais das  $\beta$ -lactamases. Estas enzimas são determinantes emergentes de elevada importância. Os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamases IMP e VIM estão disseminados por todo o mundo, enquanto que as enzimas SPM-1 e a GIM têm sido apenas descritas no Brasil e na Alemanha, respectivamente. Nos últimos tempos, com alguma frequência, têm sido descritas *P. aeruginosa* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) resistentes, pelo menos, às cefalosporinas de largo espectro. As enzimas TEM, SHV, PER, VEB e GES têm sido isoladas em estirpes de *P. aeruginosa* e são responsáveis por alguns surtos nosocomiais.

Entre Junho de 2007 e Junho de 2008 foram recolhidos 236 isolados de *P. aeruginosa* do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC) e 104 foram seleccionados devido à sua resistência ao imipenemo, pelo sistema MicroScan WalkAway. Dos Hospitais da Universidade de Coimbra, foram também estudadas 31 estirpes de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo, colhidas no primeiro semestre de 2008. Aos 104 isolados foram feitos antibiogramas pelo método de Kirby-Bauer e 91 (87,5%) provaram ser resistentes ao imipenemo. Destes, as sensibilidades observadas foram: 23,1% ao meropenemo; 76,9% à cefepima, 79,1% à ceftazidima; 70,3% à piperacilina; 34,1% ao aztreonamo; 25,3% à ciprofloxacina e 96,7% à amicacina. Fez-se também, uma pesquisa fenotípica de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, em 135 isolados (104 dos CHC e 31 dos HUC) mas, nenhum foi positivo. O teste do duplo disco foi usado para triagem dos isolados clínicos resistentes ao imipenemo relativamente à presença de metalo- $\beta$ -lactamases, tendo-se observado o teste fenotípico positivo em 50 (41%). O gene *bla*<sub>VIM</sub> foi detectado em 27 (54%) isolados e nenhuma das outras metalo- $\beta$ -lactamases (IMP, GIM e SPM-1) foi observada. A sequenciação confirmou a presença do gene *bla*<sub>VIM-2</sub> nos 27 isolados. As CMI's foram determinadas nas estirpes produtoras de VIM e verificou-se que aztreonamo inibiu 81,5% dos isolados, seguido da piperacilina (66,7%), ceftazidima (25,9%) e meropenemo (22,2%). Foram detectados 11 integrões de classe 1 dentre os isolados que apresentavam o gene *bla*<sub>VIM</sub>.

A tipagem por RAPD dos isolados produtores de VIM-2 mostrou 14 perfis distintos, de A a O, sete dos quais eram dos HUC e destes, o mais observado foi o perfil A que parecia estar distribuído por 3 enfermarias, nomeadamente, Neurotraumatologia, Cirurgia III e Unidade de Transplantes Hepáticos. Os outros sete perfis correspondiam a isolados dos CHC e o padrão H foi o predominante mostrando estar disseminado em diferentes enfermarias do Hospital Pediátrico. Não se observaram padrões iguais entre os dois hospitais.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenemos; imipenemo; metalo- $\beta$ -lactamases; VIM



## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a major cause of nosocomial infections as it is an opportunistic human pathogen that shows an amazing capacity to resist antibiotics; either intrinsically or following acquisition of resistance genes. Acquired metallo- $\beta$ -lactamases can confer broad-spectrum  $\beta$ -lactam resistance, especially carbapenems, not reversible by conventional  $\beta$ -lactamase inhibitors and are emerging resistance determinants of remarkable clinical importance. Clinical *P. aeruginosa* isolates producing IMP and VIM metallo- $\beta$ -lactam enzymes are reported worldwide, while SPM-1 and GIM have only been described in Brazil and Germany, respectively. Moreover, the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases enzymes (ESBLs), that confere resistance to at least extended spectrum cephalosporins have been described in *P. aeruginosa*. TEM, SHV, PER, VEB and GES enzymes have been isolated in *P. aeruginosa* strains and are responsible for some nosocomial outbreaks.

Between June 2007 and June 2008, 236 *P. aeruginosa* isolates were collected from Centro Hospitalar de Coimbra (CHC) and 104 were selected because of their resistance to imipenem by the system MicroScan WalkAway. Also, 31 imipenem resistant isolates, from Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), collected in the first semester of 2008, were studied. All of the 104 isolates were submitted to Kirby-Bauer test and 91 (87.5%) proved to be resistant to imipenem. The susceptibilities of those isolates were: 23.1% to meropenem, 76.9% to cefepime, 79.1% to ceftazidime; 70.3% to piperacilin; 34.1% to aztreonam; 25.3% to ciprofloxacin and 96.7% to ampicillin. 135 isolates (104 from CHC and 31 from HUC) were tested, phenotypically, to detect the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases that was not observed in none of them. Initially, imipenem resistant *P. aeruginosa* isolates (n=122) were screened for the presence of metallo- $\beta$ -lactamases by a double-disk test. Fifty (41%) revealed positive phenotypic test and of these, 27 (54%) demonstrated the presence of *bla*<sub>VIM</sub>. The others metallo- $\beta$ -lactamases tested were not observed. Sequencing confirmed the presence of VIM-2 enzyme in the 27 isolates.

Among these strains that harboured VIM-2, MICs were determined and the results revealed that aztreonam inhibited 81.5% followed by piperaciline 66.7%, ceftazidime 25.9% and meropenem 22.2%. Eleven class 1 integrons were found in the VIM-2 producers.

RAPD typing of the *bla*<sub>VIM-2</sub> positive isolates showed fourteen distinct patterns (A to O). Seven were from HUC and the most prevalent was pattern A that appeared to be spread in 3 wards, namely Neurotraumatology, Surgery III and Hepatic Transplants Unit. Other seven patterns that to CHC isolates whereas the H pattern was predominant and was disseminated in the different wards of Paediatric Hospital. Identical RAPD fingerprints between the two hospitals were not seen.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenems; imipenem; metallo- $\beta$ -lactamases; VIM



# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1. NOTA INTRODUTÓRIA - ÂMBITO DO TRABALHO</b> .....	<b>25</b>
<b>2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - O BACILO</b> .....	<b>25</b>
<b>3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – PATOGENICO NOSOCOMIAL</b> .....	<b>26</b>
<b>4. TRATAMENTO E CONTROLO DE INFECÇÕES</b> .....	<b>27</b>
4.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	28
4.1.1. Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	29
4.1.2. Carbapenemos.....	29
<b>5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos.....	31
5.1.1. Permeabilidade e Sistemas de Efluxo .....	31
5.1.2. Alteração das “Penicillin-Binding Proteins” (PBPs).....	32
5.2. $\beta$ -LACTAMASES .....	33
5.2.1. Mecanismos de Acção das $\beta$ -lactamases .....	33
5.2.2. Classificação das $\beta$ -Lactamases .....	33
5.2.2.1. $\beta$ -Lactamase Amp C .....	34
5.2.2.3. $\beta$ -Lactamases de Espectro Alargado (ESBL).....	35
5.2.2.4. Metalo- $\beta$ -lactamases .....	36
5.2.2.4.1. Metalo- $\beta$ -Lactamase IMP .....	37
5.2.2.4.2. Metalo- $\beta$ -Lactamase VIM .....	38
5.2.2.4.3. Metalo- $\beta$ -Lactamase SPM .....	39
5.2.2.4.4. Metalo- $\beta$ -lactamase GIM.....	40
5.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Multiresistência.....	40
<b>6. AMBIENTE GENÉTICO DAS METALO-<math>\beta</math>-LACTAMASES</b> .....	<b>41</b>
6.1. INTEGRÕES .....	41
<b>OBJECTIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>1. RECOLHA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>51</b>
<b>2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> ... ..	<b>51</b>
<b>3. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>52</b>
3.1. Método De Difusão: Técnica De Kirby-Bauer .....	52
3.2. Método de E-Test (Épsilon-Test) .....	53
<b>4. DETECÇÃO DE <math>\beta</math>-LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs)</b> .....	<b>54</b>
4.1. Pesquisa fenotípica .....	54

<b>5. DETECÇÃO DE METALO-<math>\beta</math>-LACTAMASES.....</b>	<b>54</b>
5.1. Pesquisa fenotípica: teste do duplo disco imipenemo-EDTA .....	54
5.2. Pesquisa Genotípica .....	55
5.2.1. Extração de DNA Total.....	55
5.2.2. Amplificação de genes por PCR .....	56
5.2.2.1. Electroforese para detecção de amplicões .....	58
<b>6. PESQUISA DE INTEGRÕES DE CLASSES 1.....</b>	<b>59</b>
<b>7. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR .....</b>	<b>59</b>
<b>8. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DE DNA .....</b>	<b>59</b>
<b>9. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)60</b>	
9.1. RAPD.....	60
9.2. Electroforese dos Produtos Amplificados por RAPD .....	60
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>2. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DOS CHC .....</b>	<b>66</b>
<b>3. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS RESISTENTES AO IMPENEMO .....</b>	<b>68</b>
<b>4. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE <math>\beta</math>-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO (ESBLs) .....</b>	<b>69</b>
<b>5. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-<math>\beta</math>-LACTAMASES .....</b>	<b>70</b>
5.1. Pesquisa Fenotípica: Teste Do Duplo Disco IMIPENEMO-EDTA .....	70
5.2. Pesquisa Genotípica: Detecção de Genes <i>bla</i> por PCR.....	71
5.3. Relação entre teste fenotípico e teste genotípico de detecção de <i>bla</i> <sub>VIM</sub> .....	71
<b>6. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO POR PCR .....</b>	<b>72</b>
<b>7. DETERMINAÇÃO DAS CMIs DOS ISOLADOS PRODUTORES DE VIM-2 .....</b>	<b>72</b>
<b>8. DETECÇÃO DE INTEGRÕES DE CLASSE 1 .....</b>	<b>75</b>
<b>9. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD .....</b>	<b>75</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>81</b>
2.1. Multiresistência.....	83
2.2. Inconsistência dos métodos semi-automáticos.....	84
<b>3. DETECÇÃO DE <math>\beta</math>-LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs) .....</b>	<b>85</b>
<b>4. METALO-<math>\beta</math>-LACTAMASES.....</b>	<b>86</b>
4.1. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 .....	87

4.2. Susceptibilidade dos Isolados Produtores de VIM-2.....	89
<b>5. INTEGRÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>6. RAPD .....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>



## ÍNDICE de FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenemos (adaptado de Sousa J.C., 2001) Pag. 29
- Figura 2.** Estrutura química dos carbapenemos: imipenemo; meropenemo; ertapenemo e doripenemo. (adaptado de Zahnel et al., 2007) Pag. 30
- Figura 3.** Distribuição (%) dos isolados clínicos (n=236) por produtos biológicos provenientes do CHC. Pag. 65
- Figura 4.** Distribuição (%) dos isolados clínicos (n=31) por produtos biológicos provenientes dos HUC. Pag. 66
- Figura 5.** Frequência de susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos em isolados clínicos (n=236) de *P. aeruginosa* colhidos entre Abril de 2007 e 2008, no CHC. Pag. 67
- Figura 6.** Comparação da susceptibilidade (%) aos agentes antimicrobianos de isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* entre o período 2003 e 2006 e entre Abril de 2007 e 2008. Pag. 68
- Figura 7.** Teste do duplo disco imipenemo-EDTA mostrando o efeito inibitório do crescimento do isolado de *P. aeruginosa* (nº MD2526, dos HUC) provocado pela adição de 10  $\mu$ l de EDTA (750  $\mu$ g/ml) aos discos de Imipenemo e de Meropenemo. Pag. 70
- Figura 8.** Separação electroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para a detecção do gene *bla*<sub>VIM</sub>. Pag. 71
- Figura 9.** Separação electroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para detecção de integrões de classes 1. Pag. 75
- Figura 10.** Perfis de RAPD de 25 isolados clínicos de *P. aeruginosa* *bla*<sub>VIM-2</sub> positivos, obtidos com o *primer* 272 Pag. 78



## ÍNDICE de QUADROS

- Quadro 1.** *Primers* utilizados na detecção de genes de metalo- $\beta$ -lactamases. Pag. 57
- Quadro 2.** Ciclos de amplificação utilizados na pesquisa de genes de metalo- $\beta$ -lactamases. Pag. 58
- Quadro 3.** Comparação das susceptibilidades obtidas aos antibióticos cefepima; aztreonamo, ciprofloxacina, ampicacina, ceftazidima, piperacilina, meropenemo e imipenemo, pelos métodos de Kirby-Bauer e semi-automático do equipamento MicroScan WalkAway, das estirpes resistentes ao imipenemo (n=104). Pag. 69
- Quadro 4.** Relação entre a diferença dos diâmetros dos halos de inibição dos isolados positivos pelo teste do duplo disco imipenemo-EDTA e dos isolados que revelaram a presença de *bla*<sub>VIM</sub>. Pag. 72
- Quadro 5.** Concentração mínima inibitória dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina) de 27 isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamases VIM-2. Pag. 74
- Quadro 6.** Isolados Clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamases VIM-2, respectiva Unidade de Internamento e perfil RAPD. Pag. 77



## ABREVIATURAS

°C –Graus Célcius

CHC – Centro Hospitalar de Coimbra

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração mínima inibitória

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

E-Test – Epsilon Test

ESBL -  $\beta$ -lactamases de espectro alargado

GIM-1 – German Imipenemase

HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra

IMP – Imipenemase

kb - kilobases

ml - mililitro

NNIS – National Nosocomial Infection Surveillance System

nº - número

pb – pares de bases

PBP – Penicilin binding protein

PCR – Polimerase Chain Reaction

q.b.p. – quanto baste para

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

SPM-1 – São Paulo Imipenemase

T - Temperatura

V - Volt

VIM – Verona Imipenemase

VPP – Valor Preditivo Positivo

$\mu$ g – micrograma

$\mu$ l – microlitro

$\mu$ M – micraMolar



## INTRODUÇÃO

---



## 1. NOTA INTRODUTÓRIA - ÂMBITO DO TRABALHO

A resistência a antibióticos tem surgido como um problema emergente de saúde pública, em todo o mundo, uma vez que a velocidade de desenvolvimento e a introdução no mercado de novos fármacos têm sido superados pelo aperfeiçoamento dos mecanismos de resistência bacterianos (Murphy R., 2001).

As infecções nosocomiais são uma importante fonte de morbidade e mortalidade dos doentes hospitalares. O aumento das infecções adquiridas com agentes patogénicos multi-resistentes representa um grave problema em doentes hospitalizados. Têm sido citados vários factores para aquisição de uma infecção hospitalar, tais como a presença de condições subjacentes (diabetes, doença renal ou doença oncológica), longos períodos de hospitalização, procedimentos cirúrgicos, prévia antibioterapia e presença de cateteres invasivos (Singh *et al.*, 2006).

Há cerca de 50 anos atrás *Pseudomonas aeruginosa* era, raramente, considerada como um agente patogénico. Nos anos setenta, foi reconhecida como um microrganismo associado a bacteriémia em doentes neutropénicos. Hoje em dia, é uma das bactérias mais frequentes e envolvidas em infecções nosocomiais. (Giamarellou H., 2002)

A vigilância da susceptibilidade de *P. aeruginosa* é de particular importância devido ao grande número de casos em que se tem de recorrer à terapêutica empírica e à elevada falência desta resultante da capacidade de multi-resistência deste microrganismo (Rossolini & Mantengoli, 2005).

As infecções por *P. aeruginosa* são, na generalidade, de tratamento difícil e o grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em especial os carbapenemos, tornou-se uma classe bastante eficaz contra estes microrganismos, na década de noventa. No entanto, estes bacilos de Gram-negativo, depressa desenvolveram mecanismos de resistência a estes fármacos e entre eles, a produção de metalo- $\beta$ -lactamases é dos mais importantes devido ao seu potencial de rápida disseminação (Laupland *et al.*, 2005; Zavascki *et al.*, 2005).

## 2. *Pseudomonas aeruginosa* - O BACILO

*Pseudomonas aeruginosa* pertence à família *Pseudomonadaceae* e ao género *Pseudomonas* (Ferreira W., Sousa J.C, 2000).

Os membros da família *Pseudomonadaceae* caracterizam-se por serem bacilos de Gram-negativo, a maioria deles móveis, devido a um ou mais flagelos polares. Utilizam a glicose e outros hidratos de carbono oxidativamente e são, em geral, citocromo-oxidase positiva (Rossolini & Mantengoli, 2005).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é ubiqüitária e na maioria das vezes inócua, podendo ser isolada a partir de águas, do solo, de plantas, de esgotos e de ambientes húmidos onde vive livremente como saprófita. (Ferreira W., Sousa J.C, 2000). Tem necessidades nutricionais mínimas e é capaz de utilizar diversos compostos orgânicos no seu crescimento. (Rossolini & Mantengoli, 2005).

Segundo a classificação de Gilardi, baseada em características fenotípicas, a *P. aeruginosa* pertence ao grupo Fluorescente. Este microrganismo distingue-se pela produção de pigmentos solúveis em água, a pioverdina e a piocianina, que atribuem, às colónias um aspecto azul esverdeado muito característico. Algumas estirpes de *P. aeruginosa* podem produzir pigmentos de outras cores: piorubina (pigmento de cor vermelha) e piomelanina (pigmento de cor castanha). Contudo há algumas estirpes de *P. aeruginosa* que não produzem pigmentos de forma visível, como, as de doentes com fibrose quística cujas colónias se mostram mucosas, isoladas e sem cor. As colónias são, em geral, grandes e podem ser secas ou mucosas e apresentar-se espalhadas e com brilho metálico. O odor é, também, uma boa forma de as identificar mas, nem sempre está presente. Existem outras características que ajudam na identificação de estirpes não produtoras de pigmento nem de odor: o crescimento a 42°C, a alcalinização da acetamida, a desnitrificação de nitratos e nitritos e azoto e a mobilidade através do seu flagelo polar único (Koneman *et al.*, 1997).

O genoma de *P. aeruginosa* está entre os maiores do mundo procariótico e codifica um grande número de proteínas envolvidas na regulação, transporte e virulência que explicam a sua versatilidade e capacidade adaptativa. O genoma é bastante flexível com 10% dos genes variáveis organizados em “ilhas genómicas”. O tamanho e a complexidade daquele são, talvez, a base para que a *P. aeruginosa* seja bem sucedida em ambientes diversos e infectar, facilmente, uma grande variedade de locais orgânicos e resistir a um elevado número de agentes anitimicrobianos (Mesaros *et al.*, 2007).

### **3. *Pseudomonas aeruginosa* – PATOGÉNICO NOSOCOMIAL**

*P. aeruginosa* tem sido reconhecida como um emergente patogénico oportunista de grande relevância clínica.

Alguns estudos epidemiológicos consideram-na um patogénico nosocomial e indicam que a resistência a antibióticos em isolados clínicos tem vindo a aumentar. Sendo um microrganismo oportunista, ele explora qualquer oportunidade que haja nas defesas do hospedeiro para iniciar a infecção. Além disso, os seus mecanismos de infecção, virulência [entre os quais, lipopolissacarídeos (LPS), exotoxina A, leucocidina, alginato, proteases e fosfolipases] e resistência, fazem dele um microrganismo capaz de colonizar e infectar doentes hospitalizados e imunodeprimidos (Driscoll *et al.*, 2007; Koneman *et al.*, 1997).

Os principais reservatórios hospitalares de *P. aeruginosa* incluem equipamentos respiratórios, como ventiladores, suportes de sabões e antisépticos, lavatórios, torneiras, tubos de ar, piscinas de fisioterapia e hidroterapia (Giamarellou H., 2002).

#### 4. TRATAMENTO E CONTROLO DE INFECÇÕES

A prevenção é imperativa no controlo de infecções por *P. aeruginosa*. Na literatura médica abundam relatos de surtos de infecções nosocomiais por esta bactéria, em alguns casos, atribuídos ao pessoal hospitalar que se torna portador crónico do bacilo. As directrizes das boas práticas para prevenção da infecção nosocomial são bem aceites (mas nem sempre cumpridas) e incluem vigilância, em particular, das infecções em Unidades de Cuidados Intensivos e infecções hospitalares de um modo geral, para identificar agentes patogénicos multi-resistentes, novos e endémicos e poder tomar as devidas precauções. O isolamento do doente infectado, a desinfecção das mãos antes e após a observação de cada doente, o emprego de técnicas estéreis na colocação de catéteres vasculares e urinários e evitar o seu uso prolongado, o correcto posicionamento dos doentes com ventilação mecânica e a extubação destes o mais cedo possível, a opção preferencial pela intubação orotraqueal e alimentação orogástrica em detrimento dos processos nasotraqueal e nasogástrico, são medidas que podem ajudar a prevenir os surtos de infecções nosocomiais (Driscoll *et al.*, 2007).

Do conjunto de antibióticos disponíveis para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* fazem parte os seguintes  $\beta$ -lactâmicos: ticarcilina e piperacilina, ceftazidima, cefepima, aztreonam, carbapenemos; os aminoglicosídeos e as quinolonas. Não existem, neste momento, perspectivas de num futuro próximo, surgirem novos antibióticos eficazes contra *P. aeruginosa* multi-resistentes o que justifica a exigência de vigilância apertada e a constante actualização das estirpes de cada hospital (Giamarellou H., 2002).

Como a infecção por *P. aeruginosa* pode ser letal, a implementação precoce de antibioterapia torna-se crucial para travar o desenvolvimento da infecção e a terapêutica

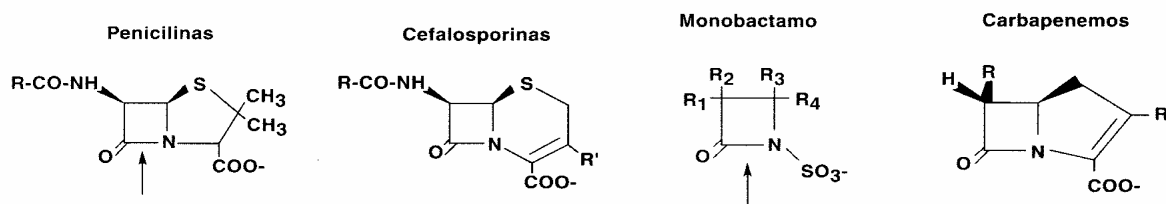
empírica tem que ser, muitas vezes, iniciada antes dos resultados dos antibiogramas estarem prontos. Para a selecção do tratamento empírico, devem ser considerados vários aspectos como a origem da infecção (nosocomial ou da comunidade), a informação existente sobre a epidemiologia da resistência dos fenótipos, os parâmetros farmacocinéticos, os factores de risco subjacentes (período de hospitalização, admissões em UCIs, antibioterapia prévia) e doenças crónicas e as políticas hospitalares de prescrição (Rossolini & Mantengoli, 2005).

A monoterapia antibiótica é a mais recomendada no tratamento de infecções urinárias simples. Em infecções do tracto urinário superior com complicações e formação de abscessos, ou infecções em doentes neutropénicos ou ainda, sempre que haja suspeita de bacteriémia a monoterapia não é aconselhada tendo que ser avaliado caso a caso. Por outro lado, a combinação de pelo menos dois antibióticos anti-pseudomonas, é indicada no tratamento de infecções severas por *P. aeruginosa*, como sejam pneumonia nosocomial ou bacteriémia. A combinação racional da terapêutica é essencial para reduzir as hipóteses de selecção de mutantes resistentes durante o tratamento, assim como para poder explorar a potencial actividade sinérgica de alguns agentes antimicrobianos. A combinação preferida continua a ser a de aminoglicosídeos com β-lactâmicos (Rossolini & Mantengoli, 2005).

Nos doentes com fibrose quística são aconselhados tratamentos agressivos nos episódios iniciais de colonização, para protelar o estabelecimento de infecção crónica por *P. aeruginosa* e a administração, em intervalos regulares, de antibióticos anti-pseudomonas para melhorar a sobrevivência e aumentar a qualidade de vida, após o desenvolvimento de infecção crónica por *P. aeruginosa* (Rossolini & Mantengoli, 2005).

#### **4.1. Antibióticos β-lactâmicos**

Os antibióticos β-lactâmicos constituem o grupo mais amplo e mais utilizado na prática clínica, tanto em meio hospitalar como em ambulatório. Caracterizam-se por apresentar, na sua molécula, um anel β-lactâmico que é uma estrutura heterocíclica de quatro átomos (três de carbono e um de azoto) com uma ligação amida. Em função das características estruturais da cadeia lateral (figura 1), os β-lactâmicos são classificados em penicilinas, cefalosporinas, monobactamos e carbapenemos. Os seus espectros de actividade e farmacocinética dependem da estrutura química do anel principal e estão em relação directa com os substituintes ou cadeias laterais que apresentam (Sousa J.C., 2001).



**Figura 1.** Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactamos e carbapenemos (Adaptado de Sousa J.C., 2001).

#### 4.1.1. Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos partilham o mesmo mecanismo de acção, bloqueando a fase final da síntese do peptidoglicano que assegura a integridade da parede celular bacteriana. Os  $\beta$ -lactâmicos inibem, em maior ou menor grau, as enzimas transpeptidases, carboxipeptidases, e indirectamente as transglicosidases que participam na formação, manutenção e regulação da matriz do peptidoglicano. Estas enzimas denominam-se por *Penicilin Binding Proteins* (PBPs) e localizam-se na superfície da membrana citoplasmática. (Anglada R., 1997). A ligação do  $\beta$ -lactâmico às PBPs impede a bactéria de completar a transpeptidação das ligações do peptidoglicano, evitando a síntese de uma parede celular intacta. (Zahnel *et al.*, 2007).

A analogia estrutural entre a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico e a ligação peptídica D-alanil-D-alanina justifica a afinidade do antibiótico para as PBPs. A inibição da PBP-1 provoca a lise celular enquanto que a inibição da PBP-2 forma esferoplastos ou seja, uma modificação conformacional da parede celular. (Sousa J.C., 2001).

#### 4.1.2. Carbapenemos

Os carbapenemos diferem das penicilinas no anel que contem uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3, e o átomo de enxofre que é substituído por um carbono, na posição 1. (Zahnel *et al.*, 2007).

O primeiro carbapenemo a ser descoberto foi a tienamicina, nos anos setenta, produzido a partir do microrganismo *Streptomyces cattleya*. A instabilidade desta molécula levou ao desenvolvimento de um novo derivado, o imipenemo. Contudo, este antibiótico é sujeito à degradação enzimática da dehidropeptidase (DHP-1) renal e para ser usado na

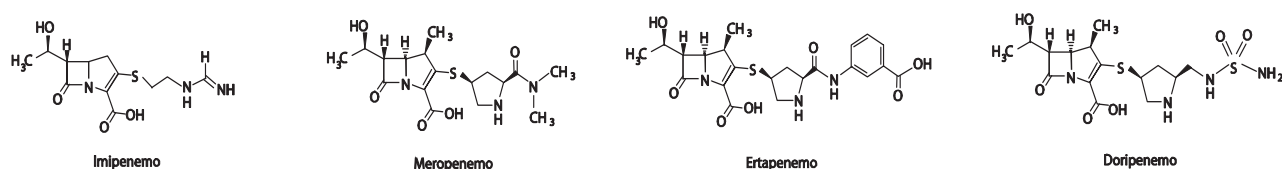
prática clínica tem que ser administrado em conjunto com a cilastatina, que é uma molécula inibidora daquela enzima. A acção da cilastatina estende-se também, à prevenção da nefrotoxicidade provocada pelo imipenemo, quando administrado sozinho.

O meropenemo surgiu depois, tendo a vantagem de não ser degradado pela DHP-1 e ser uma molécula mais estável. Mas, tanto o imipenemo como o meropenemo têm tempos de semi-vida curtos, exigindo múltiplas administrações diárias.

O ertapenemo foi desenvolvido de modo a ter tempos de semi vida mais longos o que resulta numa única administração diária do antibiótico. No entanto, a sua actividade contra *P. aeruginosa* é escassa e, por isso, não faz parte deste estudo. (Saha & Isaacs, 2003; Zahnel *et al.*, 2007)

O doripenemo é o mais novo dos carbapenemos, sendo bastante promissor como alternativa terapêutica no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa* multiresistente. (Zahnel *et al.*, 2007). Foi aprovado no fim de 2007 nos Estados Unidos, para tratamento de pneumonias nosocomiais, de infecções abdominais graves e infecções complicadas do tracto urinário. No Japão é também autorizada a sua utilização como agente isolado no tratamento de várias infecções complicadas. (Baldwin *et al.*, 2008; Keam S.J., 2008). A sua autorização, para ser usado na União Europeia, data de 25 de Julho de 2008. (European Medicines Authority, 2008)

Os carbapenemos são os β-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 β-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-β-lactamases (Peleg *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Estrutura química dos carbapenemos: imipenemo; meropenemo; ertapenemo e doripenemo (Adaptado de Zahnel *et al.*, 2007).

## 5. *Pseudomonas aeruginosa* - RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos pode ser definida como a capacidade de uma estirpe crescer numa concentração de antimicrobiano elevada em comparação com outras filogeneticamente relacionadas (Aarestrup, 2006).

É de consenso geral que existe um aumento de resistência às quinolonas e aos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro, por parte de bactérias da família das *Enterobacteriaceae* e de *Acinetobacter spp.* e que, a escolha de antibióticos para erradicação de infecções por *P. aeruginosa* se torna cada vez mais limitada (Walsh *et al.*, 2005).

### 5.1. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos com actividade anti-pseudomonas incluem penicilinas (carbenicilina, ticarcilina, piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepima), monobactâmicos (aztreonam) e carbapenemos (imipenem e meropenem) embora o aumento das resistências seja um problema cada vez mais premente. (White G. *et al.*, 2005).

A produção de  $\beta$ -lactamases com acção hidrolítica sobre os  $\beta$ -lactâmicos é uma das principais causas de resistência embora, o efluxo de fármacos ou a reduzida permeabilidade da membrana externa sejam, também, importantes mecanismos de resistência dos microrganismos de Gram-negativo (White G. *et al.*, 2005).

#### 5.1.1. Permeabilidade e Sistemas de Efluxo

Apesar das  $\beta$ -lactamases serem a causa mais prevalente da resistência a  $\beta$ -lactâmicos, em *P. aeruginosa* a resistência não enzimática a estes agentes tem sido descrita e parece envolver impermeabilidade e ou efluxo. De facto, vários sistemas de efluxo multi fármacos do tipo RND (“Resistance-Nodulation-Division”) que primeiro foram implicados na resistência a fluoroquinolonas vieram, também, a ser responsáveis pela resistência a  $\beta$ -lactâmicos (Schweizer, 2003).

A resistência intrínseca a múltiplos fármacos é causada pela sinergia entre a baixa permeabilidade da membrana externa e a expressão de um sistema de efluxo específico de multi fármacos [“multidrug efflux (Mex) system”] mediado sobretudo pelo sistema MexA-MexB-OprM. A proteína MexB é uma bomba de largo espectro localizada na membrana citoplasmática, a proteína OprM é uma proteína formadora de poro que proporciona uma

porta de saída através da membrana externa e a proteína MexA liga, fisicamente, aqueles dois componentes (Livermore, 2001; Schweizer, 2003; White G., 2005).

Mutações que levam à sobre-regulação dos sistemas de efluxo (MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN e MexX-MexY-OprM) podem resultar numa diminuição de susceptibilidade ou numa resistência a todos os β-lactâmicos anti-pseudomonas (dependendo do sistema de efluxo, do nível de regulação e do composto) (Livermore, 2001).

A sobre-regulação do sistema MexA-MexB-OprM é causada por mutações no gene *nalB*, no locus *mexR*, aumentando as concentrações mínimas inibitórias das penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclinas e cloranfenicol, excepto as do imipenemo. A falta de actividade contra o imipenemo pode ser devida à sua estrutura orgânica, por não ter um anel fenílico, lipofílico ou uma cadeia lateral heterocíclica (Livermore, 2001; Schweizer, 2003; White G., 2005).

Os sistemas de efluxo MexC-MexD-OprJ e MexE-MexF-OprN, quando a sua sobre-regulação está activa, são responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas e a alguns β-lactâmicos. A sobre-regulação do sistema MexXY-OprM afecta, também, os aminoglicosídeos (Livermore, 2001).

Por outro lado, o sistema MexE-MexF-OprN, não efluxa β-lactâmicos, mas, a sua sobre-regulação afecta indirectamente a susceptibilidade aos carbapenemos devido à concomitante sub-regulação do OprD (Rossolini & Mantengoli, 2005).

O principal mecanismo de resistência ao imipenemo, em *P. aeruginosa*, é a perda mutacional da porina (devido a deleções, substituições ou inserções que causam inactivação do gene *oprD*) de 54 kD, OprD que implica também redução da susceptibilidade ao meropenemo, mas não tem efeito noutros β-lactâmicos, que não utilizem os canais OprD (Livermore & Woodford, 2000).

A reduzida expressão de OprF tem só um efeito ligeiro nas concentrações mínimas inibitórias dos β-lactâmicos e das fluoroquinolonas (Livermore, 2002).

### **5.1.2. Alteração das “Penicillin-Binding Proteins” (PBPs)**

A alteração das PBPs está, associada a resistências devido à dificuldade da ligação dos antibióticos β-lactâmicos àquelas proteínas. As PBPs variam de espécie para espécie, em número, tamanho e afinidade para os antibióticos β-lactâmicos (Aarestrup, 2006).

Em *P. aeruginosa*, o imipenemo apresenta elevada afinidade para a PBP-2 enquanto que o meropenemo tem afinidade para a PBP-3. Assim, a alteração das PBPs contribui

para uma elevada resistência aos carbapenemos visto que aquelas são o ponto crucial de ligação destes antibióticos às bactérias, de modo a inibir a síntese do peptidoglicano, componente essencial da parede celular (Zahanel *et al.*, 2007).

## 5.2. $\beta$ -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*. (Mesaros *et al.*, 2007; Rasmussen & Høiby, 2006). Estas enzimas constituem um dos maiores êxitos estratégicos dos microrganismos no seu esforço em neutralizar o efeito dos antibióticos desenvolvidos pelo Homem. (Anglada R., 1997)

### 5.2.1. Mecanismos de Acção das $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, originando compostos sem eficácia anti-bacteriana (Anglada R., 1997).

As  $\beta$ -lactamases das bactérias de Gram-negativo localizam-se no espaço periplásmico e inactivam o antibiótico  $\beta$ -lactâmico logo que este atravessa a membrana externa (Anglada, 1997; Livermore D., 1995)

O mecanismo de acção hidrolítico das  $\beta$ -lactamases consiste na formação de uma ligação éster entre o seu centro activo de serina e o anel  $\beta$ -lactâmico, do antibiótico. No entanto, algumas enzimas utilizam os iões zinco do centro activo para romper o anel  $\beta$ -lactâmico, sendo denominadas por metalo-enzimas (Livermore, 1995; Queenan & Bush; 2007).

### 5.2.2. Classificação das $\beta$ -Lactamases

A classificação das  $\beta$ -lactamases tem sido dificultada pela sua grande diversidade, pelas suas características e pelo constante aparecimento de novas enzimas. Assim, foram propostas várias classificações, umas baseadas nas características cinéticas e bioquímicas das enzimas e outras com base molecular.

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

A classificação molecular das β-lactamases foi proposta por Ambler (1980) quando apenas se conheciam quatro sequências de aminoácidos daquelas enzimas. Só existia uma classe de enzimas com centro activo de serina, as β-lactamases de classe A, que incluía a penicilinase PC1 de *Staphylococcus aureus*. A classe B era constituída pela metalo-β-lactamase do *Bacillus cereus*. Posteriormente, esta classificação foi completada com a inclusão de cefalosporinas, de Classe C (Jaurin & Grundstrom, 1981) e de oxacilinas, de Classe D (Ouellette *et al.*, 1987; Houvinen *et al.*, 1988).

As classes moleculares A, C e D compreendem distintos grupos de enzimas, mas todas apresentam um centro activo de serina, enquanto que a classe B inclui as metalo-β-lactamases cujo centro activo contem iões de zinco (Livermore D., 1995; Paterson & Bonomo, 2005).

A classificação 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 β-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. Os quatro grupos funcionais de enzimas, definidos pelos perfis de substratos e inibidores são: o grupo 1; o grupo 2 que se subdivide em 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e e 2f; o grupo 3 e o grupo 4 (Bush *et al.*, 1995).

Na globalidade, existe uma boa correspondência entre as classes definidas na classificação fenotípica de Bush-Jacoby-Medeiros e as reconhecidas no esquema molecular da classificação de Ambler (Livermore D., 1995).

Actualmente classificam-se as β-lactamases de acordo com a sua sequência nucleotídica em 4 classes moleculares: A, B, C e D (Bush *et al.*, 1995; Livermore D., 1995).

#### **5.2.2.1. β-Lactamase Amp C**

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

A enzima AmpC, em elevadas concentrações, hidrolisa a maioria dos antibióticos β-lactâmicos excepto os carbapenemos e, por vezes, as cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração.

Contudo, a AmpC presente na maioria das *P. aeruginosa* tem uma fraca acção hidrolisante sobre as carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina) embora, a resistência aos antibióticos dependa da sua expressão. Assim, se o nível de expressão for elevado observa-se resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos excepto aos carbapenemos. Como em outras bactérias de Gram-negativo, a enzima AmpC de *P. aeruginosa* é induzida por muitos substratos  $\beta$ -lactâmicos embora, os considerados, anti-pseudomonas (aztreonamo, ceftazidima, cefepima, piperacilina) tenham uma fraca actividade indutiva. Apesar dos carbapenemos serem bons indutores desta enzima, a sua rápida acção bactericida e estabilidade à hidrólise da AmpC torna-os efectivos contra *P. aeruginosa*. Assim, quando a resistência a  $\beta$ -lactâmicos é mediada pela AmpC, esta resulta de uma mutação no gene, que potencia a sua produção (White *et al.*, 2005).

A expressão do gene *ampC* está sob controlo do regulador AmpR e da actividade AmpD. O primeiro parece reprimir a expressão de *ampC* na ausência de indutores e activá-la quando estes estão presentes e o segundo é uma amidase citosólica que, sofrendo mutações no seu gene, proporciona um incremento de produção de AmpC independente da presença de indutores (Rossolini & Mantengolli, 2005).

A produção de AmpC é o determinante primário da resistência  $\beta$ -lactâmica em *P. aeruginosa* sendo o maior responsável pela resistência a cefalosporinas anti-pseudomonas (ceftazidima e cefotaxima). Apesar da sua fraca actividade contra carboxipenicilinas, parece ser, também, um contributo importante para a resistência à ticarcilina (White G. *et al.*, 2005).

### 5.2.2.3. $\beta$ -Lactamases de Espectro Alargado (ESBL)

As  $\beta$ -lactamases de espectro alargado com actividade hidrolítica sobre os  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro (como o cefotaxima e a ceftazidima) não são comuns em *P. aeruginosa* e as que foram encontradas, até agora, localizam-se em áreas geográficas muito específicas.

As ESBL incluem as enzimas clássicas de classe A, TEM e SHV, que são cada vez mais frequentes em *Enterobacteriaceae*; as de classe D, OXA, isoladas, principalmente em *P. aeruginosa* e as menos comuns VEB, PER, IBC e GES (também pertencentes à classe A). Estas ESBLs são importantes devido à sua habilidade para promover resistência às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações, assim como, às ureidopenicilinas (piperacilina) e carboxipenicilinas (ticarcilina) e ao aztreonamo. ESBLs em *P. aeruginosa* podem estar

codificadas no cromossoma, em plasmídeos, e algumas vezes em integrões que transportam, outros genes de resistência (White G. *et al.*, 2005).

#### **5.2.2.4. Metalo-β-lactamases**

As metalo-β-lactamases são enzimas da classe B de Ambler (Ambler, 1980) e pertencem ao grupo 3 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995)

Esta classe de β-lactamases caracteriza-se pela habilidade em hidrolisar carbapenemos, pela sua resistência aos inibidores de β-lactamases comercialmente disponíveis (ácido clavulânico e tazobactam) mas, também, pela sua susceptibilidade aos quelantes de metais, como o EDTA. (Queenan & Bush, 2007).

Além dos carbapenemos, as metalo-β-lactamases hidrolisam maioria dos β-lactâmicos com excepção dos monobactâmicos, cujo representante é o aztreonamo. (Queenan & Bush, 2007).

O mecanismo de hidrólise é dependente da interacção dos β-lactâmicos com os iões zinco existentes no centro activo destas enzimas. Aqueles iões funcionam como cofactor para a actividade catalítica, pois coordenam moléculas de água que servem de nucleófilos, hidrolisando a ligação amida cíclica do anel β-lactâmico e inactivando, desta forma, o antibiótico (Queenan & Bush, 2007).

As primeiras metalo-β-lactamases detectadas e estudadas foram enzimas cromossómicas presentes no meio ambiente e em bactérias patogénicas oportunistas como *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* e *Stenotrophomonas maltophilia*. (Queenan & Bush, 2007). No entanto, a primeira metalo-β-lactamase a ser identificada em *P. aeruginosa* foi em 1990, no Japão, por Watanabe (Watanabe *et al.*, 1991). Posteriormente, novos genes que codificam estas enzimas têm sido detectados em isolados clínicos importantes, nos géneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e na família *Enterobacteriaceae* (Peleg *et al.*, 2005).

Neste momento, em *P. aeruginosa*, existem quatro metaloenzimas descritas: IMP, **I**mipenemase (Watanabe *et al.*, 1991); VIM, **V**erona imipenemase (Lauretti *et al.*, 1999); SPM, **S**ão **P**aulo metalo-β-lactamase (Toleman *et al.*, 2002) e GIM, **G**erman imipenemase (Castanheira *et al.*, 2004).

Recentemente, na Coreia, foi detectada uma nova metalo-β-lactamase, SIM-1, num isolado de *Acinetobacter baumannii* (Lee *et al.*, 2005).

As metalo-β-lactamases IMP e VIM apresentam uma grande distribuição geográfica, sendo mais frequentes, a primeira no Sudoeste Asiático e a segunda na Europa. A

metaloenzima SPM-1 tem-se mantido limitada ao Brasil, e não apareceram, ainda, descrições de presença de GIM-1 fora da Alemanha.

#### 5.2.2.4.1. Metallo- $\beta$ -Lactamase IMP

A enzima IMP foi descrita, pela primeira vez, por Watanabe e colaboradores, em 1991, no Japão, sendo proveniente de um isolado de *P. aeruginosa* resistente ao imipenemo e cefalosporinas de espectro alargado (Watanabe *et al.*, 1991). Os autores caracterizaram esta enzima mas, nem a sequenciaram nem lhe atribuíram nenhuma denominação. Apesar disso, crê-se que se tratava da IMP-1, que foi, depois, sequenciada e denominada a partir de um isolado de *Serratia marcescens*. (Livermore & Woodford, 2000)

Após a primeira publicação da metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1, foram descritas novas variantes alélicas do gene *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, a *bla*<sub>IMP-24</sub>, identificadas, principalmente, em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Jacoby & Bush, 2008; Walsh *et al.*, 2005).

A enzima IMP encontra-se, disseminada nos países asiáticos em particular, no Japão (Nordmann & Poirel, 2002). Na China há descrições de IMP-1 (Wang & Mi, 2004) e IMP-9 (Nordmann & Poirel, 2002); na Tailândia de IMP-7 (Nordmann & Poirel, 2002); em Singapura, Koh e colaboradores (2004) identificaram a enzima IMP-1 (2004) e na Malásia a IMP-7 é referida por Ho e colaboradores (2002)

Nos Estado Unidos, foi descrito, recentemente, um isolado de *P. aeruginosa* produtor de IMP-15 responsável por uma osteomielite, num doente que, antes, tinha sido internado num hospital mexicano. Além daquela, foi identificada, num outro doente, uma outra estirpe de *P. aeruginosa* produtora de IMP-18, proveniente de Las Cruces, no Novo México (Morita *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2005). Verificou-se, também, um surto de *P. aeruginosa*, produtora de IMP-7, em dois hospitais do Canadá (Walsh *et al.*, 2005).

No Brasil, foram identificadas estirpes portadoras do gene *bla*<sub>IMP-16</sub>. (Mendes *et al.*, 2004) e há um relato de uma *P. aeruginosa*, isolada em Salvador, produtora de IMP-18 (Xavier *et al.*, 2006).

De Itália surgem descrições de estirpes produtoras de IMP-13 (Toleman *et al.*, 2005; Pagani *et al.*, 2005).

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

#### 5.2.2.4.2. Metallo-β-Lactamase VIM

As enzimas VIM pertencem à classe B, de Ambler e foram descritas pela primeira vez, em 1999, a partir de um isolado de *P. aeruginosa*, colhido em 1997, em Verona, em Itália (Livermore & Woodford, 2000).

Actualmente são conhecidas 22 variantes de metalo-β-lactamases do tipo VIM, de VIM-1 a VIM-22, descritas em *P. aeruginosa* e noutras espécies, isoladas sobretudo, na Europa, assim como nos continentes Americano e Asiático, revelando uma ampla distribuição geográfica (Jacoby & Bush, 2008).

A enzima VIM-1 foi também descrita, como sendo responsável por surtos infecciosos em Itália (Cornaglia *et al.*, 2000) e na Grécia (Tsakris *et al.*, 2000).

A metalo-β-lactamase VIM-2, primeira variante da enzima VIM-1, foi identificada em França, a partir de um isolado de *P. aeruginosa*, proveniente de uma hemocultura, de um doente neutropénico, em 1996 (Walsh, 2005).

Em Portugal, Cardoso e colaboradores (1999) descreveram quatro isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo, responsáveis por infecções do tracto respiratório e urinário, em doentes internados no Hospital de Vale de Sousa, no norte de Portugal. Nestes três isolados e num outro, colhido de um doente de ambulatório, foi detectada a metalo-β-lactamase VIM-2 (Cardoso *et al.*, 2002). Mais recentemente, foram descritos isolados clínicos produtores de VIM-2 provenientes de amostras do Centro Hospitalar de Coimbra (Pena *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2008); dos Hospitais da Universidade de Coimbra (Quinteira *et al.*, 2005; Quinteira & Peixe, 2006) e do Hospital Infante D. Pedro, em Aveiro (Carvalho *et al.*, 2005).

Na Europa existem vários estudos que demonstram que a metalo-β-lactamase VIM, sobretudo a VIM-2, está disseminada por vários países. Assim, da Grécia, existem algumas publicações que descrevem surtos de infecções nosocomiais, por isolados, de *P. aeruginosa*, produtores de VIM-2 e VIM-4 (Mavroidi *et al.*, 2000; Giakkoupi *et al.*, 2003; Pournaras *et al.*, 2003). Lagatolla e colaboradores (2004) publicaram um artigo em que compararam estirpes de *P. aeruginosa*, resistentes ao imipenemo, produtoras de VIM-1 e VIM-2, isoladas no Hospital Universitário de Trieste em Itália. Da França existem referências de Poirel e colaboradores (2000 e 2001) e Docquier e colaboradores (2003); da Roménia chega-nos a primeira descrição de *P. aeruginosa* portadoras de gene *bla*<sub>VIM-2</sub>, de isolados recolhidos entre 2003 e 2007, em cinco hospitais, de três cidades, do Norte do país (Mereută *et al.*, 2007). Há também dados publicados da Espanha, em que o primeiro isolado foi anunciado, em 2002, por Prats e colaboradores (Prats *et al.*, 2002; Gutiérrez *et*

*al.*, 2007); da Croácia (Sardélic *et al.*, 2003), da Bélgica (Deplano *et al.*, 2007) e da Polónia (Fielt *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos o primeiro isolado de *P. aeruginosa* produtor de VIM-2, foi descrito por Lolans e colaboradores, em 2005. No entanto, já em 2004, tinha sido publicada a descoberta de um isolado de *P. aeruginosa*, produtor de VIM-7, que se mostrou resistente a todos os antibióticos testados excepto à polimixina B. (Toleman *et al.*, 2004). Em 2007, descreveu-se o isolamento de estirpes produtoras de VIM-2 e VIM-7, também elas resistentes a todos os antibióticos, exceptuando a polimixina B. (Aboufaycal *et al.*, 2007). No Canadá, na região de Calgary, há estudos comparativos de estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2, colhidas em 4 hospitais, um dos quais, pediátrico. (Laupland *et al.*, 2005; Pitout *et al.*, 2007).

A enzima VIM-2 foi pela primeira vez relatada na América Latina (no Chile e na Venezuela), em 2004, a partir de isolados de *Pseudomonas sp.*, só susceptíveis à polimixina B, recolhidos no âmbito do programa SENTRY (Mendes *et al.*, 2004). Também na Colômbia, Villegas e colaboradores (2006) publicaram a primeira detecção de VIM-2 em isolados provenientes de oito hospitais, de seis cidades do país e registaram clonalidade das estirpes em cinco dos oito centros hospitalares (Villegas *et al.*, 2006). Em Cali, tinha sido descrito um surto de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-8, resistentes aos carbapenemos (Crespo *et al.*, 2004). Este ano, 2008, foi caracterizada a metalo- $\beta$ -lactamase VIM-11, na Argentina (Marchiaro *et al.*, 2008).

No Sudoeste Asiático a enzima VIM-2 encontra-se, no Japão (Nishio *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2005), na China (Yu *et al.*, 2006) e na Coreia (Lee *et al.*, 2002).

Há ainda outras variantes da enzima VIM descritas tais como, a VIM-3, na Tailândia (Yan *et al.*, 2001); a VIM-5, na Turquia (Bahar *et al.*, 2004), VIM-9 e VIM-10 no Reino Unido (Walsh *et al.*, 2005).

#### **5.2.2.4.3. Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM**

Toleman e colaboradores (2002) descreveram, identificaram e caracterizaram, uma nova classe de metalo- $\beta$ -lactamase, a SPM-1. Esta foi isolada a partir de uma amostra clínica de *P. aeruginosa*, responsável por uma infecção urinária, num doente, de um hospital de São Paulo, no Brasil.

A sequência desta enzima difere bastante das VIM e IMP tendo-se verificado 35,5% de semelhança com a IMP-1. (Walsh T.R., 2005).

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 de β-lactâmicos de largo espectro, incluindo os carbapenemos (Gales *et al.*, 2003).

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

#### **5.2.2.4.4. Metallo-β-lactamase GIM**

A metallo-β-lactamase GIM-1 foi identificada a partir de cinco isolados clínicos de *P. aeruginosa*, colhidos num hospital de Dusseldorf, na Alemanha (Castanheira *et al.*, 2004). Estes isolados apresentavam resistência aos β-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).

### **5.3. Pseudomonas aeruginosa – Multiresistência**

Estirpes de *P. aeruginosa*, resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, tornaram-se cada vez mais comuns, entre isolados nosocomiais. No programa de vigilância SENTRY, as taxas de multi-resistência (definida como resistência à piperacilina, ceftazidima, imipenemo e gentamicina) encontraram algumas diferenças geográficas, sendo mais elevadas na América Latina (aproximadamente 8%), menores na Europa (cerca de 5%) e ainda mais baixas nos Estados Unidos (< 2%). Dentro do hospital, as maiores taxas de multi-resistências observam-se em Unidades de Cuidados Intensivos, havendo, na generalidade, uma tendência para o aumento daquelas. Assim, a prevalência de isolados multi-resistentes (resistentes pelo menos a três dos seis antibióticos: amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, piperacilina, ceftazidima e imipenemo) aumentou de 13% em

1997 para 21% em 2000, de acordo com os dados de vigilância americanos (Rossolini & Mantengoli, 2005).

O aparecimento de estirpes “pan-resistentes” é um dos problemas mais preocupantes no contexto da resistência a antibióticos, tendo originado a procura de fármacos anti-pseudomonas com mecanismos de acção alternativos, o que resultou no uso das polimixinas, apesar da sua toxicidade (Rossolini & Mantengoli, 2005).

## 6. 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 plasmídeos (Senda, 1996b; Lauretti *et al.*, 1999). Além disso, podem associar-se a integrões (Fluitz & Schmitz, 1999; Rechia & 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 (Poirel *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2005).

### 6.1. INTEGRÕES

Os integrões são definidos como elementos que contêm os determinantes genéticos dos componentes de um sistema de recombinação sítio-específico que reconhece, captura e mobiliza genes, inseridos em elementos móveis designados cassetes genéticas (Fluit & Schmitz, 2004).

Um integrão inclui um gene para uma integrase (*int*) e um para um local de recombinação adjacente (*attI*) reconhecido pela integrase.

As cassetes genéticas não fazem, necessariamente parte do integrão. (Fluit & Schmitz, 2004). Aquelas formam um grupo de pequenos elementos móveis que, entre outros, contêm genes de resistência a antibióticos. De um modo geral, cada cassete, contém um único gene e um local específico de recombinação (Rechia & Hall, 1995).

Podemos dividir os Integrões em dois grandes grupos: os Integrões de Resistência (IR) e os Super Integrões (SI). Os IR transportam, na sua maioria, cassetes genéticas que codificam para a resistência a antibióticos e a alguns desinfetantes e podem estar localizados quer em cromossomas quer em plasmídeos quer em transposões. Os integrões

grandes, localizados nos cromossomas, que contêm cassetes genéticas, com uma grande variedade de funções, pertencem ao grupo dos Super Integrões (Fluit & Schmitz, 2004).

A maioria dos IR pertence à Classe 1 e têm sido descritos em muitos géneros de bactérias de Gram-negativo como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Vibrio* e ***Pseudomonas*** (Fluit & Schmitz, 2004).

Os integrões de Classe 2 estão incluídos na família de transposões *Tn7* que consiste num gene de uma integrase seguido de cassete genética. Estes integrões de classe 2 só foram, ainda, descritos em *Acinetobacter*, *Shigella* e *Salmonella* (Fluit & Schmitz, 2004).

Os integrões de Classe 3 foram relatados em *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* e *Klebsiella pneumoniae*, isolados no Japão, sendo a sua estrutura comparável à dos de Classe 2 (Fluit & Schmitz, 2004).

As cassetes genéticas são, muitas vezes, integradas num local específico de um integrão e podem fazer parte de uma formação múltipla de cassetes. As três classes de integrões têm a capacidade de integrar as cassetes genéticas e estas podem ainda ser encontradas em locais não específicos. Elas movem-se por recombinação conservativa sítio-específica, catalisada por uma integrase localizada no integrão receptor, formando, assim, uma família de elementos móveis que estão aptos a integrar fagos, plasmídeos ou transposões (Rechia & Hall, 1995).

Habitualmente, as cassetes genéticas não incluem um promotor e são transcritas a partir de um promotor do integrão. Este promotor,  $P_{ANT}$ , encontra-se localizado no integrão, a montante do local de inserção das cassetes genéticas (Fluit & Schmitz, 1999; Bennet P., 1999; Rechia & Hall, 1995).

As cassetes genéticas podem, ainda, existir livres, como moléculas covalentes, circulares que são formadas pela sua excisão de um integrão e parecem ser muito importantes como intermediários na disseminação de resistências a antimicrobianos (Rechia & Hall, 1995).

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 *intl1*, o local de recombinação da cassete *att1* e o promotor  $P_{ANT}$  (Fluit & Schmitz, 1999). O segmento 3' conservado (3'-CS) é constituído pelo gene *sul1* que codifica a resistência às sulfonamidas, pelo gene *qacEΔ1* que confere resistência a compostos de amónio quaternário e duas *open reading frames*, *orf5* e *orf6*, que codificam proteínas de função desconhecida (Bennet P., 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 inactivos (Fluit & Schmitz, 1999).

A expressão dos genes de resistência aos antibióticos depende também da posição da cassette genética no integrão, sendo o nível de resistência tanto maior quanto mais próximo a cassette genética se encontrar do P<sub>ANT</sub> e mais reduzido quando a cassette genética se encontrar a jusante de uma ou mais cassetes genéticas (Collis & Hall, 1995).

Quando estes integrões estão associados a plasmídeos ou a transposões, a transferência de material genético é bastante facilitada (Queenan & Bush, 2007). Os integrões de classe 1 foram detectados sobretudo em isolados clínicos de Gram-negativo, incluindo *P. aeruginosa*, associados a cassetes genéticas que expressam a resistência a diversos grupos de antibióticos (Fluit & Schmitz, 2004), nomeadamente aos  $\beta$ -lactâmicos e aos aminoglicosídeos, restringindo as opções terapêuticas (Poirel & Nordmann, 2002; Walsh, 2005).

A transferência da resistência ao imipenemo foi detectada, pela primeira vez, no Japão, em 1990, num isolado de *P. aeruginosa* (Watanabe *et al.*, 1991). A partir desta altura, inúmeros autores têm descrito os genes *bla*<sub>VIM-2</sub> em cassetes genéticas localizadas em integrões de classe 1 (Lolans *et al.*, 2005; Henrichfreise *et al.*, 2005; Quinteira *et al.*, 2005; Quinteira & Peixe, 2006; Gutiérrez, 2007).

A maioria dos genes móveis de metalo- $\beta$ -lactamases é transportada em vários elementos genéticos que contribuem para o seu movimento, de um aparato genético para outro. Os genes que codificam as enzimas IMP, VIM e GIM-1 são encontrados em cassetes genéticas, em integrões de classe 1, embora já tenham sido encontrados genes *bla*<sub>IMP</sub>, em integrões de classe 3, no Japão. Podem também encontrar-se no cromossoma ou em plasmídeos (Walsh, 2005).



## **OBJECTIVOS**

---



Atendendo à crescente resistência aos carbapenemos por parte de isolados clínicos de *P. aeruginosa* e à necessidade de se entender que mecanismos estariam associados a essa resistência e no sentido de se poder entender melhor a epidemiologia desta bactéria colheram-se isolados de dois hospitais Centrais da região centro de Portugal (CHC e HUC), com os seguintes objectivos:

1. Determinar a susceptibilidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenemo a diversos grupos de antibióticos, nomeadamente, outros  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.
2. Pesquisar  $\beta$ -lactamases de espectro alargado nas estirpes ceftazidima e imipenemo resistentes.
3. Pesquisar os genes que codificam as metalo- $\beta$ -lactamases IMP, VIM, SPM e GIM, nos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenemo.
4. Verificar a localização genética dos genes que codificam as metalo- $\beta$ -lactamases, designadamente em integrões de classe 1.
5. Estudar a relação clonal dos isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases, entre as estirpes atendendo à sua origem intra e inter-hospitalar.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---



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

Para a realização deste trabalho foram escolhidos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenemo e ou ao meropenemo e ou à ceftazidima.

As amostras foram recolhidas nos Laboratórios de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC), entre Junho de 2007 e Junho de 2008, e dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), entre Janeiro e Junho de 2008.

Os isolamentos, identificação e estudos de susceptibilidade a diversos antimicrobianos que nos permitiram a selecção das estirpes para o nosso trabalho, foram realizados pelos sistemas automatizados “MicroScan WalkAway” (Dade Behring) nos CHC e “Vitek 2” (bioMerieux), nos HUC.

Os produtos biológicos, a partir dos quais se recolheram os isolados, foram de origem diversa: expectorações; aspirados e lavados brônquicos; sangue; líquidos peritoneal e pleural; cateteres e drenos; urinas; bÍlis; pús de feridas; exsudados de feridas cirúrgicas e não cirúrgicas.

Os dados demográficos dos doentes, assim como a data da colheita e a enfermaria foram sempre registados.

## 2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

As estirpes provenientes dos Hospitais foram repicadas para gelose Trypticase Soja (Oxoid, Inglaterra) e incubadas 18 a 24 horas, a 37°C. Apesar de virem identificadas dos dois Hospitais, fez-se sempre uma identificação presuntiva, semeando-se, em gelose Mac Conkey (Oxoid, Inglaterra) e realizando um teste de oxidase (bioMerieux, França). Quando havia dúvidas, na identificação, recorreu-se a uma confirmação através das galerias API 20 E e API 20 NE (bioMerieux, França). Em paralelo utilizou-se sempre a estirpe ATCC 27853 para controlo de qualidade.

Após a identificação das estirpes e obtenção de cultura pura, fez-se nova sementeira em gelose Trypticase Soja (Oxoid, Inglaterra) para se proceder à conservação da estirpe e realizar o antibiograma.

A conservação das bactérias foi feita inoculando um criotubo com 0,6 ml de caldo Trypticase Soja de dupla força e 0,6 ml de glicerol (Merck, Alemanha) a 30%.

### **3. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

#### **3.1. Método De Difusão: Técnica De Kirby-Bauer**

A susceptibilidade aos agentes microbianos dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foi determinada pelo método de Kirby-Bauer.

No fim dos anos 50, o estado da interpretação dos testes de susceptibilidade era caótico, devido à falta de um procedimento standardizado. As concentrações dos antibióticos nos discos variavam de modo considerável, utilizava-se uma grande quantidade de meios de cultura, os métodos de inoculação divergiam de laboratório para laboratório, o tempo de incubação não era uniforme e os resultados eram interpretados segundo diferentes critérios. Houve, assim, necessidade de desenvolver técnicas e procedimentos bem definidos e surgiu o teste standardizado, baseado no trabalho de Bauer, Kirby e colaboradores (Koneman *et al.*, 1997).

A avaliação e revisão do procedimento da difusão em disco têm sido feitas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Esta organização publica actualizações periódicas das alterações que lhe vão sendo propostas pelos diferentes utilizadores. O diâmetro das zonas gerado pelo teste só faz sentido quando correctamente interpretado pelas tabelas fornecidas pela CLSI que correlaciona as CMIs com os respectivos diâmetros, dependendo dos antibióticos e suas concentrações e das estirpes utilizadas e incluindo sempre a estirpe padrão para perceber se tudo funciona devidamente (Koneman *et al.*, 1997).

A partir de uma cultura bacteriana pura, com 18-24h de incubação, a 37°C, preparou-se uma suspensão em água destilada estéril com uma turvação equivalente 0,5 da escala de Mc Farland. Embebeu-se uma zaragatoa nesta suspensão e inocularam-se, por sementeira em toalha, três placas de Petri com gelose de Mueller Hinton (bioMerieux, França) por cada estirpe. Após a secagem do inóculo, (não ultrapassando os 15 minutos) foram aplicados os discos impregnados com antibióticos, com determinada concentração, na superfície do meio de cultura, com o auxílio de uma pinça estéril.

Os discos dos antimicrobianos (Oxoid, Basinstoke, Inglaterra) utilizados foram: imipenemo (10 µg), meropenemo (10 µg), aztreonamo (30 µg), cefepima (30 µg), ceftazidima (30 µg), piperacilina (100 µg), amicacina (30 µg) e ciprofloxacina (5 µg).

A concentração de cada antibiótico nos discos é estabelecida pelas normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

A escolha dos antibióticos utilizados teve em consideração os padrões de resistência mais observados, a experiência em estudos anteriores análogos a este e a importância da sua utilização na prática clínica.

Os resultados foram lidos ao fim de 18h de incubação, a 37°C, com ajuda de uma craveira afim de medir o halo de inibição, em milímetros, para cada antibiótico. Estes resultados foram devidamente registados e a sua interpretação fez-se mediante a consulta da tabela do CLSI de conversão do diâmetro em Susceptível, Intermédio e Resistente (CLSI, 2007).

De referir que na avaliação da actividade dos diferentes antibióticos consideraram-se os isolados intermédios como resistentes, para melhor coordenar a apresentação de resultados.

### **3.2. Método de E-Test (Épsilon-Test)**

A metodologia de E-test consiste na aplicação de tiras de plástico (tiras de E-test: AB biodisk, Solna, Suécia), impregnadas de antibiótico segundo um determinado gradiente de concentração, em placas de gelose de Mueller Hinton (bioMerieux, França), previamente inoculadas com suspensão bacteriana de 0,5 Mc Farland.

Um dos lados da tira contem a escala de concentração mínima inibitória [CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )] correspondente ao gradiente de concentração de antibiótico presente no verso da tira. As concentrações variam, dependendo do antibiótico testado, entre 0,002 a 32  $\mu\text{g/ml}$  e 0,016 a 256  $\mu\text{g/ml}$ .

Após incubação a 37°C durante 18-24 horas, observou-se, ou não, uma zona de inibição do crescimento bacteriano, de forma elíptica. A concentração mínima inibitória foi lida na intercepção do vértice da elipse com a tira de E-Teste.

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

De modo semelhante ao descrito atrás, na avaliação da actividade dos antibióticos supra citados, os isolados com sensibilidade intermédia foram considerados resistentes.

## **4. DETECÇÃO DE β-LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs)**

### **4.1. Pesquisa fenotípica**

Os testes para pesquisa fenotípica de ESBL empregam um inibidor das β-lactamases, o ácido clavulânico, em combinação com uma oximino-cefalosporina, como a ceftazidima. Nestes testes o clavulanato inibe a ESBL, reduzindo, assim, o nível de resistência à cefalosporina (Bradford, 2001).

O método utilizado consistiu na pesquisa de sinergismo entre o ác. clavulânico e a ceftazidima, a cefepima e o aztreonamo (Pagani *et al.*, 2004)

O protocolo utilizado para realização deste teste seguiu a técnica de Kirby-Bauer em que se inoculou uma placa de Mueller Hinton, com uma suspensão bacteriana de 0,5 Mc Farland e colocaram-se os discos dos antibióticos. Os discos das cefalosporinas e do aztreonamo foram aplicados a uma distância de 20 mm do disco de ác. clavulânico (10µg), disposto no centro da placa (Pagani *et al.*, 2004).

Após incubação a 37°C, durante 18-24 horas, verificou-se se houve um aumento das zonas inibitórias dos β-lactâmicos de largo espectro, induzido pelo ácido clavulânico (Pagani *et al.*, 2004). Uma diferença, entre os diâmetros dos halos de inibição das cefalosporinas e aztreonamo e da sua indução pelo ác.clavulânico, maior ou igual a 5mm, seria a confirmação fenotípica de produção de ESBL (Paterson *et al.*, 2005).

## **5. DETECÇÃO DE METALO-β-LACTAMASES**

### **5.1. Pesquisa fenotípica: teste do duplo disco imipenemo-EDTA**

A actividade das metallo-β-lactamases é inibida por agentes quelantes, como o EDTA. O teste do duplo disco, usando um disco de imipenemo e um de imipenemo adicionado de EDTA foi utilizado para triagem de estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases (Yong *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2004).

Este teste foi efectuado pela técnica de Kirby-Bauer, em que se inocula uma placa de Mueller-Hinton, com uma suspensão bacteriana de 0,5 Mc Farland e são colocados dois discos de imipenemo, um dos quais impregnado com 10 µl de EDTA com concentração de 750 µg/ml (Yong *et al.*, 2002).

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

Considerou-se como critério de positividade uma diferença na leitura do diâmetro do halo de inibição do imipenemo/EDTA igual ou superior a 7 mm em relação ao halo do imipenemo (Yong *et al.*, 2002).

## 5.2. Pesquisa Genotípica

Para pesquisa genotípica dos genes *bla*, seleccionaram-se os isolados de *P. aeruginosa* cujo teste de "screening" de metalo- $\beta$ -lactamases foi positivo (em que a diferença de halo era igual ou superior a 7mm), por serem estas as potenciais produtoras daquela enzima.

### 5.2.1. Extracção de DNA Total

Às bactérias que corresponderam ao critério de positividade referido atrás, procedeu-se à extracção de DNA total para, se realizar o estudo genotípico de cada isolado.

Para isso utilizou-se o kit "Aquapure Genomic DNA Isolation" (BioRad, EUA) e seguiu-se o protocolo do fabricante.

Os isolados foram inoculados em gelose tripticase soja (Oxoid, Inglaterra) e incubados a 37°, durante 18-24 horas.

Para cada uma das culturas preparou-se uma suspensão bacteriana de 5 Mc Farland em 500  $\mu$ l de soro fisiológico estéril, num *ependorf* de 1,5 ml e centrifugaram-se, durante 15 segundos, a 13000 *g*, para que as células sedimentassem.

Removeram-se os sobrenadantes e adicionaram-se 300  $\mu$ l de solução de lise ("Genomic DNA Lysis Solution") após o que, se colocaram os *ependorf* no gelo, durante 5 minutos e se voltaram a centrifugar, mais 3 minutos, a 13000 *g*.

Resuspenderam-se as células e incubaram-se os *ependorf* num banho de água, a 80°C, durante 5 minutos, para que houvesse lise celular.

Adicionaram-se 1,5  $\mu$ l de solução de RNase A Solution (4 mg/ml) às suspensões anteriores, e agitaram-se 25 vezes, após o que se seguiu uma incubação na estufa, a 37°C, durante 45 minutos.

Tiraram-se os tubos da estufa, colocaram-se à temperatura ambiente e adicionaram-se 100  $\mu$ l da solução de precipitação de proteínas. Após agitação vigorosa, no "vortex", durante 20 segundos, centrifugaram-se a 13000 *g*, durante 3 minutos. Se as

proteínas não formassem um sedimento compacto repetia-se o passo anterior, agitando mais 20 segundos no “vortex”.

Após a precipitação das proteínas, pipetaram-se os sobrenadantes para novos tubos estéreis de 1,5 ml, que continham 300 µl de isopropanol (100%). Inverteram-se os tubos, suavemente, 50 vezes, observando-se a formação de um ténue precipitado. De seguida, centrifugaram-se os tubos a 13000 g durante um minuto, constatando-se, depois, a presença do DNA na forma de um sedimento de tamanho muito reduzido. Removeram-se os sobrenadantes e secaram-se os tubos em papel absorvente. Adicionaram-se 300 µl de etanol (70%) e inverteram-se os tubos, diversas vezes, para lavar o sedimento, centrifugaram-se, de novo, um minuto, a 13000 g e removeu-se, com cuidado, o etanol. Inverteram-se, os tubos em papel absorvente e deixaram-se à temperatura ambiente, durante 15 minutos, para que o etanol evaporasse por completo.

Adicionaram-se 50 µl de solução de hidratação de DNA (“DNA Hydration Solution”) às amostras e incubaram-se a 65°C, em banho de água, durante 20 minutos. Por fim, agitaram-se, as suspensões, no “vortex” e centrifugaram-se, mais uma vez, para que as amostras de DNA ficassem depositadas no fundo.

As amostras de DNA conservaram-se em arca frigorífica, a -20°C.

### **5.2.2. Amplificação de genes por PCR**

A partir do DNA total extraído dos isolados de *P. aeruginosa*, procedeu-se à amplificação dos genes *bla*, por PCR.

Assim, recorreu-se a *primers* específicos usados na detecção dos genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> que codificam as metalo-β-lactamases VIM, IMP, GIM e SPM, respectivamente (quadro 1).

As reacções de amplificação, para pesquisa do gene *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub>, foram executadas tendo como volume final 25 µl em que se utilizaram 1 µl de DNA de amostra, 19 µl de *MIX* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA) e 1,25 µl de cada *primer*, IMP1, IMP2; Vip1 e Vip2, com uma concentração de 0,5 µM, no volume final. Em paralelo, foram sempre efectuados um controlo positivo, em que o DNA utilizado era já conhecido como amplificando para o gene *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub> e um controlo negativo em que o DNA foi substituído por 1 µl de água estéril.

O processo de amplificação decorreu no termociclador MJ Mini (Bio-Rad) programado com as condições ideais para metalo- $\beta$ -lactamases VIM / IMP, consoante descrito no quadro 2. No final os tubos foram arrefecidos a 4°C.

Na pesquisa do gene *bla*<sub>SPM</sub>, o volume final utilizado foi de 50  $\mu$ l, em que a mistura reaccional continha 2,5  $\mu$ l de cada *primer* (0,5  $\mu$ M de concentração no volume final), 1  $\mu$ l de DNA e 44  $\mu$ l de *MIX* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA). Utilizou-se também, um controlo negativo em que o DNA foi substituído por 1  $\mu$ l de água estéril. Os tubos foram colocados no termociclador MJ Mini (Bio-Rad), nas condições de amplificação requeridas para metalo- $\beta$ -lactamases SPM, descritas no quadro 2.

Quanto à pesquisa do gene *bla*<sub>GIM</sub>, utilizou-se um volume final de 50  $\mu$ l, constituído por 1  $\mu$ l de DNA, 1,25  $\mu$ l de *primer* (0,5  $\mu$ M de concentração no volume final) e 46,5  $\mu$ l de *MIX* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA). Como para os outros ensaios, também se utilizou, um controlo negativo em que o DNA foi substituído por 1  $\mu$ l de água estéril. A amplificação decorreu no termociclador MJ Mini (Bio-Rad), mediante as condições de amplificação da metalo- $\beta$ -lactamase GIM, descritas no quadro 2.

**Quadro 1.** *Primers* utilizados na detecção de genes de metalo- $\beta$ -lactamases.

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

**Quadro 2.** Ciclos de amplificação utilizados na pesquisa de genes de metalo-β-lactamases.

GENE (Referência)	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO				
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Extensão Final
<i>bla<sub>VIM</sub></i> e <i>bla<sub>IMP</sub></i> (Cadoso et al., 2002)	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
	2 minutos	1 minuto	1 minuto	3 minutos	7 minutos
35 CICLOS					
<i>bla<sub>SPM</sub></i> (Gales et al., 2003)	95°C	95°C	40°C	68°C	68°C
	5 minutos	1 minuto	1 minuto	1 minutos	7 minutos
35 CICLOS					
<i>bla<sub>GIM</sub></i> (Toleman et al., 2002; Gales et al., 2003)	95°C	95°C	40°C	68°C	68°C
	5 minutos	1 minuto	1 minuto	1 minutos	5 minutos
35 CICLOS					

### 5.2.2.1. Electroforese para detecção de amplicões

Os produtos das reacções de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Agarose NA, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia). Os geles de agarose foram preparados com uma concentração de 10%, em tampão TBE 1X [89 mM Tris base, (Merck, Alemanha); 89 mM ácido bórico (Sigma, EUA); 2 mM EDTA (Biochrom KG Berlin, Alemanha)] e com brometo de etidium [0,5 µg/ml, (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia)]

Aplicaram-se 10 µl de amostra (produto resultante da reacção de PCR) misturada com 2 µl de azul bromofenol (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 25% e água q.b.p. 10 ml).

A electroforese dos geles 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 (UVITEC; Reino Unido).

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

## 6. PESQUISA DE INTEGRÕES DE CLASSES 1

Em *Pseudomonas aeruginosa*, tem-se observado que há alelos *bla*<sub>VIM</sub>, que são transportados em cassetes genéticas inseridas em integrões de classe 1. A resistência localizada em integrões mune-os de um aumento potencial de expressão e disseminação. (Yu, *et al.*, 2006)

Foram testados os *primers* específicos para a pesquisa de integrões de classe 1 em DNA extraído dos isolados, nos quais, se tinha verificado a presença do gene *bla*<sub>VIM</sub>.

As reacções de amplificação por PCR para pesquisa de integrões de classe 1 foram efectuadas, tendo como volume final 50 µl. Para isso, foram adicionados 44 µl de *MIX* (PCR SuperMix, Invitrogen, Carlsbad CA); 1 µl de DNA e 2,5 µl de cada *primer* (0,5 µM de concentração de 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). Em paralelo, fez-se um controlo positivo, utilizando DNA extraído de uma amostra conhecida que tinha um integrão de 3000 pb, e um controlo negativo, com água estéril, que substituíram o DNA das amostras.

Os tubos foram colocados com a solução a amplificar no termociclador MJ Mini (Bio-Rad) programado com as seguintes condições: 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 (Levésque *et al.*, 1995). No final, os tubos foram mantidos a uma temperatura de 4°C.

## 7. 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 µl de água destilada estéril.

## 8. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DE DNA

As sequências 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 e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

As sequências dos nucleótidos foram analisadas com o programa BLAST disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

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

### **9.1. RAPD**

Os isolados de *P. aeruginosa* seleccionados para a tipagem por RAPD foram todos aqueles em que se verificou serem produtores da metalo-β-lactamase VIM-2.

Na metodologia RAPD utilizou-se o *primer 272* (5'-AGCGGGCCAA-3') específico para discriminar os isolados de *P. aeruginosa* (Mahenthiralingam *et al.*, 1996).

Para realização desta técnica recorreu-se ao kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), cujos tubos continham a mistura reaccional liofilizada, que foi hidratada com água destilada estéril (22,75 µl) e à qual se adicionou o *primer 272* (1,25 µl) e o respectivo DNA (1 µl) a testar, para um volume final de 25 µl.

Os tubos foram colocados no termociclador MJ Mini (Bio-Rad) com as condições de amplificação indicadas 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.

### **9.2. Electroforese dos Produtos Amplificados por RAPD**

Os produtos da reacção de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose. O gel foi preparado para uma concentração de 1,5% em tampão TBE 1X e brometo de etidium (0,5 µg/ml).

Foram aplicados 10 µl de DNA de cada produto resultante de reacção de PCR misturado com 2 µl de uma solução de azul de bromofenol.

A electroforese em gel decorreu a 80V durante 2 horas, em tampão 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 (UVITEC; Reino Unido). 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 1 Kb DNA Ladder (Bioron).

Os perfis RAPD obtidos foram analisados visualmente, tendo sido atribuída uma letra maiúscula indicativa de cada perfil de RAPD (Campbell *et al.*, 2000). Assim, dois ou mais isolados foram considerados idênticos quando apresentavam perfis de bandas iguais. Por outro lado, os isolados que mostravam apenas uma banda mais intensa ou três bandas menos intensas, entre eles, foram considerados semelhantes e, possivelmente, muito relacionados; aos que não tinham nenhuma banda semelhante entre si foi-lhes atribuído um perfil único. (Campbell *et al.*, 2000).



## **RESULTADOS**

---

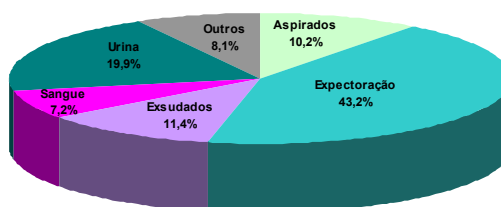


## 1. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Durante um ano, entre Junho de 2007 e Junho de 2008, foram recolhidos 236 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC).

Dos 236 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, 104 foram objecto do nosso estudo relativo à pesquisa de metalo- $\beta$ -lactamases por serem resistentes ao imipenemo, pelo sistema semi-automático MicroScan WalkAway (Dade Behring).

Todas as amostras recolhidas eram de origem hospitalar e foram isoladas a partir da expectoração (43,2%); aspirados brônquicos (10,2%); urina (19,9%); exsudados (11,4%); sangue (7,2%) e outros produtos biológicos (8,1%), nomeadamente: líquido cefalo-raquídeo, líquidos peritoneal e pleural, fezes, biopsias e cateteres, como se pode ver na figura seguinte.



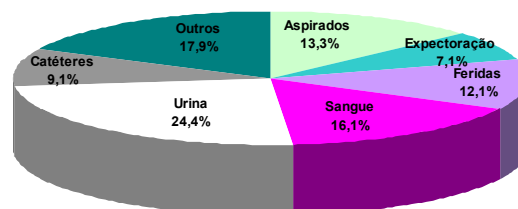
**Figura 3.** Distribuição (%) dos isolados clínicos provenientes dos CHC (n=236) por produtos biológicos.

Durante meio ano, entre Janeiro e Junho de 2008 foram, também, recolhidas 31 amostras de isolados de *P. aeruginosa* dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). Estas amostras tinham sido previamente identificadas pelo sistema semi-automático Vitek 2 (biomérieux, França) assim como, o perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Os isolados escolhidos, para realização deste trabalho, eram todos resistentes ao imipenemo e 3 deles pertenciam ao mesmo doente.

As amostras, como representado na figura 4, eram provenientes dos seguintes produtos biológicos: urina (24,4%); sangue (16,1%); aspirados brônquicos (13,3%);

expectorações (7,1%), feridas (12,1%); cateteres (9,1%) e outros: líquido pancreático, líquido peritoneal, exsudatos e biliar (17,9%).



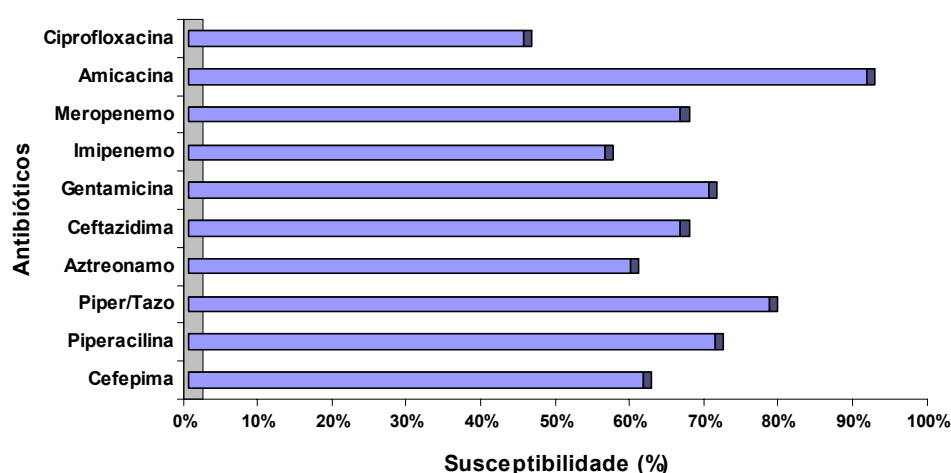
**Figura 4.** Distribuição (%) dos isolados clínicos provenientes dos HUC (n=31) por produtos biológicos.

## **2. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DOS CHC**

Os perfis de susceptibilidade dos 236 isolados clínicos obtidos nos CHC foram executados no sistema semi-automático MicroScan WalkAway (Dade Behring) e mostraram que o antibiótico mais eficaz foi a amicacina (91,1%) que, apesar da sua excelente actividade, não é comum ser administrado em monoterapia, no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*.

Dos antibióticos β-lactâmicos, a piperacilina foi o antibiótico com melhor actividade (70,8%) beneficiando, ainda, de mais 7% de eficácia quando associada ao tazobactam. Das cefalosporinas estudadas, a ceftazidima apresentou-se mais activa (66,1%) que a cefepima (61,0%). Relativamente aos carbapenemos, constatou-se que o meropenem (66,1%) se mostrou mais eficaz que o imipenem (55,9%). O aztreonam inibiu 59,3% dos isolados. A fluoroquinolona, ciprofloxacina, apresentou uma actividade de 44,9%.

Estes perfis encontram-se representados no gráfico da figura 5.

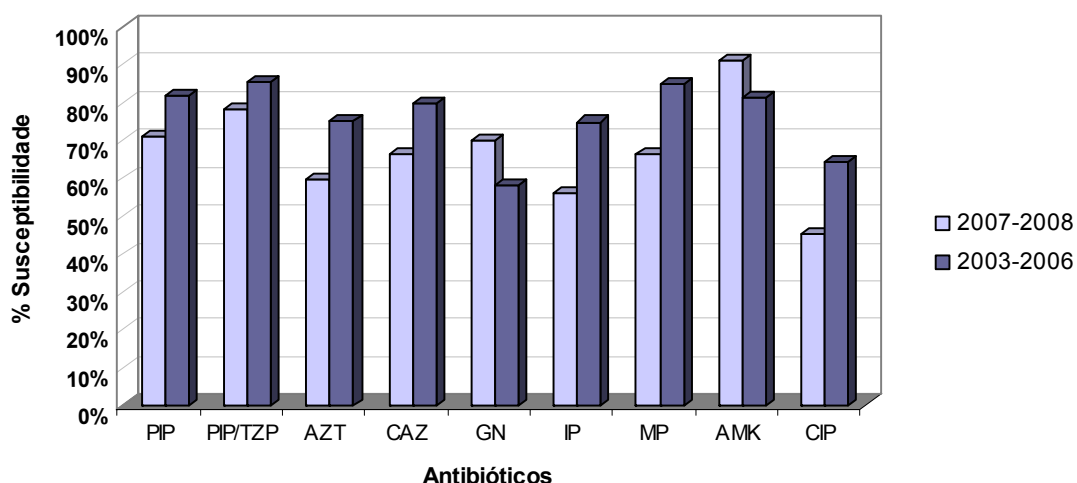


**Figura 5.** Frequência de susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos em isolados clínicos (n=236) de *P. aeruginosa* colhidos entre Abril de 2007 e 2008, no CHC.

Isolados de *P. aeruginosa* multi-resistentes, foram definidos com base na resistência à piperacilina, ceftazidima, imipenemo e ciprofloxacina. Isolados resistentes a três ou quatro destes agentes, foram considerados multi-resistentes (MDR-Multidrug Resistant). (Cardoso *et al.*, 2007).

Assim, observou-se que dos 236 isolados clínicos, 28,8% (n=68) apresentaram resistência a três ou mais antibióticos, de acordo com o critério supracitado. De referir, ainda, que 24,6% (n=58) foram resistentes a 7 ou mais agentes antimicrobianos e que um isolado clínico (2,4%) se mostrou resistente a todos os antibióticos.

Fez-se um estudo comparativo das susceptibilidades aos antibióticos, em relação aos resultados obtidos por Cardoso e colaboradores (2007), no mesmo centro hospitalar (CHC), entre 2003 e 2006 (figura 6). Observou-se que, exceptuando os aminoglicosídeos, gentamicina e amicacina, cuja susceptibilidade aumentou 11,8% e 9,8%, respectivamente, houve um aumento das resistências, quando se comparou com o período anterior. Assim, dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a associação piperacilina/tazobactam, manteve-se como sendo o mais eficaz, apesar da susceptibilidade ter diminuído de 85,1% para 70,8%. Os carbapenemos, imipenemo e meropenemo, registaram um aumento de resistência de 18,8% e 18,7%. A ceftazidima mostrou-se menos eficaz, no último ano de estudo, tendo diminuído a sua eficácia de 79,4% para 66,1%. O mesmo se passou com o aztreonamo em que se observou uma diminuição de actividade de 15,7%.



**Figura 6.** Comparação da susceptibilidade (%) aos agentes antimicrobianos de isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* entre o período 2003 e 2006 e entre Abril de 2007 e 2008. PIP, piperacilina; PIP/TZP, piperacilina com tazobactam; AZT, aztreonamo; CAZ, ceftazidima; GN, gentamicina; IP, imipenemo; MP, Meropenemo; AMK, ampicilina; CIP, ciprofloxacina.

### 3. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS RESISTENTES AO IMPENEMO

A susceptibilidade dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (resistentes ao imipenemo) aos agentes antimicrobianos,  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, foi também, determinada através do método de difusão de Kirby-Bauer, verificando-se que, dos 104 isolados estudados, apenas 91 apresentaram resistência ao imipenemo, tendo sido estes seleccionados para a posterior detecção de metallo- $\beta$ -lactamases.

Comparando os resultados dos antibiogramas obtidos pelo sistema semi-automático MicroScan WalkAway e pelo método de difusão de Kirby-Bauer observaram-se inconsistências relativamente à piperacilina, à ceftazidima e à cefepima. Seguindo os critérios de classificação dos erros, propostos por Sader e colaboradores (2006), [nomeando-os como: erros muito graves (falsa susceptibilidade) e erros graves (falsa resistência)] e considerando o método de Kirby-Bauer como método de referência, observaram-se erros graves (falsas resistências) na cefepima que apresenta uma eficácia de 76,9% pelo método de Kirby-Bauer e 33,7% pelo MicroScan WalkAway; na ceftazidima

que mostrou uma susceptibilidade de 79,1% pelo método de difusão do disco e 37,5% pelo MicroScan WalkAway e na piperacilina que demonstrou uma sensibilidade de 70,3% pelo método de Kirby-Bauer e 49,0% pelo método do MicroScan WalkAway. Não foram observados erros muito graves, ou seja, de falsas susceptibilidades, como se pode ver no quadro 3.

**Quadro 3.** Comparação das susceptibilidades obtidas aos antibióticos cefepima; aztreonamo, ciprofloxacina, ampicacina, ceftazidima, piperacilina, meropenemo e imipenemo, pelos métodos de Kirby-Bauer e semi-automático do equipamento MicroScan WalkAway, das estirpes resistentes ao imipenemo (n=104).

Agente Antimicrobiano	Método de Kirby-Bauer (% Susceptibilidade)	MicroScan WalkAway (% Susceptibilidade)	Diferenças de susceptibilidades (%)
Cefepima	76,9	37,5	39,4
Aztreonamo	34,1	33,7	0,4
Ciprofloxacina	25,3	23,1	2,2
Ampicacina	96,7	94,2	2,5
Ceftazidima	79,1	37,5	41,6
Piperacilina	70,3	49,1	21,2
Meropenemo	23,1	26,9	-3,8
Imipenemo	12,5	0	12,5

#### 4. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE $\beta$ -LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO (ESBLs)

Analisaram-se 135 isolados clínicos de *P. aeruginosa* para pesquisa de ESBLs, dos quais 104 eram provenientes dos CHC e 31 dos HUC.

Todas estas amostras resultaram num teste fenotípico negativo, não tendo, por isso, sido encontrada nenhuma estirpe produtora de ESBL.

## 5. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-β-LACTAMASES

### 5.1. Pesquisa Fenotípica: Teste Do Duplo Disco IMIPENEMO-EDTA

Dos 91 isolados clínicos, dos CHC, resistentes ao imipenemo, submetidos ao teste do duplo disco Imipenemo-EDTA verificou-se que 32 (35,2%) apresentaram uma diferença de diâmetro de halos de inibição dos discos de imipenemo com e sem EDTA maior ou igual a 7 mm, tendo sido considerados, como possíveis produtores de metalo-β-lactamases. Os restantes 59 (64,8%) isolados apresentaram uma diferença de halo menor que 7 mm e foram tidos como negativos, no teste fenotípico.

Dos 31 isolados clínicos dos HUC resistentes ao imipenemo, 18 (58,1%) apresentaram uma diferença de halo de inibição, com e sem EDTA, superior a 7 mm, pelo que se consideraram como presumíveis produtores de metalo-β-lactamases. As restantes 13 amostras (41,9%) apresentaram fenótipo negativo.

A figura 7 mostra um resultado positivo do teste de sinergismo do duplo disco imipenemo-EDTA.



**Figura 7.** Teste do duplo disco imipenemo-EDTA mostrando o efeito inibitório do crescimento do isolado de *P. aeruginosa* (nº MD2526, dos HUC) provocado pela adição de 10 µl de EDTA (750 µg/ml) aos discos de Imipenemo e de Meropenemo. IPM 10, Imipenemo; E IPM 10, Imipenemo-EDTA; MEM 10, Meropenemo; E MEM 10, Meropenemo-EDTA.

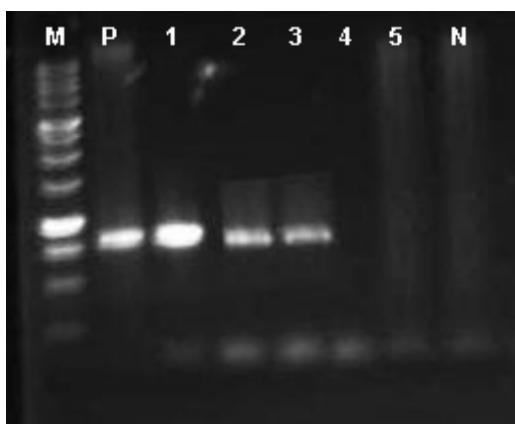
## 5.2. Pesquisa Genotípica: Detecção de Genes *bla* por PCR

Nos isolados em que se obtiveram resultados positivos na pesquisa de metalo- $\beta$ -lactamases, 32 dos CHC e 18 dos HUC, pesquisou-se a presença de genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> e *bla*<sub>SPM</sub> que codificam as metalo- $\beta$ -lactamases VIM, IMP, GIM e SPM, respectivamente.

Recorrendo à técnica de PCR com *primers* específicos, foi amplificado um fragmento com o tamanho aproximado de 815 pb, em 27 isolados, correspondente ao gene *bla*<sub>VIM</sub>.

Destes isolados que apresentaram o gene *bla*<sub>VIM</sub>, 12 eram do CHC, representando 13,2% dos 91 isolados e 15 (48,4%) eram provenientes dos HUC, tendo em atenção que destas 15 amostras, 3 eram do mesmo doente.

A figura 8 exemplifica os resultados obtidos para a detecção do gene *bla*<sub>VIM</sub> em isolados, dos quais 3 revelaram a presença de amplificação de 815 pb.



**Figura 8.** Separação electroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para a detecção do gene *bla*<sub>VIM</sub>. Linha M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linha P, controlo positivo; linhas 1, 2 e 3, amostras positivas com amplificação de 815 pb; linhas 4 e 5, amostras negativas; linha N, controlo negativo.

## 5.3. Relação entre teste fenotípico e teste genotípico de detecção de *bla*<sub>VIM</sub>

O teste fenotípico para pesquisa de metalo- $\beta$ -lactamases revelou-se positivo em 50 isolados clínicos e destes, 27 (54%) mostraram possuir o gene *bla*<sub>VIM</sub>.

Relacionou-se, o número de isolados com pesquisa fenotípica positiva e o número de isolados que apresentaram o gene *bla*<sub>VIM</sub>. (Quadro 4). Assim, quando a diferença de halos

variou entre 7 e 10 mm obtiveram-se 19 isolados positivos pelo teste do duplo disco e destes, apenas 5 revelaram presença do gene *bla*<sub>VIM</sub>, o que originou um valor preditivo positivo (VPP) de 26,3%. Constatou-se também que, à medida que a diferença do diâmetro dos halos vai aumentando, o VPP do teste é maior. Foi obtido um VPP de 100% quando a diferença dos halos de inibição foi superior a 20.

**Quadro 4.** Relação entre a diferença dos diâmetros dos halos de inibição dos isolados positivos pelo teste do duplo disco imipenemo-EDTA e dos isolados que revelaram a presença de *bla*<sub>VIM</sub>.

Diferenças, em mm, do diâmetro dos halos de inibição entre IMP e IMP-EDTA	Pesquisa fenotípica positiva (n=50)	Pesquisa genotípica positiva (n=27)	Valor Preditivo Positivo do teste fenotípico
7 a 10	19	5	26,3%
11 a 15	11	3	27,3%
16 a 20	7	6	85,7%
21 a 25	7	7	100%
26 a 30	6	6	100%

## 6. 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 de metalo-β-lactamases VIM-2 nos 27 isolados avaliados.

## 7. DETERMINAÇÃO DAS CMIs DOS ISOLADOS PRODUTORES DE VIM-2

A susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos foi avaliada de forma quantitativa pela metodologia de E-test. Neste sentido, determinaram-se as CMIs dos antibióticos

imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina nos 27 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 µg/ml).

Verificou-se, também que, em relação ao meropenemo, dos 27 isolados submetidos ao estudo das CMIs, 77,8% eram resistentes com uma CMI superior a 16 µg/ml; 7,4% mostraram CMIs intermédias (>4 µg/ml e <16 µg/ml) e nos restantes 14,8%, o antibiótico revelou-se eficaz.

O aztreonamo demonstrou uma eficácia de 81,5% sendo, assim, o antibiótico com melhor actividade perante as estirpes produtoras de metalo-β-lactamases VIM-2.

Observou-se, ainda, que a ceftazidima se revelou pouco eficaz (25,9%) visto 74,1% dos isolados serem resistentes.

Quanto à piperacilina, foram obtidas 33,3% de estirpes resistentes, o que equivale a uma boa actividade.

No quadro 5 representaram-se as CMIs dos antibióticos β-lactâmicos testados em 27 isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo-β-lactamases VIM-2.

**Quadro 5.** Concentração mínima inibitória dos antibióticos β-lactâmicos (imipenemo, meropenemo, ceftazidima, aztreonamo e piperacilina) de 27 isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo-β-lactamases VIM-2.

Nº Amostra	CMIs (µg/ml)				
	IP	MP	AZT	CAZ	PIP
100	>32	>32	0,38	48	16
8	>32	8	2	24	12
200	>32	32	0,75	12	12
9	>32	3	1	8	12
10	>32	>32	0,35	48	16
14	>32	32	3	12	8
20	>32	>32	0,75	256	32
21	>32	>32	1,5	256	64
26	>32	12	2	24	256
27	>32	3	1	8	48
28	>32	1	0,5	4	12
29	>32	>32	24	96	>256
30	>32	>32	0,047	16	2
31	>32	>32	1	256	24
43	>32	>32	3	24	64
44	>32	>32	2	6	8
45	>32	32	3	64	>256
47	>32	>32	32	>256	>256
48	>32	>32	0,75	48	96
49	>32	>32	8	2	32
50	>32	>32	>256	>256	6
51	>32	>32	3	3	8
52	>32	>32	32	>256	>256
53	>32	>32	>256	>256	6
62	>32	3	1,5	3	16
55	>32	>32	6	256	256
60	>32	>32	8	256	>256

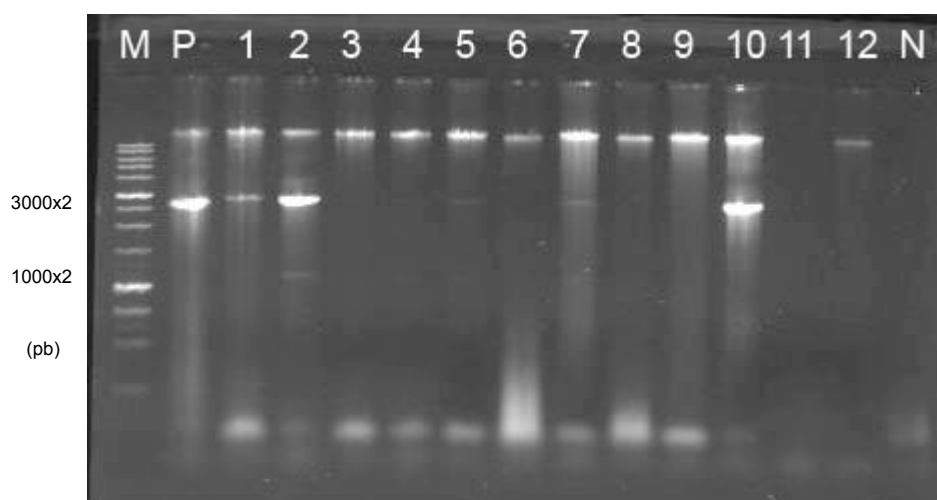
IP, imipenemo; MP, meropenemo; CAZ, ceftazidima; AZT, aztreonamo; PIP, piperacilina.

## 8. DETECÇÃO DE INTEGRÕES DE CLASSE 1

Dos 27 isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases VIM-2, em 11 (40,7%), foram detectados integrões de classe 1. Destes, 7 pertenciam a estirpes dos HUC e 4 pertenciam a isolados dos CHC.

Dos amplicões obtidos, 5 apresentaram tamanhos de cerca de 3000 pb; 4 apresentaram dois amplicões, um com 1000 pb e outro com 3000 pb e 1 apresentou um amplicão com 2000 pb.

A figura 9 exemplifica os resultados obtidos aquando da pesquisa de integrões classe 1, em 12 isolados.



**Figura 9.** Separação electroforética em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os *primers* específicos para detecção de integrões de classes 1. Linha M, marcador de DNA (1Kb DNA Ladder); linha P, controlo positivo; linha N, controlo negativo; linhas 1, 6, 7e 10, amplicação de 3 kb; linha 2, amplicões de 3 kb e 1 kb.

## 9. TIPAGEM GENÉTICA POR RAPD

Identificaram-se 14 perfis diferentes, de A a O, pela técnica de RAPD.

Os perfis de A a G foram atribuídos aos isolados provenientes de 15 amostras de doentes dos HUC.

O perfil A incluiu 7 isolados de amostras colhidas a doentes internados nas unidades hospitalares de Neurotraumatologia, Unidade de Transplantes Hepáticos e Cirurgia III. Na Neurotraumatologia, foram colhidas 3 amostras (urina, n=2 e aspirado brônquico, n=1) a 3 doentes diferentes. Na Unidade de Transplantes Hepáticos o isolado foi proveniente de um catéter. Na Cirurgia III, os 3 isolados foram obtidos a partir de sangue, líquido pancreático e aspirado brônquico.

No perfil B foram considerados dois isolados pertencentes ao mesmo doente, internado na Unidade de Transplantes Hepáticos, cujos produtos eram sangue e bÍlis. O perfil E foi dado a um isolado de uma amostra de sangue que era proveniente do mesmo doente.

O perfil C foi constituído por dois isolados obtidos de amostras de ferida e urina, colhidos, nos Serviços de Cardiologia e de Medicina I.

Nos perfis D, F e G foram incluídos isolados com perfis diferentes, colhidos a partir de duas urinas da Urgência e Ortopedia D e de uma ferida das Infecto-Contagiosas.

Os perfis de H a O corresponderam a estirpes colhidas nos CHC.

Os 5 isolados que constituíram o perfil H, foram obtidos a partir de amostras (urina n=2; catéter n=2 e pús n=1) de doentes internados no Hospital Pediátrico, todos com menos de um ano de idade.

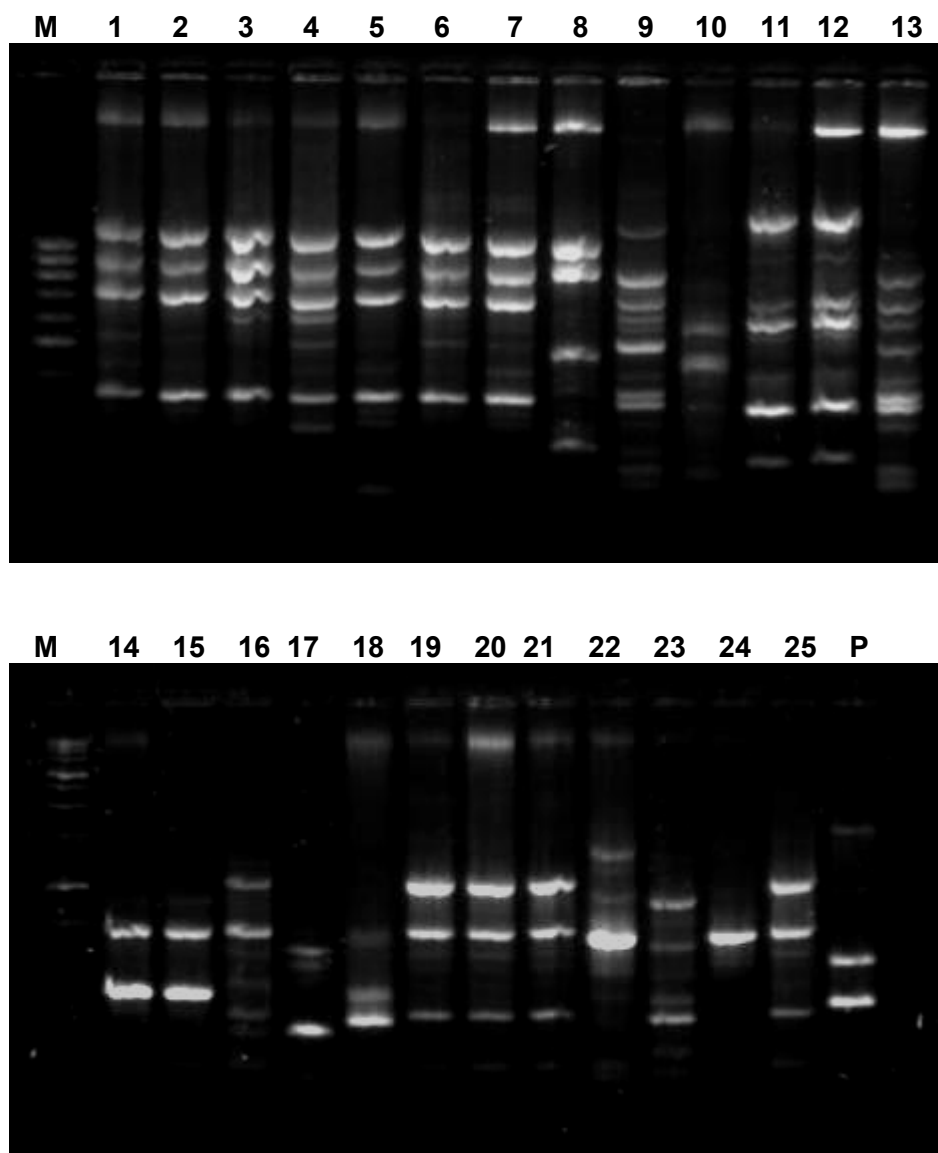
Do perfil I fizeram parte dois isolados cujas amostras (expectoração n=2) foram colhidas nas enfermarias de Pneumologia e Neurocirurgia do Hospital dos Covões.

Os restantes perfis, J, L, M, N e O, foram considerados diferentes de todos os outros representando, cada um, uma estirpe diferente. O isolado J era proveniente de uma amostra de urina, de um doente, do Hospital de Pombal. Os isolados dos perfis M, N e O foram colhidos na enfermaria de Medicina, cujo produto biológico era urina (n=3). O isolado pertencente ao perfil L, foi colhido a partir de expectoração de um doente internado em Infecções.

**Quadro 6.** Isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamases VIM-2, respectiva Unidade de Internamento e perfil de RAPD.

Nº do isolado	Unidade de Internamento	Perfil RAPD
100	Neurotrauma	A
10	Neurotrauma	A
20	Cirurgia III UCI	A
21	Cirurgia III	A
30	Cirurgia III	A
31	Neurotrauma	A
48	Transplantes	A
29	Transplantes	B
52	Transplantes	B
50	Medicina I	C
53	Cardiologia	C
45	Urgência	D
47	Transplantes	E
43	Infecto-Contagiosas	F
44	Ortopedia D	G
8	H. Pediátrico	H
9	H. Pediátrico	H
28	H. Pediátrico	H
27	UCI H. Pediátrico	H
62	H. Pediátrico	H
200	Pneumologia	I
14	Neurocirurgia	I
51	Med. H. Pombal	J
49	Infeciosas	L
26	Medicina	M
55	Medicina	N
60	Medicina	O

Neurotrauma, Unidade de Neurotraumatologia; Transplantes, Unidade de Transplantes Hepáticos; UCI H. Pediátrico, Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Pediátrico; H. Pediátrico, Hospital Pediátrico; Med. H. Pombal, Serviço de Medicina do Hospital de Pombal.



**Figura 10.** Perfis de RAPD de 25 isolados clínicos de *P. aeruginosa*  $bla_{VIM-2}$  positivos, obtidos com o *primer* 272. Linhas M, marcador de DNA (1Kb Ladder). Linhas 1 a 7, isolados correspondentes ao perfil A; linha 8, perfil G; linha 9 e 13, perfil B; linha 10, perfil F; linhas 11 e 12, perfil C; linhas 14 e 15, perfil I; linhas 16, 19, 20, 21 e 25, perfil H; linha 17, perfil J; linha 18, perfil L; linha 22, perfil M; linha 23, perfil N; linha 24, perfil O; linha P; controlo positivo.

## **DISCUSSÃO**

---



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

A infecção respiratória é a principal infecção adquirida em doentes hospitalizados, em especial naqueles que estão internados em Unidades de Cuidados Intensivos. *P. aeruginosa* e o *S. aureus* causam cerca de 20% das pneumonias nosocomiais (Bellido, 2008).

Exemplificando, em Espanha, Bouza e colaboradores (2003) concluíram que por cada 100.000 habitantes/ano, se isolavam 168 estirpes de *P. aeruginosa* e pelo menos 25 estirpes por cada 1000 ingressos hospitalares/ano. Nesse trabalho, referiram, também, que a maior percentagem de isolamentos se obteve a partir de amostras procedentes de vias respiratórias baixas (30,9%); 27,3% eram provenientes de exsudatos de feridas e 21,6% eram isolados em uroculturas (Bouza *et al.*, 2003).

No estudo, aqui apresentado, as vias respiratórias, com 53,4% das amostras (43,2% de expectorações e 10,2% de aspirados brônquicos) foram, também, a principal origem dos isolados seguido da urina com 19,9%, dos exsudatos com 11,4%, do sangue com 7,2% e de outros produtos biológicos que representaram 8,1% do total de amostras. Harris e colaboradores (2002) referem números semelhantes aos deste estudo, relativos à origem dos isolados, sendo a expectoração a amostra preponderante com 50,4%, seguida dos exsudatos (15,2%), dos aspirados (12,8%), da urina (8,8%) e do sangue (3,2%). Estes resultados podem ser justificados pelo facto de a *P. aeruginosa*, ser um dos patogénicos com maior responsabilidade em infecções do tracto respiratório (Giamarellou, 2002; Bellido, 2008).

## 2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Considerando que *P. aeruginosa* possa ser um agente patogénico letal, com 34% de mortalidade atribuível, por bacteriémia, é imperativo iniciar uma terapêutica empírica, enquanto se aguardam os resultados das culturas e respectivos antibiogramas. A escolha de antibióticos para implementação de uma terapêutica empírica deve ser baseada na severidade da infecção, tendo em conta os factores de riscos e doenças subjacentes, os

conhecimentos de epidemiologia e fenótipos de resistência locais e nos parâmetros fármaco-cinéticos requeridos (Giamarellou H., 2002).

O relatório da Comissão de Controlo da Infecção Hospitalar do Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal, avaliou, no período entre 2003 e 2005, as resistências dos isolados de *P. aeruginosa* aos antibióticos ciprofloxacina, imipenemo e piperacilina/tazobactam, de amostras provenientes da enfermaria de Medicina. A resistência à ciprofloxacina aumentou de 31,9% em 2003, para 34,8% em 2005; o imipenemo apresentou taxas de resistência de 15% e 16,4% em 2003 e 2005, respectivamente e a percentagem de resistência da piperacilina/tazobactam diminuiu de 7,8% em 2003 para 3,3% em 2005. As taxas de resistência apresentadas por este hospital são bastante inferiores às descritas no nosso estudo o que se pode justificar pela evolução temporal das resistências, e por só ter sido considerada uma enfermaria.

No Centro Hospitalar de Coimbra, entre 2003 e 2006, 85,1% dos isolados hospitalares eram sensíveis à piperacilina com o tazobactam, seguindo-se o meropenemo (84,8%) e a piperacilina (81,5%). A ceftazidima inibiu 79,4% destes isolados, o aztreonamo 75% e o imipenemo foi o pior β-lactâmico (74,7%) (Cardoso *et al.*, 2007). Comparando com os resultados deste trabalho, observou-se uma diminuição da eficácia em relação a todos os antibióticos β-lactâmicos e uma maior susceptibilidade aos aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina. O aminoglicosídeo, amicacina, mostrou continuar a ser muito eficaz podendo ser considerado uma boa opção terapêutica. As alterações de susceptibilidade podem dever-se à diferença do número de amostras estudadas e ao período de tempo dos estudos.

No relatório do *National Nosocomial Infection Surveillance System Report* (2004), comparando o período de 1998-2002 com o ano de 2003, foram descritos, aumentos de resistência da ordem dos 15% relativamente ao imipenemo, 9% em relação às quinolonas e 20% quanto às cefalosporinas de 3ª geração, estando concordantes com os resultados aqui presentes.

Também os relatórios de um estudo espanhol, realizado no ano de 2003, sobre a evolução das resistências a antimicrobianos em *P. aeruginosa*, referiram o aumento de resistências aos carbapenemos e às fluoroquinolonas, tendo-se mantido estável a percentagem de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e aos aminoglicosídeos, quando comparado, com o estudo realizado em 1998 (Sánchez-Romero *et al.*, 2007).

O trabalho desenvolvido por Crespo e colaboradores (2004), referiu taxas de resistência bastante superiores às deste estudo, em que a prevalência de estirpes de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo, num centro médico de Cali, na Colômbia, subiu de 2% em 1996 para 28% em 1997 e para 40% em 2003 (Crespo *et al.*, 2004).

O aumento da utilização dos carbapenemos e dos outros  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro resultou no desenvolvimento de maior número de estirpes de *P. aeruginosa* resistentes aqueles antibióticos. (Wang *et al.*, 2006)

O meropenemo, neste trabalho, mostrou-se mais eficaz que o imipenemo, à semelhança do que se observou noutros estudos que compararam a actividade anti-microbiana destes dois carbapenemos, demonstrando que o meropenemo apresentou actividade *in vitro* superior contra microrganismos de Gram-negativo, como a *Pseudomonas aeruginosa*. (Livermore, 2002)

## 2.1. Multiresistência

A análise do programa SENTRY revelou que, em 5 anos de estudo de isolados provenientes de hemoculturas, a ocorrência de estirpes de *P. aeruginosa* multiresistentes era maior na América Latina (12,0-17,6%), seguido da Europa (5,0%-14%) e América do Norte (1,6%-2,5%). (Deshpande L.M. *et al.*, 2004). Os resultados apresentados são superiores (28,8%) aos revelados pelo estudo SENTRY, salientando, porém, que o período de estudo SENTRY foi bastante superior e muito anterior. Há ainda, o facto de as amostras estudadas terem sido exclusivamente hemoculturas.

O estudo realizado nos CHC, entre Abril de 2003 e Abril de 2006, demonstrou que cerca de 9,1% dos isolados de infecções nosocomiais eram multi-resistentes. (Cardoso *et al.*, 2007). Apesar de os resultados deste trabalho, mostrarem uma multiresistência superior, de 28,8%, a amostragem é bem mais pequena e foi, apenas, considerado um ano de estudo (2007-2008).

Toleman e colaboradores (2005) mostraram que 8% das estirpes de *P. aeruginosa* colhidas entre 1999 e 2002, em distintos hospitais italianos, para realização do programa SENTRY, eram multiresistentes. Apesar da percentagem de multiresistência apresentada pelo estudo italiano, ser bastante inferior aos valores aqui mostrados, o período de recolha é muito maior e bastante anterior aos do presente trabalho.

No estudo realizado por Wang e colaboradores (2006) foram isoladas *P. aeruginosa pan* resistentes em 37 doentes, durante o ano de 2003. O critério de *pan* resistência foi definido como sendo resistente a todos os antibióticos anti-pseudomonas disponíveis comercialmente (ceftazidima, cefepima, ticarcilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam, aztreonamo, imipenemo, meropenemo, gentamicina, amicacina, levofloxacina e ciprofloxacina). Falagas e colaboradores (2007) definiram *pan* resistência quando a estirpe de *P. aeruginosa* isolada é resistente às sete classes de antibióticos anti-pseudomonas

disponíveis (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactamos, quinolonas, aminoglicosídeos e polimixinas). Considerando estes critérios e perante os resultados obtidos no nosso estudo, é legítima a preocupação e apreensão visto que, dos 236 isolados, 58 (24,6%) mostraram-se resistentes a mais de sete antibióticos (imipenemo, meropenemo, ceftazidima, cefepima, piperacilina, piperacilina/tazobactam, aztreonamo e ciprofloxacina) e um (2,4%) foi resistente a todos os antibióticos testados (incluindo os aminoglicosídeos). As razões para tão elevada resistência podem dever-se ao uso abusivo destes antibióticos, por longos períodos de tempo (Wang *et al.*, 2006; Bellido, 2008) e ao número de mecanismos de resistência que estes microrganismos são capazes de acumular. O estudo realizado por Hocquet e colaboradores (2007) mostrou que 64% (de um universo de 120 amostras) dos isolados possuía entre um a seis mecanismos de resistência (hiper-produção de AmpC, hiper-expressão das bombas de efluxo, mutações nos alvos de acção das fluoroquinolonas, deficiente produção de porina OprD; produção de β-lactamases e de enzimas modificadores de aminoglicosídeos) e que tal acumulação de mecanismos independentes permite que as estirpes se tornem resistentes a um grande número de antibióticos. (Hocquet *et al.*, 2007).

## **2.2. Inconsistência dos métodos semi-automáticos**

Para que a vigilância da percentagem de resistências em *P. aeruginosa* seja consistente, é importante estabelecer métodos de referência-qualidade concordantes, de modo a que as alterações da susceptibilidade sejam convenientemente relatadas. Os testes microbiológicos de rotina feitos com equipamentos automáticos, podem produzir resultados imperfeitos para este microrganismo, perante alguns antibióticos (Jones, 2001). As maiores incongruências observaram-se nas eficácias da cefepima, ceftazidima e piperacilina, cujas diferenças de susceptibilidades entre os métodos de Kirby Bauer e o automático (MicroScan WalkAway) foram, respectivamente de 39,4%, 41,6% e 21,2%. Estes resultados estão de acordo com as elevadas taxas de falsas resistências em relação à cefepima, referidas por Jones e colaboradores (1998) que, à *posteriori*, podem levar a inexactidões na percepção das susceptibilidades de *P. aeruginosa*.

Sader e colaboradores (2006) fizeram um estudo comparativo dos resultados dos antibiogramas de *P. aeruginosa* entre três aparelhos automatizados (MicroScan WalkAway, VITEK e VITEK 2) e os resultados de 3 métodos de referência (CLSI). As diferenças das taxas de susceptibilidade encontradas entre o equipamento MicroScan WalkAway e os métodos de consenso foram semelhantes aos do trabalho aqui apresentado, principalmente

em relação à cefepima, cuja diferença é de 20%. (Sader *et al.*, 2006). Além de resultados falsos resistentes, Sader e colaboradores, encontraram, também, uma alta taxa de falsos susceptíveis que não foi observada neste trabalho. Porém, apenas se utilizou um dos métodos de referência para comparação dos resultados enquanto que no trabalho de Sader e colaboradores, os resultados dos equipamentos foram comparados com 3 métodos de referência.

Visto que os resultados dos equipamentos automatizados têm um grande impacto no posicionamento dos antibióticos anti-pseudomonas, nos programas internacionais de vigilância, e que estes servem de base para a implementação de terapêuticas empíricas, torna-se premente a reavaliação dos algoritmos interpretativos daqueles sistemas, em relação a *P. aeruginosa*, de modo a minimizar ou mesmo eliminar os erros detectados (Sader *et al.*, 2006).

### 3. DETECÇÃO DE $\beta$ -LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs)

As enzimas encontradas em *P. aeruginosa* pertencentes ao grupo das ESBL são TEM, SHV, PER, GES, VEB e OXA. O perfil de resistência que lhes é imputado e a sua ampla distribuição geográfica são motivos de grande preocupação (Bradford P., 2001; Pagan *et al.*, 2004; Peterson & Boom, 2005; Pore *et al.*, 2002; Pore *et al.*, 2003; Pore *et al.*, 2005; Vahaboglu *et al.*, 2001; Yamano *et al.*, 2006).

Num estudo realizado num hospital polaco, foram pesquisadas  $\beta$ -lactamases de largo espectro em 132 isolados de *P. aeruginosa* de doentes internados. (Sacha *et al.*, 2004) A pesquisa foi feita utilizando o método de sinergia de duplo disco e, à semelhança do estudo aqui realizado, não foi detectada nenhuma estirpe produtora de ESBL. Na Índia, foi feito um estudo que relata 20,3% (de um universo de 148 amostras) estirpes produtoras de ESBL (Aggarwal R. *et al.*, 2008).

Weldhagen e colaboradores (2003) referem que resultados positivos pelo teste de sinergia do duplo disco são obtidos com facilidade para estirpes portadoras de VEB-1 e PER-1 mas dificilmente obtidos para estirpes que expressem enzimas do tipo GES.

Por outro lado, não se encontraram relatos, em Portugal, de *P. aeruginosa* produtoras de ESBL, embora, entre 1999 e 2001, um surto de *Klebsiella pneumoniae*, produtora de GES-1, tenha sido detectado, no Hospital de Santa Maria, em Lisboa (Duarte A., *et al.*, 2003).

#### 4. METALO-β-LACTAMASES

*Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-β-lactamases foram descritas, pela primeira vez, no Japão, em 1991 (Watanabe *et al.*, 1991). A partir desta data, numerosos artigos de diferentes países do mundo, relatam não só aparecimento como também surtos, em unidades hospitalares, de isolados de *P. aeruginosa* produtores daquelas enzimas. Assim, surgem publicações da Ásia (Senda *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006); da Europa (Cardoso *et al.*, 2002; Pagani *et al.*, 2004; Tsakiris *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2004; Toleman *et al.*, 2005; Vahaboglu *et al.*, 2001), da América do Norte (Laupland *et al.*, 2005; Lolans *et al.*, 2005), da América Latina (Toleman *et al.*, 2002; Gales *et al.*, 2003; Crespo *et al.*, 2004; Sader *et al.*, 2005; Villegas *et al.*, 2006; Picão *et al.*, 2007) e da Austrália (Peleg *et al.*, 2004; Peleg *et al.*, 2005).

Existem vários testes fenotípicos para a detecção de bactérias produtoras de metalo-β-lactamases e todos eles são baseados na capacidade quelante de metais para inibir a actividade destas enzimas (Pitout *et al.*, 2005).

No presente trabalho utilizou-se o teste do duplo disco imipenemo-EDTA, por ser simples de executar e mostrar elevada sensibilidade e especificidade na detecção de isolados de *P. aeruginosa* produtoras de metalo-β-lactamases (Yong *et al.*, 2002) e por ter sido utilizado em diversos trabalhos (Crespo *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2004; Pitout *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2008).

De 50 amostras com teste fenotípico positivo, em apenas 27 (54%) foi detectado o gene *bla*<sub>VIM-2</sub> pondo em causa o valor preditivo positivo do teste fenotípico. No entanto, verificou-se que se obteve um valor preditivo positivo (100%) quando a diferença de halos de inibição entre imipenemo e imipenemo-EDTA foi superior a 21 mm.

O estudo de Bergès e colaboradores (2007) demonstrou que, de 568 estirpes resistentes aos carbapenemos, 105 revelaram teste fenotípico positivo e destas, 74 eram produtoras de VIM 2 e de IMP. Embora o valor preditivo positivo tenha sido de 70,4% e, assim, superior ao do presente trabalho, não se mostrou satisfatório. Assim, admitiram a hipótese de alguns falsos positivos serem atribuídos ao facto de o EDTA poder aumentar a permeabilidade da parede celular bacteriana e que o zinco (quelatado com o EDTA) acelere a decomposição do imipenemo e diminua a expressão de OprD da *P. aeruginosa* (Bergès *et al.*, 2007; Livermore, 2006).

Um estudo realizado por Samuelsen e colaboradores (2008), em que compararam diferentes métodos fenotípicos para avaliação da presença de metalo-β-lactamases, mostrou um valor preditivo positivo de 29%, bastante inferior ao deste trabalho. Apesar

disso, há que ter em atenção que, comparando com o trabalho agora apresentado, foi utilizada uma concentração menor, de 518 µg/ml de EDTA por disco e um critério de positividade superior, a partir de 8 mm de diferença de halo de inibição. No estudo de Samuelsen e colaboradores, concluíram que uma avaliação cuidada do perfil de susceptibilidade e a inclusão da resistência à ceftazidima como critério adicional à resistência aos carbapenemos, reduziria o número de isolados a serem testados fenotipicamente assim como o número de falsos positivos (Samuelsen *et al.*, 2008).

#### 4.1. Metallo-β-lactamase VIM-2

A metallo-β-lactamase VIM-2 é o subtipo dominante na Europa, tendo sido detectada em isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos, em quase todos os países. Assim, em Portugal (Cardoso *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2005; Quinteira *et al.*, 2005; Quinteira & Peixe, 2006; Pena *et al.*, 2008), em Espanha (Prats *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004), em França (Poirel *et al.*, 2000), na Bélgica (Deplano *et al.*, 2007), em Itália (Pallecchi *et al.*, 2001; Luzzaro *et al.*, 2004), na Grécia (Mavroidi *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2003) e na Croácia (Sardelic *et al.*, 2003) existem trabalhos que descrevem *P. aeruginosa* portadoras do gene *bla*<sub>VIM-2</sub>.

Pena e colaboradores (2008), numa pesquisa realizada em estirpes resistentes ao imipenemo, entre Abril de 2003 e Abril de 2005, no Centro Hospitalar de Coimbra, detectaram 19,4% de isolados portadores do gene *bla*<sub>VIM-2</sub>. Contudo, no presente trabalho (Abril de 2007 a Abril de 2008), a percentagem de estirpes produtoras de VIM-2, provenientes do mesmo hospital, foi mais baixa, de 13,2% (n=12). Já, das amostras recolhidas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, foram obtidos 38,7% (n=15) de isolados produtores de VIM-2, uma percentagem bastante superior à do Centro Hospitalar de Coimbra. Uma taxa semelhante à encontrada nos HUC, foi descrita por Laupland e colaboradores (2005), num estudo feito em Calgary, entre 2002 e 2004, em que se verificaram 39,5% de estirpes produtoras de VIM-2.

Um estudo belga, de 2004 a 2006, com amostras colhidas em 8 hospitais, em que consideraram 127 isolados resistentes ao imipenemo, 86 eram produtores de VIM-2 (67,7%) (Deplano *et al.*, 2007). Também, Lagatolla e colaboradores (2004), num estudo italiano, descreveram a presença do gene *bla*<sub>VIM</sub> em 20% de 70% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo e noutro trabalho, observaram que a percentagem de isolados produtores de VIM foi de 55% em 2000, 80% em 2001 e 82% em 2002 (Lagatolla

*et al.*, 2004; Lagatolla *et al.*, 2006). Embora os resultados do presente estudo mostrem, na generalidade, um número muito menor de isolados produtores de VIM-2, do que os descritos em outros países Europeus, ressalva-se o curto período de recolha das amostras e talvez a introdução mais tardia dos carbapenemos em Portugal.

Na Ásia, estirpes produtoras de VIM-2 são comuns, tendo sido encontradas em 9 de 29 hospitais sul coreanos (Livermore, 2002). O trabalho desenvolvido por Yu e colaboradores em que foram recolhidas 140 amostras resistentes ao imipenemo, de 5 hospitais chineses, mostraram que 10% das estirpes eram produtoras de VIM-2. (Yu *et al.*, 2006).

Analisando estes resultados, observou-se que as percentagens de isolados de *P. aeruginosa*, produtores de metallo-β-lactamases VIM-2, são bastante elevadas e que este gene de resistência (*bla*<sub>VIM-2</sub>), juntamente com outros, que lhe são inerentes, rapidamente a tornam resistente a todos os antibióticos disponíveis. Assim, a detecção precoce daquelas enzimas, por PCR e a vigilância constante através de publicação de resultados podem contribuir para uma prevenção, controlo de infecção e tratamento mais eficazes.

O número de bactérias resistentes ao imipenemo não produtoras de VIM-2 (59% de um total de 122) sugere, haver outros mecanismos de resistência, (não estudados neste trabalho) tais como: deficiente expressão ou ausência da porina OprD, outras β-lactamases, como a AmpC, bombas de efluxo e/ou mutações nos alvos PBPs (Livermore, 2001). Pena e colaboradores (2008) apresentaram 80,6% de estirpes resistentes ao imipenemo, não produtoras de VIM-2. Em Espanha, Sánchez e colaboradores (2004), relataram quatro estirpes (3%) de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2, de um universo de 133 isolados resistentes aos carbapenemos (imipenemo e/ou meropenemo). Também, num trabalho Brasileiro se referiu que, 81,1% das estirpes eram resistentes ao imipenemo sem produção de metallo-β-lactamases. (Marra *et al.*, 2006). Embora estes números sejam bastante superiores aos do presente estudo, todos corroboraram a hipótese de haver outros mecanismos de resistência ou até mesmo outra metallo-β-lactamase cujo gene não tenha sido amplificado com os *primers* testados.

Pesquisaram-se, também, através da técnica de PCR, a presença de genes de outras metallo-β-lactamases (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GIM</sub> e *bla*<sub>SPM</sub>) nas 50 amostras com o teste fenotípico positivo, mas nenhuma foi detectada, o que leva a pressupor que pelo menos das metallo-enzimas descritas na literatura, apenas a VIM-2 se encontra em Portugal.

#### 4.2. Susceptibilidade dos Isolados Produtores de VIM-2

No presente estudo, todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VIM-2 apresentaram resistência ao imipenemo, com CMI > 32 µg/ml. Contudo, à semelhança do que outros investigadores descreveram, ainda se observaram 14,8% isolados susceptíveis ao meropenemo. (Poirel *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002; Prats *et al.*, 2002)

A ceftazidima revelou-se muito pouco eficaz, com apenas 25,9% de susceptibilidade, como também referiram outros autores, desaconselhando-se a administração empírica deste antibiótico quando em presença de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos. (Poirel *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2001; Prats *et al.*, 2002; Lolans *et al.*, 2005).

O aztreonamo foi o que mostrou melhor actividade, de 81,5%, perante os isolados clínicos produtores de VIM-2. No entanto, num estudo desenvolvido por Cardoso e colaboradores (2002) este antibiótico demonstrou eficácia em todas as estirpes testadas. Por outro lado, Gutiérrez e colaboradores (2007) descreveram uma resistência de 53% ao aztreonamo, podendo estar subjacentes, outros mecanismos de resistência. Resultados semelhantes aos do presente trabalho, foram observados em França (Poirel *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2001); Itália (Pallechi *et al.*, 2001) e Estados Unidos (Lolans *et al.*, 2005).

A piperacilina revelou uma eficácia de 66,7%. Taxas de menor susceptibilidade são descritas por Yu e colaboradores (2006). No entanto, a piperacilina tem revelado melhor actividade noutros estudos nomeadamente no de Pena e colaboradores (2008). Outros trabalhos, como os publicados por Poirel e colaboradores (2000 e 2001) e Deplano e colaboradores (2007) têm referido também, susceptibilidade à piperacilina nos isolados produtores de VIM-2.

### 5. INTEGRÕES

A resistência de alguns isolados a todos os antibióticos existentes parece estar a crescer contribuindo, para isso, o aparecimento de integrões que transportam cassetes genéticas, que codificam carbapenemases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Livermore, 2002).

Os genes para as enzimas VIM e IMP têm sido descritos como codificados em cassetes, que se encontram em integrões cuja organização facilita a recombinação genética (Livermore, 2002).

Uma vez adquirida a resistência através de genes localizados em integrões ou plasmídeos, a estirpe pode passar do hospedeiro para outros doentes e a resistência pode disseminar-se para outros microrganismos (Livermore, 2002; Yu *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foram identificados 11 integrões de classe 1, (em que 7 pertenciam a isolados provenientes dos HUC e 4 pertenciam a amostras colhidas nos CHC) o que corresponde a 40,7% dos isolados produtores de VIM. Contudo, um estudo grego, de âmbito idêntico, descreveu 94,4% de integrões de classe 1 (Giakkoupi *et al.*, 2003). Yu e colaboradores detectaram integrões de classe 1 em 85,7% dos isolados produtores de VIM (Yu *et al.*, 2006).

Neste estudo, a pesquisa de integrões de classe 1 revelou a presença de amplicões com os tamanhos de 1 Kb, 2 Kb e 3 Kb, estando concordante com o trabalho de Giakkoupi e colaboradores, cujos tamanhos variaram entre 1 Kb e 3 Kb (Giakkoupi *et al.*, 2003).

A diferença de tamanhos dos integrões de classe 1 detectados parece sugerir 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. RAPD**

O método de RAPD é baseado na utilização de primers com cerca de 9 a 10 nucleótidos que hibridizam com o DNA a baixas temperaturas, de modo aleatório, obtendo-se 1 perfil de bandas que deverá ser único para cada estirpe ou estirpes relacionadas (Olive *et al.*, 1999).

A técnica de RAPD revelou, em geral, boa reprodutibilidade na identificação dos vários perfis e mostrou-se capaz de distinguir estirpes, aparentemente, não relacionadas (Campbell *et al.*, 2000; Mahenthalingam *et al.*, 1996; Giske *et al.*, 2006).

Seguindo os critérios de Campbell e colaboradores (2000), foi observada uma diversidade grande entre as estirpes, tendo sido obtidos 14 perfis de RAPD, de A a O, o que pode ser explicado por múltiplos eventos independentes. Também Giakkoupi e colaboradores (2003), num estudo realizado em 9 hospitais gregos obtiveram 16 perfis de RAPD, a partir de 36 estirpes produtoras de VIM-2; sugerindo que a grande diversidade de perfis encontrados possa indicar uma ampla distribuição de genes *bla*<sub>VIM-2</sub> entre estirpes de *P. aeruginosa* geneticamente distintas. Esta propagação de genes é facilitada pelo seu transporte em integrões que, embora não sejam móveis, podem fazer parte de transposões e/ou de plasmídeos transferíveis (Giakkoupi *et al.*, 2003).

Analisando os resultados, verificou-se que 25,9% (n=7) das estirpes produtoras de VIM-2 apresentaram perfil idêntico, perfil A, presumindo, assim, que um mesmo clone possa estar disseminado pelos doentes internados nas três unidades de internamento (Neurotraumatologia, Cirurgia III e Unidade de Transplantes Hepáticos) dos HUC. Além disso, todos os isolados pertencentes a este perfil apresentaram integrões de classe 1 com diferentes tamanhos de 1 kb e 3 kb sugerindo a capacidade de propagação dos genes *bla<sub>VIM-2</sub>* (Giakkoupi *et al.*, 2003). O isolamento de estirpes com perfis moleculares idênticos sugere a origem a partir de um mesmo clone tornando provável a transmissão doente/doente e/ou através de fontes comuns (Driscoll *et al.*, 2007).

O perfil B é constituído apenas por dois isolados colhidos do mesmo doente da Unidade de Transplantes. A este doente, foi também colhido o isolado pertencente ao perfil E. Perante estes dados, poderá pressupor-se que, na Unidade de Transplantes Hepáticos, haverá, pelo menos, três clones diferentes de *P. aeruginosa* (correspondentes aos perfis A, B e E). Nenhuma das estirpes dos perfis B e E, pertencentes ao mesmo doente, apresentaram integrões.

Nos serviços de Cardiologia e Medicina I dos HUC foram isoladas duas estirpes com o mesmo perfil de RAPD, perfil C.

Os perfis D, F e G pertencem a clones distintos sendo provenientes de amostras de enfermarias de Urgência, Infecto-Contagiosas e Ortopedia D. O doente da amostra colhida na Urgência tinha estado previamente internado no serviço de Medicina II. A unidade de Ortopedia situa-se afastada do Hospital Central podendo explicar o aparecimento de uma estirpe diferente das outras.

Relativamente ao Centro Hospitalar de Coimbra observaram-se 5 isolados com o perfil H e todos eles pertencem a amostras do Hospital Pediátrico, pressupondo-se que um mesmo clone esteja disseminado por este Hospital. (Yu *et al.*, 2006). Três dos isolados deste perfil apresentaram integrões de classe 1, em que dois deles mostravam amplicões de 3000 pb e o outro mostrava dois amplicões de 1000 pb e 3000 pb. A diferença de tamanho dos integrões detectados poderá reflectir a evolução de um integrão ou a aquisição da cassete genética *bla<sub>VIM-2</sub>* por diferentes integrões de classe 1 (Giakkoupi *et al.*, 2003). O facto de ter sido observado um mesmo perfil em isolados no Hospital Pediátrico, diferente de todos os outros poderá dever-se à ausência de deslocações de doentes entre as Unidades Pediátricas e outras Unidades Hospitalares. De ressaltar ainda, que estes 5 doentes eram todos menores de um ano de idade.

Das unidades de Pneumologia e Neurocirurgia foram provenientes duas amostras cujos isolados pertencem ao mesmo perfil, perfil I havendo, assim, probabilidade de um

mesmo clone se ter propagado nestas duas enfermarias; talvez por existirem falhas na implementação das medidas do controlo da infecção.

O perfil J é único do qual faz parte um isolado do Hospital de Pombal, podendo justificar-se a sua singularidade pela distância física que o separa dos outros hospitais.

Os perfis M, N, O são distintos entre si e de todos os outros mas pertencem a isolados de doentes internados na mesma enfermaria, enfermaria de Medicina dos CHC. O perfil M apresenta um integrão de classe 1 de 2kb sugerindo uma maior facilidade de disseminação.

Torna-se importante tentar compreender a distribuição dos microrganismos no hospital e perceber se a sua disseminação é causada por uma ou várias estirpes, no sentido de minimizar a sua transmissão e propagação (Singh *et al.*, 2006).

## **CONCLUSÃO**

---



*P. aeruginosa* continua a ser um patogénico importante e responsável por um grande número de infecções nosocomiais.

No presente estudo foram detectados 22,1% de estirpes produtoras de VIM-2 das quais 40,7% possuíam integrões de classe 1 o que sugere o potencial de disseminação das metalo- $\beta$ -lactamases e confirma a crescente relevância clínica destas enzimas. Apesar disso, os 14 padrões obtidos por tipagem RAPD demonstraram a existência de diferentes clones, o que parece querer dizer existirem várias estirpes diferentes de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2 dispersas pelos dois hospitais e não estarmos perante uma estirpe única, o que sugeriria a hipótese de surto nosocomial.

Os resultados deste trabalho alertam para a possibilidade de disseminação dos genes de metalo- $\beta$ -lactamases, entre patogénicos nosocomiais de Gram-negativo, poder surgir como um grave problema hospitalar e sustentam a necessidade de vigilância constante dos determinantes da resistência assim como o conhecimento actualizado da epidemiologia de cada hospital.

Torna-se essencial compreender a distribuição dos microrganismos e a sua relação para determinar a epidemiologia da infecção nosocomial e ajudar no desenho de métodos racionais de controlo patogénico.



## **BIBLIOGRAFIA**

---



- **AArestrup F.M. 2006**; Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin; pag.78; ASM Press.
  
- **Aboufaycal H., H.S. Sader, K. Rolston, L.M. Deshpande, M. Toleman, G. Bodey, I. Raad, R.N. Jones. 2007.** *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>VIM-7</sub> Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Detected in a Tertiary Care Medical Centre in the United States: Report from the MYSTIC Program. *Journal of Clinical Microbiology* **45** (2): 614-615.
  
- **Aggarwal R., Chaudhary U., Bala K. 2008.** Detection of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* **51**(2): 222-224.
  
- **Aibinu I.; Nwanneka T., Odugbemi T. 2007.** Ocurrence of ESBL and MBL in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Lagos, Nigeria. *Journal of American Science* **3**(4): 81-85
  
- **Ambler R.P. 1980.** The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **289**:321-331.
  
- **Anglada R.; 1997.** Microbiologia Sanit aria e Clínica, Sintesis Editorial.
  
- **Aubert D., D. Girlich, T. Naas, S. Nagarajan, P. Nordmann. 2004.** Functional and structural characterization of genetic environment of an extended spectrum beta-lactamase *bla*<sub>VEB</sub> gene from *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(9):3284-3290.
  
- **Bahar G., A. Mazzariol, R. Koncan, A. Mert, R. Fontana, G.M. Rossolini, 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.
  
- **Baldwin C.M., K.A. Lyseng-Williamson., S.J. Keam. 2008.** Meropenem A Review of its Use in the Treatment of Serious Bacterial Infections. *DRUGS* **68** (6): 803-838.

- **Bellido J.L.M. 2008.** Bacterias problemáticas. *Revista Española de Quimioterapia* 21 (1): 2-6.
- **Bennett P.M. 1999.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 1-4.
- **Bergès L., H. Rodriguez-Villalobos, A. Deplano, M.J. Struelens. 2007.** Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and E-test for detection of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 812-813
- **Bouza E., F. Gacia-Garrote, E. Cercenado, M. Marín, M.S. Díaz, I.S. Romero, A. Vindel. 2003.** *Pseudomonas aeruginosa*: Estúdio multicéntrico en 136 hospitales españoles. *Revista Española de Quimioterapia* 16 (1): 41-52.
- **Bradford P.A., 2001.** Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21<sup>st</sup> Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14(4): 933-951
- **Bush K., G. Jacoby, A.A. Medeiros. 1995.** A functional classification for β-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 1:509-515
- **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., R. Leitão. 2007.** Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de um hospital central de Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*. Maio>Agosto: 56-62
- **Cardoso O., R. Leitão, A. Figueiredo, J.C. Sousa, A. Duarte e L.V. Peixe. 2002.** Metallo-β-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*. 8:93-97.

- **Carvalho M.J., M.J. Saavedra, A. Correia, A.P. Castro, 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* **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.
  
- **Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007.** Performance standards for microbial susceptibility testing seventeenth informational supplement M100-S17. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.*
  
- **Cornaglia G., A. Mazzariol, L. Lauretti, G.M. Rossolini, 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.
  
- **Crespo M.P., N. Woodford, A. Sinclair, M.E. Kaufman, J. Turton, J. Glover, J.D. Velez, C.R. Castañeda, M. Recalde, D. Livermore. 2004.** Outbreak of Carbapenem-Resistente *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- $\beta$ -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colômbia. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (11): 5094-5101
  
- **Deplano A., H. Rodriguez-Villalobos, Y. Glupczynski, P. Bogaerts, D. Allemeersch, A. Grimmelprez, G. Mascart, L. Bergès, C. Laurent, B. Byl, M.J. Struelens. 2007.** Emergence and dissemination of multidrug resistant clones of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in Belgium. *Eurosurveillance* **12** (18)
  
- **Deshpande L.M., T.R. Fritsche, R.N. Jones. 2004.** Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: A global report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **49**: 231-236.
  
- **Driscoll J.A., L. Steven, B.M. H. Kollef. 2007.** The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* **67** (3):351-368

- **Duarte A., F. Boavida, F. Grosso, M. Correia, L.M. Lito, J.M. Cristino, M.S. Salgado. 2003.** Outbreak of GES-1 β-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (4): 1481-1482.
- **European Medicines Authority.** Summary of product characteristics: Doribax [online]. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/doribax/doribax.htm>
- **Falagas M.E., I.A. Bliziotis 2007.** Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**: 630-636.
- **Ferreira W., J.C. Sousa. 2000.** Microbiologia,; vol.2:123-135; Lidel.
- **Fluitz A.C., F.J. Schmitz. 1999.** Class 1 Integrons, Gene Cassettes, Mobility, and Epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**: 761-770
- **Fluitz A.C., F.J. Schmitz. 2004.** Resistance integrons e super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 272-288
- **Fiett J., A. Baranjak, A. Mrówka, M. Fleischer, Z. Drulis-Kawa, L. Naumiuk, A. Samet, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski. 2006.** Molecular Epidemiology of Acquired-Metallo-β-Lactamase-Producing Bacteria in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50** (3): 880-886.
- **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-β-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 699-702.
- **Giamarellou H. 2002.** Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 229-233.
- **Giakkoupi P., G. Petrikos, L.S. Tsouvelekis, S. Tsonas, The Whonet Greece Study Group, N.J. Legakis, A.C. Vatapoulos. 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** (2): 822-825.
- **Giske C.G., B. Libisch, C. Colinon, E. Scoulica, L. Pagani, M. Fuzi, G. Kronvall, G. Rossolini. 2006.** Establishing Clonal Relationships between VIM-1-Like Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains from four European Countries by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **44** (12): 4309-4315.
  - **Gutiérrez O., C. Juan, E. Cercenado, F. Navarro, E. Bouza, P. Coll, J.L. Pérez, A. Oliver. 2007.** Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51** (12): 4329-4335.
  - **Henrichfreise B., I. Wigand, K.J. Sherwood, B. Wiedemann. 2005.** Detection of VIM-2 Metallo- $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (4):1668-1669.
  - **Hocquet D., P. Berthelot, M. Roussel-Delvallez, R. Favre, K. Jeannot, O. Bajolet, N. Marty, F. Grattard, P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen, M.O. Husson, G. Cuetdic, P. Plésiat. 2007.** *Pseudomonas aeruginosa* May Accumulate Drug Resistance Mechanisms without Losing Its Ability to Cause Bloodstream Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51** (10): 3531-3536
  - **Houvinen P., S. Houvinen, G.A. Jacoby. 1988.** Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**: 134-136
  - **Jacoby G., K. Bush. 2008.** Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamase. *Lahey Clinic* [online] <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., D.J. Biedenbach, S.A. Marshall, M.A. Pfaller, G.V. Doern. 1998.** Evaluation of the Vitek System to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against cefepime. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **32** (2): 107-110.
- **Jones R.N. 2001.** Method preferences and test accuracy of antimicrobial susceptibility testing: updates from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **25** (10): 1285-1289.
- **Keam S.J. 2008.** Doripenem. A Review of its Use in the Treatment of Bacterial Infections. *DRUGS* **68** (14): 2021-2057
- **Kimura S., J. Alba, K. Shiroto, R. Sano, Y. Niki, S. Maesaki, K. Akizawa, M. Kaku, Y. Watanuki, Y. Ishii, K. Yamaguchi. 2005.** Clonal Diversity of metallo-β-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in Geographically Diverse Regions of Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (1): 458-461.
- **Koneman E., S. Allen, W. Janda, P. Schreckenberger, W. Winn. 1997.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, ; Lippincott Williams & Wilkins, Fifth edition.
- **Lagatolla C., E.A. Tonin, C. Monti-Bragadin, L. Dolzani, F. Gombac, C. Bearzi, E. Edalucci, F. Gionchetti, G.M. Rossolini. 2004.** Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-β-lactamase determinants in European hospital. *Emerging Infectious Diseases* **10**: 535-538.
- **Lagatolla C., E. Edalucci, L. Dolzani, M.L. Riccio, F.D. Luca, E. Medessi, G.M. Rossolini, E.A. Tonin. 2006.** Molecular Evolution of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in a Nosocomial Setting of High-Level Endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 2348-2353.
- **Laupland K.B., M.D. Parkins, D.L. Church, D.B. Gregson, T.J. Louie, J.M. Conly, S. Elsayed, J. Pitout. 2005.** Population-Based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of Metallo-β-Lactamase-producing strains. *The Journal of Infectious Diseases* **192**(9): 1606-1612

- **Lauretti L., M.L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, G.M. Rossolini. 1999.** Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in Metallo-β-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1053-1058.
- **Lee K., J. B. Lim, J. H. Yum, D. Yong, Y. Chong, J.M. Kim, D.M. Livermore. 2002.** *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**:1053-1058
- **Lee K., Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum, Y. Chong. 2003.** Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4623–4629.
- **Lee K., J.H. Yum, D. Yong, H.M. Lee, H.D. Kim, J.D. Docquier, G.M. Rossolini, Y. Chong. 2005.** Novel Acquired Metallo-β-Lactamase Gene, *bla*<sub>SIM-1</sub>, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (11):4485-4491
- **Lee Y.C., B.J. Ahn, J.S. Jin, J.U. Kim, S.H. Lee, D.Y. Song, W.K. Lee, J.C. Lee. 2007.** Molecular Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Resistant to All Antimicrobial Agents, but Susceptible to Colistin, in Daegu, Korea. *The Journal of Microbiology* **45** (4): 358-363.
- **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.
- **Livermore D.M. 1995.** β-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **8**: 555-584
- **Livermore D.M., N. Woodford. 2000.** Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology*. **3**:489-495.

- **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. 2006** British Society for Antimicrobial Chemotherapy [http://www.bsac.org.uk/\\_db/\\_downloads/b-lacs\\_bsac\\_London\\_03](http://www.bsac.org.uk/_db/_downloads/b-lacs_bsac_London_03).
- **Lolans K., A.M. Queenan, K. Bush, A. Sahud, J.P. Quinn. 2005.** First Nosocomial Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Producing an Integron-Borne Metallo-β-Lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (8): 3538-3540.
- **Mahenthiralingam E., M. Campbell, J. Foster, J.S. Lam, D.P. Speert. 1996.** Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolate recovered from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:1129-1135.
- **Mahon C.R., Manuselis G. 2000.** *Textbook of Diagnostic Microbiology*, pag. 547; Saunders, 2<sup>nd</sup> Edition.
- **Marchiaro P., P.E. Tomatis, M.A. Mussi, F. Pastern, A.M. Viale, A.S. Limansky, A.J. Vila. 2008.** Biochemical Characterization of Metallo-β-Lactamase VIM-11 from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52** (6): 2250-2252.
- **Marra A.R., C.P. Pereira, A.C. Gales, L.C. Menezes, R.R. Cal, J.A. de Souza, M.B. Edmond, C. Faro, S. B. Wey. 2006.** Bloodstream Infections with Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50** (1): 388-390.

- **Martínez F.C., P.B. Ruiz, P.M. Mañas 2003.** Situación actual de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia* **16(4)**: 450-452
  
- **Mavroidi A., A. Tsakris, E. Tzelepi, S. Pournaras, V. Loukova, L.S. Tzouvelekis. 2000.** Carbapenem-hidrolising VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 1037-1046.
  
- **Mendes R.E., M. Castanheira, P. Garcia, M. Guzman, M. Toleman, Walsh T.R., R.N. Jones. 2004.** First isolation of a *bla*<sub>VIM-2</sub> in Latin America: Report from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48(4)**: 1433-1434.
  
- **Mendes R.E., M.A. Toleman, J. Ribeiro, H.S. Sader, R.N. Jones, 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')-30iaac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4693-4702.
  
- **Mereuță A.I., Docquier J.D., G.M. Rossolini, D. Buiuc. 2007** Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase in Gram-negative bacilli isolated in hospitals from Romania. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.* **52(1-2)**: 45-9.
  
- **Mesaros N., P. Nordmann, P. Plésiat, M. Roussel-Delvallez, J. Van Eldere, Y. Glupczynski, Y. Van Laethem, F. Jacobs, P. Lebecque, A. Malfroot, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke. 2007.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection* **13**: 560-578
  
- **Morita K., R. Rapp, C. Martin, S. Overman, J. Ribes, L.M. Deshpande, H.S. Sader, R.N. Jones. 2006.** Carbapenem Resistance among *P. aeruginosa* isolated in an USA Medical Center: Report of Osteomyelitis Caused by an IMP-15 Producing Strain. <http://www.jmilabs.com/data/posters/IDSA2006/LB13.pdf>
  
- **Murphy R. 2001.** Implementation of Strategies to Control Antimicrobial Resistance. *CHEST* **119**: 405-411

- **Nishio H., M. Komatsu, N. Shibata, N. 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, Y. Arakawa. 2004.** *American Journal of Infection Control* **42**: 5256-5263
- **Nordmann P., L. Poirel. 2002.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* **8** (6): 321-331
- **Olive D.M., P. Bean. 1999.** Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (6):1661-1669.
- **Ouellete M., L. Bissonnette, P.H. Roy. 1987.** Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of OXA-1-b-lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 7378-7382
- **Pagani L., Mantengoli E., Migliavacca R., Núcleo E., Pollini S., Spalla M., Daturi R., Romero E., Rossolini G.M.. 2004.** Multifocal Detection of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (6): 2523-2529
- **Pagani L., C. Colinon, R. Migliavacca, M. Labonia, J.D. Docquier, E. Núcleo, M. Spalla, M.L. Bergoli, G.M. Rossolini. 2005.** Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-β-lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 3824-3828
- **Paterson D.L., Bonomo R.A. 2005.** Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. **18**(4): 657-686
- **Peleg A.Y., C. Franklin, J. Bell, D.W. Spelman. 2004.** Emergence of IMP-4 metallo-β-lactamase in a clinical isolate from Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 699-700
- **Peleg A.Y., C. Franklin, J. Bell, D.W. Spelman. 2005.** Dissemination of the metallo-β-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): 1419.
  - **Pena A., J.Martins, A.M. Donato, R. Leitão, 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.
  - **Pena A., A.M. Donato, A.F. Alves, R. Leitão, O. Cardoso. 2008.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in a central hospital from Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*
  - **Picão R.C., A.C. Gales. 2007.**  $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só imaginação? *Prática Hospitalar* **49**: 79-84
  - **Pitout J., Gregson D., L. Poirel, J-A. McClure, P. Le, D. Church. 2005.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- $\beta$ -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (7): 3129-3135.
  - **Pitout J., B.L. Chow, D. Gregson, K.B. Laupland, S. Elsayed, D.L. Church. 2007.** Molecular Epidemiology of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Emergence of VIM-2-Producing Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **45** (2): 294-298.
  - **Poirel L., T. Naas, L. Collet, S. Bellais, J.D. Cavallo, P. Nordmann. 2000.** Characterization of VIM-2, carbapenem-hidrolysing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**:891-897.

- **Poirel L., T.Lambert, S. Türkoglü, E. Ronco, J.L. Gaillard, P. Nordmann. 2001.** Characterization of Class 1 Integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and of two aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**:546-552.
- **Poirel L., Weldhagen G.F., Naas T., De Champs C., Dove M.G., Nordmann P. 2001.** GES-2, a class A lactamases from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**:2598-2603.
- **Poirel L., Weldhagen G.F., C. De Champs, P. Nordmann. 2002.** A Nosocomial Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Expressing the Extended-Spectrum β-Lactamase GES-2 in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 561-565.
- **Poirel L., Menuteau O., Agoli N., Cattoen C., Nordmann P. 2003** Outbreak of Extended-Spectrum β-Lactamase VEB-1-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(8):3542-3547.
- **Poirel L., L. Brinas, N. Fortineau, P. Nordmann. 2005.** Integron-Encoded GES-Type Extended-Spectrum β-Lactamase with Increased Activity toward Aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(8):3593-3597.
- **Pournaras S., M. Maniati, E. Petinaki, L.S. Tzouvelikis, A. Tsakaris, N.J. Legakis, A.N. Maniatis. 2003.** Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-β-lactamase gene variants *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>VIM-4</sub>. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 1409-1414.
- **Prats G., E. Miro, B. Mirelis, L. Poirel, S. Bellais, P. Nordmann. 2002.** First Isolation of a Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(3): 932-933
- **Queenen A.M., K. Bush. 2007.** Carbapenemases: the Versatile β-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* **20** (3): 440-458.

- 
- **Quinteira S., J.C. Sousa, L. Peixe. 2005.** Characterization of In 100, a New integron Carrying a Metallo- $\beta$ -Lactamase and a Carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(1): 451–453.
  
  - **Quinteira S., 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? *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(5): 3743-3745.
  
  - **Rasmussen J.W., N. Høiby. 2006.** OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **57**: 373-383
  
  - **Rechia G.D., R.M. Hall. 1995.** Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141**: 3015-3027
  
  - **Rossolini G.M., Mantengoli E. 2005.** Treatment and Control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection* **11**(suppl.4):17-32.
  
  - **Shah P.M, R.D. Isaacs. 2003.** Ertapenem, the first of a new group of carbapenemos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:538-542.
  
  - **Sacha PT, Jakoniuk P, Wieczorek P, Zalewska M, Leszczyńska K. 2004.** Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia* **56**(3): 263-273.
  
  - **Sader H.S., A.O. Reis, S. Silbert, A.C. Gales. 2005.** IMPs VIMs e 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, R.N. Jones. 2005.** Dissemination and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in Latin America: report

from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International of Journal Antimicrobial Agents* **25**: 57-61.

- **Sader H.S., T.R. Fritsche, R.N. Jones. 2006.** Accuracy of Three Automated Systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* against Five Broad-Spectrum Beta-Lactam Agents. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(3):1101-1104
- **Samuelsen Ø., L. Buarø, C.G. Giske, G.S. Simonsen, B. Aasnæs, A. Sundsfjord. 2008.** Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**: 827-830
- **Sánchez A., S. Salso, E. Cuebas, J.J. Picazo. 2004.** Resistência a carbapenemes por metaloenzimas en aislamentos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Española de Quimioterapia* **17** (4): 336-340.
- **Sánchez-Romero I., E. Cercenado, O. Cuevas, N. Garcia-Escribano, J. García-Martinez, E. Bouza. 2007.** Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: Second National Study (2003). *Revista Española de Quimioterapia* **20** (2): 222-229.
- **Sardelic S., L. Pallecchi, V. Punda-Polic, G.M. Rossolini. 2003.** Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*-Carrying VIM-2 Metallo-β-Lactamase Determinants, Croatia. *Emerging Infectious Diseases* **9** (8): 1022
- **Schweizer H.P. 2003.** Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions, *Genetics and Molecular Research* **2** (1):48-62.
- **Senda K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashima, H. Ito, S. Ohkusa, K. Shimokata, N. Kato, M. Ohta. 1996b.** PCR detection of metallo-β-lactamase gene (blaIMP) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2909-2913.

- **Singh A., Richard V.G., Shabbir S., Steven L. F., Marcus J.Z. July 2006.** Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 512-530.
- **Sousa J. C. 2001.** Antibióticos bacterianos. Publicações Farmácia Portuguesa. Associação Nacional de Farmácias.
- **Tsakris A., S. Pournaras, N. Woodford, M.F.I. Papelou, G.S. Babini, J. Douboyas, D. Livermore. 2000.** Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology* **38** (3): 1290-1292.
- **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  $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**: 673-679.
- **Toleman M.A., K. Rolston, R.N. Jones, 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** (1): 329-332.
- **Toleman M.A., D. Biedenbach, D.M.C. Bennet, R.N. Jones, T.R. Walsh. 2005.** Italian metallo- $\beta$ -lactamase: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 61-70
- **Vahaboglu H., F. Coskuncan, O. Tansel, R. Ozturk, N. Sahin, I. Koksai, B. Kocazeybek, M. Tatman-Otkun, H. Lablebicioglu, M.A. Ozinel, H. Akalin, S. Kocagoz, V. Korten. 2001.** Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (PER-1-type)- producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Medical Microbiology* **50**: 642-645.
- **Vieira V.V., E. L. Fonseca, A.C.P. Vicente. 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. Suárez, A. Correa, A. M. Queenan, J.P. Quinn. 2006.** First Detection of Metallo-β-Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50** (1):226-229
- **Walsh T.R. 2005.** The emergence and implications of metallo-β-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **11** (6):2-9
- **Walsh T.R., M.A. Toleman, L. Poirel, P. Nordmann. 2005.** Metallo-β-Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews* **18** (2):306-325.
- **Wang C., Cai P., Chang D., Mi Z. 2006.** A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**(6): 1261-1262
- **Wang C.Y., J.S. Jerng, K.Y. Cheng, L.N. Lee, C.J. Yu, P.R. Hsueh, P.C. Yang 2006.** *Clinical Microbiology and Infection* **12** (1): 63-68.
- **Watanabe M., S. Iyobe, M. Inoue, S. Mitsuhashi. 1991.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**:147-151.
- **Weldhagen G.F., Poirel L., Nordmann P. 2003.** Ambler Class A Extended-Spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**(8):2385-2392
- **White G. Alekshun M., Mc Dremott P., Levy S. 2005.** *Frontiers in Antimicrobial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy*; ASM Press.
- **Xavier D.E. 2006.** IMP-18 producing *Pseudomonas aeruginosa*: increasing diversity of mobile metallo-β-lactamase in Brazil. *46<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*.
- **Yamano Y., T. Nishikawa, T. Fagimura, T. Yutsudou, M. Tsuji, H. Miwa. 2006.** Occurrence of PER-1 Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in

- Japan and their susceptibility to Doripenem. *The Journal of Antibiotics* **59**(12): 791-796.
- **Yan J.-J., P.-R. Hsueh, W.-C. Ko, K.-T. Luh, S.-H. Tsai, H.-M. Wu, J.-J. Wu. 2001.** Metallo- $\beta$ -Lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM3, a novel variante of VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2224-2228.
  - **Yan J.-J., Wu J.-J., Tsai S.-H.; Chuang C.L. 2004.** Comparison of double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. **49**:5-11.
  - **Yong D., Lee K., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M., Chong Y. 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.
  - **Yu Y.S., T. Qu, T. Zhou, J.Y. Wang, J.H. Li, R.Y. Walsh. 2006.** Integrons containing the VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different Chinese hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 4242–4245.
  - **Zavaskcki A.P., Gaspareto P.B., Martins A.F. 2005** Outbreak of carbapenemo--resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**:1148-1151.
  - **Zhanel G. G., Ryan W., Leanne D., Kristjan T., Ethan R., Daryl J.H., Ayman M.N., James A. K. 2007.** Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs* **67** (7): 1027-1052.

