



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLORISTHER ELAINE CARRARA MARRONI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
PRODUTORES DE METALO-BETA-LACTAMASES**

Londrina
2009

FLORISTHER ELAINE CARRARA MARRONI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
PRODUTORES DE METALO-BETA-LACTAMASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina para a obtenção do título
de Doutor em Microbiologia

Orientadora: Profª. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
Co-orientadora: Profª. Dra. Maria Cristina
Bronharo Tognim

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C313c Carrara-Marroni, Floristher Elaine.

Caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo-beta-lactamases / Floristher Elaine Carrara-Marroni. – Londrina, 2009.
143 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Co-orientador: Maria Cristina Bronharo Tognim.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Infecções por bactérias gram-negativas – Teses. 3. Antibióticos beta-lactâmicos – Teses. 4. Microbiologia – Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Tognim, Maria Cristina Bronharo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.841.1

FLORISTHER ELAINE CARRARA MARRONI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRODUTORES DE
METALO-BETA-LACTAMASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Lourdes Botelho Garcia
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr. Emerson José Venancio
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Gisele Maria Andrade Nóbrega
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
UEL – Londrina - PR

Londrina, 16 de dezembro de 2009

Ao Hércio

*Pela presença constante, trilhando comigo todos os passos.
Por estender a mão incondicionalmente,
abrandando as dificuldades e facilitando o meu caminho.
Pelas muitas vezes que, mesmo sem compreender, aceitou por amor.
Se existir alguma conquista, algum mérito divido-os com você.
Porque a vida tem mais graça quando você está ao meu lado!*

À minha mãe

*Pelo eterno amor,
apesar dos meus momentos de intolerância e falta de carinho.
Pela convivência, confiança e ajuda constante.
Pela preocupação com o meu futuro e bem estar em todo o tempo.*

À tia Deda e à tia Dide, minha família

*Pelo amor que dá sem nada esperar.
Pela dedicação, amparo e crédito quando até eu mesma duvidava!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo, pela oportunidade e confiança oferecidas a mim desde o início, quando tudo era somente um projeto. Por abraçar com otimismo o desafio de orientar numa nova área. Por reconhecer o meu trabalho e pela liberdade de ação concedida proporcionando esta realização pessoal e profissional. Jacinta, muito obrigada pelas muitas vezes que colocou os meus pés no chão e me ensinou, com gentileza, que o Doutorado é apenas o começo!

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim, por dividir comigo suas experiências e pela presença segura nos momentos decisivos da execução deste trabalho. Cris, muito obrigada pelas vezes que você falou e aconselhou, mas principalmente, pelas vezes que você calou e entendeu. Muito obrigada também, pela generosa acolhida e pelas freqüentes palavras de ânimo e estímulo.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venancio, pela orientação fundamental e ajuda incalculável nas etapas de Biologia Molecular deste estudo. Pelo apoio inestimável não só para a concretização deste trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional. Emerson, muito obrigada pelos momentos de aprendizado e amizade durante este período de convivência!

À Profa. Dra. Gisele Maria Andrade Nóbrega, por dividir comigo os seus conhecimentos e disponibilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos iniciais de Biologia Molecular. Por pegar na minha mão e me ensinar os primeiros passos de Biologia Molecular e, com sua constante alegria, me acalmar e tornar o nosso trabalho mais interessante.

À Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, por todo suporte técnico e financeiro nos experimentos de seqüenciamento. Pelo exemplo de profissionalismo, seriedade e generosidade. Professora, muito obrigada! Sua ajuda foi essencial para que nosso trabalho fosse concretizado.

À Profa. Dra Shiduca Itow Jankevicius, que um dia sonhou com o Curso de Pós- graduação em Microbiologia na UEL e trabalhou incessantemente para que ele se concretizasse. Muito obrigada pela dedicação por seus alunos e estagiários e, principalmente, por sua preocupação para com a nossa formação.

À Profa Dra Lourdes Botelho Garcia pela oportunidade concedida na realização de trabalhos e execução de projetos em parceria, pelas inúmeras ocasiões em que me escutou e animou e por ter gentilmente aceito participar de minha banca de defesa.

À Profa Dra Sueli Fumie Yamada Ogatta pela pronta disponibilidade nos momentos em que solicitei ajuda, pelo apoio e palavras de otimismo e incentivo e também por aceitar fazer parte da minha banca de defesa.

Ao professor Celso Luiz Cardoso, por dividir comigo suas experiências em momentos fundamentais da concretização deste trabalho e pela forma sempre gentil com que me recebeu em seu laboratório.

À Profa. Dra. Ana Cristina Gales, Laboratório ALERTA - Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, pela oportunidade ímpar de trabalhar e aprender com sua equipe, pelo suporte técnico e financeiro concedido nas etapas finais deste trabalho. Acima de tudo, pela convivência e carinho proporcionados durante o tempo em que estive em seu laboratório.

À Renata Cristina Picão, pela amizade, dedicação, incentivo e suporte técnico. Por me receber com tanto carinho no Laboratório ALERTA e em São Paulo. Pela orientação segura e paciência na realização dos experimentos finais e no preparo de artigo científico.

Ao Danilo Elias Xavier, pela colaboração e apoio em minha estada no laboratório ALERTA, pelas discussões interessantes e pelos momentos de amizade e aprendizado durante o curto tempo de convivência.

À Profa. Dra. Leda Maria Koelblinger Sodré, pela contribuição e gentileza em permitir a utilização dos sistemas de eletroforese e dos equipamentos para fotodocumentação de seu laboratório.

À Bárbara Gionco, querida estagiária, companheira de laboratório de todos estes anos. Muito obrigada por sua dedicação e trabalho, pela ajuda inestimável na realização desta e de todas as outras pesquisas do nosso laboratório, pelo arsenal de palavras carinhosas e de coragem que me acalmaram nos momentos mais difíceis.

À querida amiga Daiane, pela paciência e tranquilidade transmitidas a mim durante os experimentos. Pela docilidade e calma que me trouxeram equilíbrio e esperança. A sua amizade representa para mim uma das maiores aquisições deste período de Doutorado!

Ao José Wander Breganó, companheiro de trabalho e amigo do coração. Sua colaboração foi fundamental para a elaboração das tabelas e apresentação de dados da minha qualificação. Muito obrigada pelos conselhos e pelas palavras de incentivo e amizade. É muito bom saber que posso contar com você!

À amiga Regina Mitsuka Breganó, pela ajuda essencial no preparo da apresentação final da tese de Doutorado e, acima de tudo, pela amizade sincera em todos estes anos.

À colega de doutorado Daniele Sartori, por todas as palavras de apoio e incentivo doadas a mim durante estes anos e, principalmente, pela ajuda fundamental na realização dos experimentos de seqüenciamento.

À Raquel Girardello, pela dedicada colaboração e realização dos experimentos de ERIC-PCR durante os primeiros anos deste estudo.

À Roberta Losi Guembarovski e Lara Munique Ferracin do Laboratório de Genética Molecular de Fungos Filamentosos da UEL, por toda a ajuda, disponibilidade e suporte técnico na realização dos experimentos de sequenciamento.

Às professoras da disciplina de Microbiologia Clínica do Departamento de Patologia e Análises Clínicas e Toxicológicas (PAC), Regina Mariusa Borsato Quesada, Vera Lucia Cortez Abbondanza, Marsileni Pellison e Marcia Regina Eches Perugini:

Regina, eu devo a você esta conquista! Sem a sua valiosa contribuição nada disto seria possível. Muito obrigada pelas intermináveis horas de estágio que você ministrou e

pela compreensão demonstrada em todos estes anos. A você toda a minha admiração, respeito e amizade sincera.

Vera, minha doce amiga, muito obrigada pela amizade demonstrada em forma de trabalho e de carinho. Muito obrigada por me fazer rir nas muitas vezes que eu queria chorar. Você mora no meu coração!

Marsileni, minha amiga formiguinha, muito obrigada por todas as horas de trabalho que você acumulou para que eu pudesse estudar! Obrigada, também, pelos aparelhos e reagentes que você disponibilizou para que este trabalho pudesse ser iniciado.

Marcia, importante é o que está escrito no coração. Muitas vezes pode não ser conhecido e lido pelas pessoas, mas sempre estará lá, permanentemente presente! Obrigada pela compreensão, trabalho e amizade.

À professora Alessandra Miyuki Okino, coordenadora da disciplina de Estágio Supervisionado em Análises Clínicas do Depto PAC. Muito obrigada pelos anos que assumiu integralmente o Estágio, possibilitando que eu realizasse o doutorado.

Aos professores do Departamento PAC Vera Lucia Hideko Tatakihara e Walter Abou Murad, colegas do laboratório de Análises Clínicas do AHC, por estes anos de amizade, convivência e colaboração.

Aos professores do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina e às secretárias Marina e Beth pela colaboração e incentivo.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pelo apoio e compreensão dispensados e aos secretários Alex e Ricardo pela preciosa ajuda com as questões burocráticas.

Aos estagiários Angelo A. Pasta, Alessandra S. Pellegrini, Ana Paula A. Lopes, Barbara Gionco, Bruno J. Sanchez, Carlos Eduardo Silva (Cadu), Eduardo, W. J. Song, Eloisa da Silva, Eloiza Helena Campana, Fabiana O. Brondi, Francielli M. de Vasconcelos, Felipe A. P. Ribeiro, Karina Cotrim, Louise Rejane Forguieri, Suelen Balero de Paula e Tatiana R. Assunção. Muito obrigada pelo apoio, cooperação e horas de dedicação no desenvolvimento dos projetos de nosso laboratório.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia do HU/AHC, companheiros de ofício, colegas de profissão. Muito obrigada pelo apoio e amizade e, por me ensinarem valores essenciais para a convivência: Marísia (coragem), Ney (responsabilidade), Clarice (dedicação), Maura (cooperação), Ivone/Bonny (alegria), Ivone (respeito), Gerusa (voluntariedade), Emílio (fé), Néia (resiliência), Fábio (gentileza), Marilene (disponibilidade), Tereza (docilidade), Alice (contribuição).

Às funcionárias Elda, Lurdes e Vilma e ao funcionário Rui do Laboratório de Parasitologia do AHC, pelas conversas agradáveis e momentos de descontração que tornaram mais estimulante o nosso trabalho.

Aos funcionários da administração do AHC, Sonia Dias de Paiva Silva, Claudio Bonfim, José Santo Moreira, Marli Alves de Lima e Cleuza Ferreira, pela forma gentil como sempre compreenderam as nossas necessidades, pela prontidão em ajudar e pelo carinho com que sempre me receberam.

Aos funcionários da manutenção do AHC, em especial ao funcionário Jair Reque, pela pronta ajuda nos momentos solicitados e pela forma alegre e voluntária com que sempre desenvolveram os trabalhos de reparo e reforma no laboratório de Microbiologia Clínica/AHC.

À funcionária Rute Cavalcanti Araújo do setor de Higiene do AHC, pela gentileza e responsabilidade com que sempre desempenhou seu trabalho. Muito obrigada pela amizade e por atender sempre com muito carinho e disponibilidade as nossas solicitações.

Ao Josué e Lessandra, meus irmãos de coração, de valores e de fé.

Josué: Muito obrigada pelas palavras que sempre alimentaram a minha alma, por me lembrar desde o princípio que Deus sempre está à frente, que Ele orienta acima de tudo e de todos e de que há muita vida depois do Doutorado...

Lessandra: Muito obrigada pelo carinho constante, por me fazer entender que existem valores e ideais superiores que podem nos realizar, mesmo sob a pressão dos estudos e do trabalho!

Às minhas sobrinhas Elisa e Elaine por existirem e tornarem minha vida mais cor-de-rosa e feliz!

Aos meus irmãos de oração: Camilo, Taisa, Nassir e Ari, que estiveram constantemente intercedendo pelos meus projetos e aspirações, trabalhos e resultados. Por me ensinarem na prática que, realmente, “a fé remove montanhas e a oração abre as janelas dos Céus”.

Enfim, meu muito obrigado a todos que de alguma forma ajudaram, torceram, oraram e se importaram comigo e com minha longa jornada até aqui!

Este trabalho foi financiado pela Fundação Araucária do Paraná (FA/PPSUS convênio 375/2006) e realizado com auxílio técnico e científico da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“E eu irei adiante de ti,
endireitarei os caminhos tortuosos,
quebrarei as portas de bronze e despedaçarei as trancas de ferro;
dar-te-ei tesouros escondidos e as riquezas encobertas,
para que saibais que eu sou o Senhor, o Deus de Israel,
que te chama pelo teu nome.”*

Isaias 45: 2,3

MARRONI, Floristher Elaine Carrara. **Caracterização Fenotípica e Molecular de Isolados Clínicos de *Pseudomonas Aeruginosa* Produtores de Metallo-Beta-Lactamases.** 2009. 143 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

A produção de metalo-beta-lactamases (MβL) é um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos detectado com aumentada frequência entre isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados no Brasil. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, pesquisar a ocorrência de MβL e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes internados ou atendidos no Hospital Universitário de Londrina e no Ambulatório do Hospital das Clínicas. Um total de 240 isolados de *P. aeruginosa*, coletados consecutivamente durante o período de março de 2003 a março de 2005, foram avaliados. Destes, 141 isolados que não apresentaram sensibilidade à ceftazidima e/ou aos carbapenêmicos foram selecionados para a pesquisa de MβLs e detecção por PCR de genes codificadores destas enzimas. Uma alta taxa de resistência aos antimicrobianos foi verificada entre as *P. aeruginosa* estudadas sendo que somente as polimixinas mostraram atividade contra 100% dos isolados. Quarenta e sete isolados foram produtores de MβL e os genes *bla_{SPM-1}* e *bla_{IMP-16}* foram encontrados em 45 e 2 isolados, respectivamente. Os isolados produtores de SPM-1 foram agrupados em 11 clones com diferentes perfis de multirresistência aos antimicrobianos. As cepas de *P. aeruginosa* pertencentes ao clone A apresentaram relação genética com o clone epidêmico brasileiro produtor de SPM-1, denominado SP, e a disseminação deste clone foi verificada em diferentes setores do HU. Os isolados produtores de SPM-1 foram recuperados com maior frequência entre pacientes internados na Enfermaria Masculina e nas UTIs do HU, sugerindo um importante papel destes setores na disseminação e manutenção de cepas produtoras de MβLs neste hospital. Os isolados Pa30 e Pa43, produtores de IMP-16, não apresentaram resistência aos carbapenêmicos e foram agrupados em um clone distinto. O sequenciamento dos isolados Pa30 e Pa43 mostrou a presença do gene *bla_{IMP-16}* como um único cassete gênico localizado em um novo integron da classe 1. O gene cassete *bla_{IMP-16}* foi precedido por um promotor P_c fraco e por um outro promotor P_2 inativo. Este gene está localizado num plasmídeo de 60Kb nos dois isolados produtores de IMP-16. Os isolados Pa30 e Pa43 apresentaram níveis transcricionais de *oprD* e de *ampC* similares aos da cepa de referência Pa01 indicando que, provavelmente, estes isolados apresentam uma expressão normal da porina OprD e produzem quantidades basais da enzima AmpC. Uma hiperexpressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY foi verificada em ambos isolados produtores de IMP-16. Este estudo relata a primeira detecção do gene *bla_{IMP-16}* na região Sul do Brasil e a primeira descrição de isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de IMP-16 não resistentes aos carbapenêmicos.

Palavras – Chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Infecções por bactérias gram-negativas. Antibióticos beta-lactamicos. Microbiologia.

MARRONI, Floristher Elaine Carrara. **Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases.** 2009. 143 f. Thesis (Doctorate in Microbiology) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Metallo- β -lactamases (M β L) production is an important mechanism of carbapenem resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* that is becoming more frequently observed in Brazil. This study was designed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile, M β L occurrence and the phenotypic and genotypic traits of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates recovered from inpatients and outpatients, treated at Hospital Universitário de Londrina and Ambulatório do Hospital das Clínicas. Initially, a total of 240 isolates consecutively collected from March 2003 to March 2005 were evaluated and 141 isolates non-susceptible to ceftazidime and/or carbapenems were selected to detect M β L production and the presence of M β L genes. A high rate of antimicrobial resistance was found and only polymyxins showed 100% activity against the *P. aeruginosa* isolates evaluated. A total of 47 isolates were M β L-producers and the *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-16} genes were detected in 45 and 2 isolates, respectively. SPM-1 isolates comprised 11 clones with different multidrug-resistant profiles. The SPM-1-producing *P. aeruginosa* strains of clone A showed close genetic relatedness to the Brazilian epidemic SPM-1 strain termed SP clone and the dissemination this clone was verified in different wards in HU. The SPM-1-producing isolates were mainly recovered from patients hospitalized in the male patients' ward and ICUs, suggesting an important role of these areas in the nosocomial dissemination and maintenance of M β L-producing strains in this hospital. The two IMP-16-producing isolates were clustered in a distinct clone and no exhibited resistance to carbapenems. Sequencing revealed that both isolates carried the *bla*_{IMP-16} genes as a single cassette in a novel class-1 integron. The *bla*_{IMP-16} gene cassette were preceded by a weak P_c promoter and an inactive P₂ promoter. This gene was carried on a 60Kb plasmid in both IMP-16-producing isolates. Pa 30 and Pa 43 showed transcriptional levels of *oprD* and *ampC* similar to that PA01 reference strain, probably indicating normal expression of the porin OprD and basal production of ampC enzyme. A hiperexpression of the efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY were verified in both IMP-16-producers. This study report the first detection of *bla*_{IMP-16} gene in the Southern Brazil and the first description of IMP-16-producing *P. aeruginosa* isolates non-resistant to carbapenems.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Gram-negative bacterial infections. Beta-lactam antibiotics. Microbiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases	52
Tabela 2 – β -lactamases identificadas em <i>P. aeruginosa</i> , de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular	53

ARTIGO A

Table 1 – Antimicrobial activity of selected antipseudomonal agents tested against three groups of <i>P. aeruginosa</i> clinical isolates recovered at the HU/AHC complex during 2003-2005.....	111
--	-----

ARTIGO B

Table 1 – Antimicrobial susceptibilities values obtained in different antimicrobial susceptibility methods for the <i>P. aeruginosa</i> isolates carrying <i>bla</i> _{IMP-16} gene	125
Table 2 – Transcriptional levels of genes <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i> , <i>mexY</i> , <i>ampC</i> , <i>oprD</i> and <i>bla</i> _{IMP} in clinical isolates of <i>P. aeruginosa</i>	127

ANEXO C

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos genes que codificam M β L por PCR multiplex segundo Mendes et al (2007).....	137
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos genes que codificam GES e KPC β -lactamases	137
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção e seqüenciamento do gene <i>bla</i> _{SPM-1} e do integron contendo <i>bla</i> _{IMP-16}	138

ANEXO E – CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> PRODUTORES DE MBL.....	140
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura e função do sistema de efluxo RND em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
Figura 2 – Operons do sistema de efluxo RND Operons do sistema de efluxo RND em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Figura 3 – Representação esquemática de um integron da classe 1 e de um modelo de aquisição de cassette gênico.....	64
Figura 4 – Representação esquemática do locus genético do elemento <i>ISCR4</i> encontrado em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa produtoras</i> da MβL SPM-1 e recuperadas no Brasil.....	67

ARTIGO A

Figure 1 Legend – PFGE patterns and dendrogram of MβL-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains isolates from the HU/AHC complex during March 2003 to March 2005.....	113
--	-----

ARTIGO B

Figure 1 – Schematic representation of class-1-integron-containing clinical isolate <i>P. aeruginosa</i> Pa30 and Pa43.....	126
--	-----

ANEXO A

Figura 1 – Distribuição por Unidade Hospitalar dos 240 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> recuperados no Laboratório de Microbiologia Clínica do HU, no período de março de 2003 a março de 2005.....	133
Figura 2 – Distribuição dos 240 pacientes portadores de <i>P. aeruginosa</i> por sexo e idade em anos.....	134

ANEXO B

- Figura 1** – Teste de Disco-Aproximação utilizando três substratos (ceftazidima, imipenem, meropenem) para um isolado de *P. aeruginosa* produtor de MβL..... 135
- Figura 2** – Etest para detecção de isolados clínicos produtores de MβL 136

ANEXO D

- Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação da reação de PCR multiplex para detecção da presença dos genes codificadores de MβL entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* C/CAZ-NS..... 139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	<i>Australian Imipenemase</i>
AHC	Ambulatório do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina
BGN	Bacilo Gram-negativo
BGNF	Bacilo Gram-negativo não fermentador
BHI	<i>Brain- Heart Infusion</i> (Caldo cérebro-coração)
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CR	<i>Common Region</i>
CS	Conserved Sequence (Sequência Conservada)
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ER	Extensiva resistência aos antimicrobianos
ESAC	Extended- Spectrum AmpC- Cephalosporinase (Cefalosporinase de espectro ampliado)
ESBL	Extended- Spectrum β -lactamase (β -lactamase de espectro ampliado)
GIM	<i>German Imipenemase</i>
HU	Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina
IMP	imipenemase
IS	Insertion Sequence (Sequência de Inserção)
ISCR	<i>Insertion Sequences Common Region</i>
ITU	Infecção do Trato Urinário
KHM	<i>Kyorin Health Sciences metallo-β-lactamase</i>
LMC	laboratório de Microbiologia Clínica
LPS	Lipopolissacarídeo
MβL	Metalo-beta-lactamase
ME	Membrana Externa bacteriana
MH	Mueller Hinton
ml	mililitro
2-MPA	<i>2 - Mercaptopropionic acid</i> (Ácido 2- mercaptopropiônico)
MR	Multirresistência aos antimicrobianos

NNISS	<i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
Opr	<i>Outer porine</i>
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i> (Proteína ligadora de penicilina)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDE	<i>Pseudomonas-derived cephalosporinases</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PRD	<i>Pan</i> resistência aos antimicrobianos
QRDR	<i>Quinolone-Resistance Determing Region</i>
RC	<i>Rolling Circle Replication</i> (replicação por círculo rolante)
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
SPM	São Paulo metalo-beta-lactamase
TDST	<i>Triple-disk synergy test</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> (Agar tripticaseína de soja)
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i> (Caldo tripticaseína de soja)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	<i>Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>
µg	micrograma

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	24
REVISÃO DA LITERATURA	25
1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	25
2 RESERVATÓRIOS, FONTES DE ISOLAMENTO E INFECÇÕES POR <i>P. AERUGINOSA</i>	28
3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>P. AERUGINOSA</i>	32
3.1 DEFINIÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA	32
3.2 IMPACTO CLÍNICO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	33
3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>P. AERUGINOSA</i>	34
3.3.1 Alterações da Permeabilidade da ME	35
3.3.2 Resistência Mediada por Efluxo	38
3.3.2.1 Sistema de efluxo MexAB-OprM	41
3.3.2.2 Sistema de efluxo MexCD-OprJ	42
3.3.2.3 Sistema de efluxo MexEF-OprN	44
3.3.2.4 Sistema de efluxo MexXY	45
3.3.2.5 Sistema de efluxo MexJK	46
3.3.2.6 Outros sistemas de efluxo da família RND	47
3.3.3 Inativação Enzimática dos Antimicrobianos	48
3.3.3.1 Inativação enzimática dos aminoglicosídeos	48
3.3.3.2 Inativação enzimática dos β -lactâmicos	50
3.3.4 Alteração das Estruturas-Alvo dos Antimicrobianos	55
3.3.4.1 Alteração de PBPs	55
3.3.4.2 Metilação do RNA ribossomal 16S	55
3.3.4.3 Alteração dos alvos de ligação das quinolonas	56

4 METALO-BETA-LACTAMASES	58
4.1 CLASSIFICAÇÃO DAS MBL	58
4.2 MBL CROMOSSÔMICAS.....	60
4.3 MBL MÓVEIS OU TRANSFERÍVEIS	60
4.4 CONTEXTO GENÉTICO E DISSEMINAÇÃO DAS MBL.....	61
4.4.1 Integrons.....	62
4.4.2 Elementos <i>ISCR</i>	66
4.5 SUB-CLASSES DE MBL TRANSFERÍVEIS PRODUZIDAS POR <i>P. AERUGINOSA</i>	68
4.5.1 MβL da Sub-classe IMP	68
4.5.2 MβL da Sub-classe VIM	69
4.5.3 MβL da Sub-classe SPM	70
4.5.4 MβL da Sub-classe GIM	71
4.5.5 MβL da Sub-classe AIM	72
4.6 EPIDEMIOLOGIA DAS MBL DE <i>P. AERUGINOSA</i> NO BRASIL	72
4.7 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO E DE GENES CODIFICADORES DE MBL	76
4.8 IMPACTO CLÍNICO DE PATÓGENOS PRODUTORES DE MBL	78
4.9 TERAPIA DAS INFECÇÕES POR PATÓGENOS PRODUTORES DE MBL	80
5 TIPAGEM MOLECULAR DE <i>P. AERUGINOSA</i> POR PFGE	84
REFERÊNCIAS	86
ARTIGO A – CHARACTERIZATION OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PRODUCING SPM-1 AND IMP-16 METALLO-BETA-LACTAMASES IN BRAZILIAN TEACHING HOSPITALS	104
ARTIGO B – METALLO-B-LACTAMASE PRODUCTION AND CARBAPENEM NON-RESISTANT <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>: POTENTIAL FOR SILENT SPREAD	121
CONCLUSÕES	131
ANEXOS	132

INTRODUÇÃO

Embora considerada um fenômeno biológico natural, a resistência aos antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública mundial, devido ao ritmo crescente da sua evolução e disseminação entre as populações microbianas. Paralelamente a esta preocupação global, verifica-se um decréscimo de investimentos na pesquisa, desenvolvimento e introdução no mercado de novos agentes anti-infecciosos, principalmente daqueles dirigidos para o tratamento das infecções causadas por Bacilos Gram-negativos (BGN) (Burgess, Rapp, 2008; Lauthenbach, Polk, 2007; Spellberg et al., 2008).

Estudos epidemiológicos recentes relatam um aumento nas infecções nosocomiais causadas por BGNs, particularmente por cepas multirresistentes a antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* (Livermore, 2009). Estes agentes, classificados como patógenos “problemáticos” da atualidade, são responsáveis por aproximadamente 70% das infecções nosocomiais causadas por BGN (Albrecht et al., 2006; Slama, 2008). Elevadas taxas de morbidade e mortalidade e altos custos hospitalares estão associados a infecções causadas por estes microrganismos, constituindo um desafio para os infectologistas, epidemiologistas e administradores hospitalares (Patterson, 2006; Rice, 2009).

Conhecida por muitos anos como principal agente etiológico de infecções em queimaduras e feridas cirúrgicas, mas frequentemente considerada um agente secundário ou invasor oportunista, *P. aeruginosa* é reconhecida atualmente como o principal patógeno hospitalar de pacientes imunocomprometidos, debilitados e de indivíduos portadores de fibrose cística. Com notável versatilidade metabólica e excepcional habilidade para adaptar-se e colonizar uma variedade de nichos ecológicos, esta espécie bacteriana também se destaca pela capacidade de apresentar resistência simultânea a um grande número de antibióticos e desinfetantes (Driscoll, Brody, Kollef, 2007).

As infecções por *P. aeruginosa* são, geralmente, de difícil tratamento em razão da resistência intrínseca a diferentes classes de agentes antimicrobianos apresentada por esta espécie e por sua notável capacidade em desenvolver resistência a estes fármacos durante o curso de tratamento das infecções. (Chopra et al, 2008; Grossi, Gasperina, 2006; Mesaros et al., 2007).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem aminoglicosídeos como a gentamicina, tobramicina, netilmicina e

amicacina; as fluoroquinolonas, ciprofloxacina e levofloxacina e as polimixinas. Entre os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, apresentam atividade contra *P. aeruginosa* e podem ser utilizadas clinicamente, as penicilinas ticarcilina e piperacilina, incluindo suas respectivas associações com inibidores de β -lactamase: o ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam; as cefalosporinas de amplo espectro ceftazidima, cefepima e cefoperazona; o monobactam aztreonam; e os carbapenêmicos imipenem, meropenem e doripenem (Pappas, Saplaoura, Falagas, 2009; Rodloff, Goldstein, Torres, 2006).

Os carbapenêmicos são β -lactâmicos de amplo espectro, estáveis à maioria das β -lactamases produzidas por *P. aeruginosa*. Estes agentes são amplamente utilizados no tratamento das infecções nosocomiais sérias causadas por *P. aeruginosa* e outros BGNs. No entanto, o intenso uso hospitalar dos carbapenêmicos foi acompanhado pela emergência e disseminação da resistência aos mesmos (Rodloff, Goldstein, Torres, 2006; Zhanel et al., 2007).

Em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, a resistência aos carbapenêmicos é, usualmente, multifatorial e envolve diferentes mecanismos que operam conjuntamente, como: reduzida expressão de proteínas de membrana (combinada a aumentada atividade da cefalosporinase AmpC ou à β -lactamases de espectro ampliado e aumentada extrusão destes antimicrobianos através de sistemas de efluxo. No entanto, o mecanismo mais preocupante de resistência aos carbapenêmicos é a produção de carbapenemases adquiridas, em especial, das metalo-beta-lactamases (M β L), devido ao seu potencial de rápida disseminação intra e inter-espécies bacterianas (Rahal, 2008; Walsh, 2008).

As M β L são enzimas com uma potente atividade hidrolítica sobre todos os β -lactâmicos disponíveis comercialmente, com exceção do aztreonam. Isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores destas enzimas apresentam frequentemente, complexos fenótipos de multirresistência e causam infecções de difícil tratamento. Desta forma, estão associadas a altas taxas de mortalidade, principalmente pela falta de opções terapêuticas ou devido a um tratamento empírico inicial não efetivo (Laupland et al., 2005; Maltezou, 2008; Zavascki et al., 2006a).

Os genes que codificam as M β Ls, denominados genes *bla* são, frequentemente, mobilizados por plasmídeos ou transposons que facilitam a disseminação dos mesmos (Walsh, 2006). A mobilidade destes genes, tanto genética quanto geográfica, aliada à dificuldade de erradicação dos microrganismos produtores destas enzimas, é responsável pelo aumento no seu isolamento, representando uma ameaça à terapia antimicrobiana atual (Maltezou, 2008).

Isolados bacterianos produtores de MβLs tem se disseminado rapidamente por muitos países, particularmente do sudeste da Ásia, da Europa e da América Latina (Walsh, 2008). Até o momento, 5 subclasses de MβLs adquiridas foram identificadas em *P. aeruginosa* (IMP, VIM, SPM, GIM, AIM), sendo que 4 variantes foram isoladas no Brasil: SPM-1, VIM-2-like, IMP-1-like, IMP-16 e IMP-18 (Martins et al., 2007; Mendes et al., 2004; Sader et al., 2005; Xavier et al., 2006). *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 tem sido reportada como endêmica no território brasileiro devido à disseminação de um clone em hospitais de diferentes estados. Este clone, denominado SP, contribui para as altas taxas de resistência aos carbapenêmicos observadas entre isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* do Brasil (Gales et al., 2003).

De forma semelhante ao que aconteceu mundialmente, em especial nos países da América Latina e em vários estados do Brasil, um aumento gradativo nas taxas de resistência aos carbapenêmicos foi verificado entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperadas no Laboratório de Microbiologia Clínica (LMC) do Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A análise retrospectiva dos anos de 2003 e 2004 revelou uma taxa geral de sensibilidade aos carbapenêmicos de 63,2% (Campana et al. 2004). Um estudo realizado no HU, com *P. aeruginosa* isoladas de pacientes portadores de infecção hospitalar, apresentou uma redução na sensibilidade aos carbapenêmicos de 83% em 1998 para 30% em 2004 (Carrilho et al., 2004).

Dados fornecidos pela Farmácia Hospitalar do HU mostraram um aumento no consumo de carbapenêmicos de aproximadamente 40% entre os anos de 2000 e 2004. Adicionalmente, com a emergência e aumento do número de casos de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, o Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) padronizou o uso da polimixina B e colistina (polimixina E) no HU, com utilização reservada para o tratamento das infecções causadas por este microrganismo.

Em 2003, um estudo multicêntrico realizado por Gales e colaboradores detectou SPM-1 em um isolado clínico de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, recuperado no ano de 2002 da urina de um paciente internado no HU de Londrina. Este isolado apresentou similaridade genética com *P. aeruginosa* coletada de sete centros médicos localizados em cinco estados brasileiros, e mostrou um perfil de PFGE idêntico ao exibido pelo clone SP (Gales et al., 2003).

O aumento na ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, aliado ao consumo elevado destes antimicrobianos e a presença confirmada de SPM-1 no HU, evidenciaram o preocupante problema vivenciado neste hospital em relação

à terapêutica das infecções por *P. aeruginosa* e motivou o presente estudo. Conhecer a frequência de ocorrência dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de M β L, verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e o modo de disseminação destes isolados foi considerado fundamental para compreender este importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos presente no HU.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Avaliar a produção de MβLs e a presença dos genes codificadores destas enzimas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados no LMC do HU de Londrina, durante o período de março de 2003 a março de 2005.

Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* aos principais antimicrobianos com atividade anti-pseudomonas.
- Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima aos carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) e à Polimixina B.
- Avaliar a produção de MβL por métodos fenotípicos;
- Pesquisar os principais genes que codificam as MβL por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento;
- Estabelecer a relação clonal entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de MβL pela tipagem molecular por PFGE;
- Pesquisar o contexto e o suporte genético dos genes que codificam as MβL em dois isolados de *P. aeruginosa* produtores de IMP-16;
- Avaliar o nível de expressão de genes que codificam proteínas de sistemas de efluxo em *P. aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, Mex-XY-OprM), da proteína de membrana OprD e da β-lactamase AmpC em dois isolados de *P. aeruginosa* produtores de IMP-16.

REVISÃO DA LITERATURA

1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *P. AERUGINOSA*

P. aeruginosa é a “espécie tipo” do gênero *Pseudomonas* pertencente à família *Pseudomonaceae*. Isolados de *P. aeruginosa* apresentam morfologia compatível a um bastonete medindo entre 0,5 a 0,8 µm de largura e 1,5 a 3,0 µm de comprimento, são levemente curvos e não esporulados. Podem ser observados como células isoladas, aos pares ou em curtas cadeias e a maior parte dos isolados move-se através de um flagelo polar monotríqueo (Blondel-Hill, Henry, Speert, 2007).

A estrutura externa de *P. aeruginosa* apresenta as características gerais dos BGN: estrutura multilaminar composta de membrana externa (ME), seguida de espaço periplasmático, que inclui uma fina camada de peptidoglicano na parede celular e, internamente, a membrana citoplasmática. Em alguns isolados, envolvendo todas as estruturas descritas acima, encontra-se ainda a cápsula ou camada mucóide. A ME é uma estrutura bilaminar, cujo folheto externo, hidrofílico, é composto por moléculas de lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é considerado o principal determinante antigênico de muitas bactérias Gram-negativas e em *P. aeruginosa* resulta na presença de diversos sorotipos. (Winn Jr et al., 2008a).

Embora classificado como um organismo com metabolismo respiratório estritamente aeróbio, *P. aeruginosa* pode adaptar-se a condições com depleção parcial ou total de oxigênio. Em situações excepcionais realiza respiração anaeróbica utilizando o nitrogênio como aceptor final de elétrons (desnitrificação) e, na ausência deste, pode ainda utilizar a arginina pela fosforilação em nível de substrato. A adaptação a ambientes microaerófilos ou anaeróbicos é essencial para certos “estilos de vida” de *P. aeruginosa* como, por exemplo, durante as infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística, onde finas camadas do polissacarídeo alginato que envolvem as células bacterianas mucóides limitam a difusão do oxigênio (Blondel-Hill, Henry, Speert, 2007).

Este microrganismo é mesofílico, com ótima temperatura de crescimento entre 30 e 37 °C, podendo crescer vagarosamente ou sobreviver a temperaturas superiores ou inferiores. A habilidade de *P. aeruginosa* em crescer a 42 °C a distingue de outras espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas* com importância clínica como *P. fluorescens* e *P. putida* (Blondel-Hill, Henry, Speert, 2007).

P. aeruginosa é um BGN que deriva a sua energia da oxidação de carboidratos, não realizando a fermentação dos mesmos, por isto é considerado um Bacilo Gram Negativo Não Fermentador (BGNNF). Por ser um microrganismo metabolicamente versátil cresce sem muitas exigências nutricionais, podendo inclusive sobreviver em água destilada. No laboratório, meios de cultura compostos de sais minerais e glicose suportam bem o seu desenvolvimento não necessitando de fatores orgânicos de crescimento. Pode utilizar mais que 75 compostos orgânicos diferentes como única fonte de carbono e energia, sendo notável a sua diversidade catabólica (Winn Jr et al., 2008b)

Isolados de *P. aeruginosa* são facilmente reconhecidos nos meios primários de isolamento por causa da aparência característica das colônias, odor de frutas e produção de pigmentos, se presentes. Três formas principais de colônias são mais comumente produzidas: os isolados do solo ou da água formam colônias pequenas e rugosas e os isolados clínicos podem apresentar outras duas morfologias: colônias grandes, lisas e ovaladas com bordas estendidas e as colônias do tipo mucóide. Estas variantes mucóides ocorrem devido à produção de grande quantidade do polissacarídeo extracelular alginato, característico em isolados do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística e de alguns isolados do trato urinário e parecem exercer papel fundamental na colonização e virulência. Uma mesma cepa pode variar de mucóide para não mucóide e vice-versa como, por exemplo, em infecções crônicas (Win Jr et al., 2008b)

Uma importante característica desta espécie é a produção de pigmentos que fluorescem sobre luz ultravioleta, particularmente quando os isolados crescem em condições de limitação de ferro. Alguns destes pigmentos e/ ou os seus derivados parecem exercer a função de sideróforos do sistema de captação de íons ferro da bactéria. Quatro pigmentos distintos e difusíveis nos meios de cultura podem ser produzidos por *P. aeruginosa*: a piocianina (azul), a fluorescente pioverdina (amarelo-esverdeado), a piorrubina (vermelho) e a piomelanina (marrom a preto). Quando a piocianina é produzida juntamente com a pioverdina, uma coloração verde brilhante é produzida. Encontrada em aproximadamente 80% dos isolados, a piocianina é estimulada pela presença do glicerol, magnésio, potássio e ferro e é um pigmento solúvel em água e clorofórmio. A pioverdina é um pigmento fluorescente solúvel em água mas não em clorofórmio, podendo ser encontrado em outras espécies recuperadas de materiais clínicos: *P. putida* e *P. fluorescens*. Menos de 2% dos isolados clínicos são produtores de piorrubina e/ou piomelanina (Winn Jr et al., 2008b).

A identificação bioquímica pode ser realizada pelas características metabólicas como a não fermentação de carboidratos, oxidação da glicose e xilose em meio

basal, produção de indofenol oxidase, produção de arginina dehidrolase, crescimento em *Brain Heart Infusion* (caldo BHI) a 42°C, redução do nitrato a nitrito e inabilidade de oxidar a maltose em meios contendo amônia com sais e açúcares (Winn Jr et al., 2008 b).

O sequenciamento completo do genoma da cepa selvagem PA01 de *P. aeruginosa* foi disponibilizado no ano de 2000 por Stover e colaboradores. Com 6,3 milhões de pares de bases e 5570 “*open reading frames*”, o genoma desta bactéria está entre os maiores dentre os procariotos. O significativo número de famílias de genes encontrados neste genoma, com grande diversidade funcional, codifica uma alta proporção de proteínas regulatórias e de proteínas envolvidas no transporte e virulência. Um total de 0,3% dos genes codificam para proteínas envolvidas na resistência aos antimicrobianos. O genoma é, também, altamente flexível, com 10% dos genes organizados em ilhas de patogenicidade, compreendendo genes variáveis que codificam fatores de virulência ou com habilidade para adquirir elementos genéticos móveis que codificam genes de resistência. O grande tamanho e a complexidade deste genoma é, provavelmente, a base para a capacidade de *P. aeruginosa* sobreviver em diferentes condições ambientais, ser capaz de infectar uma variedade de sítios corporais e, também, resistir (intrinsecamente ou por aquisição de genes necessários) a um grande número de agentes antimicrobianos (Mesaros et al., 2007; Stover et al., 2000).

2 RESERVATÓRIOS, FONTES DE ISOLAMENTO, FATORES DE RISCO E INFECÇÕES CAUSADAS POR *P. AERUGINOSA*

P. aeruginosa é um microrganismo cosmopolita em sua distribuição, tem predileção por ambientes úmidos, podendo ser encontrada na água, no solo, em plantas, inclusive em frutos, vegetais e flores, nos animais e no homem. A habilidade em sobreviver com requerimentos nutricionais mínimos, a capacidade de utilizar uma variedade de substratos orgânicos como fonte de carbono e de tolerar uma variedade de condições físicas, contribui para a sua ampla adaptabilidade ecológica e para sua persistência na natureza e no ambiente hospitalar (Blondel-Hill, Henry, Spert, 2007; Strateva, Yordanov, 2009).

Nos hospitais, *P. aeruginosa* pode ser isolada de uma variedade de fontes, sendo a umidade um fator crítico para sua persistência. Equipamentos de terapia respiratória (ventilação mecânica), antissépticos, desinfetantes, soluções de limpeza, medicamentos, colírios, líquidos de diálise, equipamentos médicos (endoscópios), sabões, pias, buchas ou esfregões, banheiras de hidroterapia e vegetais podem constituir os principais reservatórios hospitalares ou fontes de isolamento deste microrganismo. Os reservatórios mais comumente encontrados na comunidade incluem piscinas, banheiras de hidromassagem, saunas, umidificadores, soluções de lentes de contato, solo, rizosfera e vegetais (Pollack, 2000).

P. aeruginosa é raramente encontrada como membro da microbiota normal de indivíduos saudáveis, mas quando a colonização ocorre, os sítios corporais prevalentes são os que possuem umidade natural tais como axila, períneo, ouvido, mucosa nasal, faringe e trato intestinal. As taxas de colonização descritas na literatura compreendem 0 a 2% para a pele, 0 a 3,3% para a mucosa nasal, 0 a 6,6 % para a faringe, e 2,6 a 24% para isolados de fezes. No entanto, as taxas de colonização podem exceder a 50% durante a hospitalização, especialmente em pacientes que sofreram traumas ou rompimento da integridade da pele e mucosas por ventilação mecânica, traqueostomia, cateterização, cirurgia ou queimaduras severas. Pacientes imunologicamente debilitados apresentam alto risco de colonização por este microrganismo e a alteração da microbiota resultante de terapia com antimicrobianos de amplo espectro ou quimioterapia anticâncer aumentam a colonização por *P. aeruginosa* nos vários sítios corporais. A colonização também é comum no trato respiratório de indivíduos portadores de fibrose cística (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

Apesar da grande distribuição de *P. aeruginosa* na natureza e do seu potencial para causar infecções na comunidade, as infecções graves causadas por este

microrganismo são predominantemente adquiridas nos hospitais. No entanto, as infecções adquiridas na comunidade são bem documentadas na literatura e, estão associadas, geralmente, ao contato do paciente com água ou soluções contaminadas. As principais infecções comunitárias incluem: infecções oculares como ceratite ulcerativa (relacionadas ao uso de lentes de contato); infecções do ouvido, como a otite do nadador, relacionada a indivíduos que praticam esportes aquáticos e uma forma mais grave de infecção profunda, a otite externa maligna que acomete pacientes diabéticos; uma ampla variedade clínica de infecções cutâneas que vão desde nódulos subcutâneos até fascíte necrotizante e as pneumonias comunitárias, ocasionadas principalmente em pacientes com doença pulmonar crônica, insuficiência cardíaca congestiva ou indivíduos portadores do vírus HIV (Pollack, 2000). A frequência de *P. aeruginosa* como patógeno hospitalar varia segundo a região, o tipo de hospital, o tipo de paciente e, até mesmo, segundo a unidade hospitalar dentro de uma mesma instituição (Driscoll, Brody, Kollef, 2007).

Na maioria dos casos, o processo infeccioso tem início com algum tipo de alteração ou destruição de barreiras físicas, como por exemplo, a utilização de cateter urinário e ou sonda orotraqueal, processos cirúrgicos, queimaduras e imunossupressão. Esta bactéria é responsável por aproximadamente 11 a 13% de todas as infecções hospitalares (Kim et al., 2000; Lizioli et al., 2003; Pittet, 1999). Nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), taxas de infecção ainda maiores são relatadas, variando de 13,2 a 22,6% (Crnich, Safdar, Maki, 2003; Gaynes, Edwards, NNIS, 2005).

Embora a frequência possa variar entre diferentes instituições de saúde, *P. aeruginosa* é considerada o segundo patógeno responsável por pneumonias hospitalares e pneumonias associadas à ventilação mecânica. É considerada o principal patógeno isolado de pacientes com pneumonia nosocomial desenvolvida após 4 dias de internação em uma UTI, e em pacientes que desenvolvem pneumonias após 4 dias de ventilação mecânica ou que tenham realizado traqueostomia percutânea. Nas UTIs pediátricas é relatada também, como a causa mais comum de pneumonia hospitalar (Driscoll, Brody, Kollef, 2007).

Em indivíduos queimados, a colonização por *P. aeruginosa* é bastante comum, aumentando significativamente durante a primeira semana de hospitalização (Mayhall, 2004). Esta bactéria é o principal agente de infecção de queimaduras e está relacionada a pneumonias, bacteremias e sepse em pacientes queimados (Sligl, Taylor, Brindley, 2006; Yildirim et al., 2005).

P. aeruginosa é, também, um importante patógeno de infecções do sítio cirúrgico. Dados do *National Nosocomial Infectious Surveillance System* (NNIS) do Center

for Diseases Control and Prevention (CDC), coletados entre 1986 a 2003, mostraram que 9,5% das infecções de sítio cirúrgico adquiridas por pacientes internados nas UTIs dos Estados Unidos foram causadas por esta bactéria (Gaynes, Edwards, NNIIS, 2005). As fontes de contaminação podem ser endógenas, devido à colonização prévia do paciente, ou exógena, por meio de antissépticos, dispositivos e equipamentos. As cirurgias torácicas e cardíacas apresentam maior risco de infecção por esta bactéria (Flaherty, Stosor, 2004).

As ITUs por *P. aeruginosa* estão, em geral, associadas a intervenções diagnósticas ou terapêuticas. Esta bactéria é considerada a terceira causa mais frequente de ITUs nosocomiais, principalmente em pacientes submetidos à sondagem vesical, procedimentos invasivos das vias urinárias e cirurgias urológicas (Bouza, Garcia-Garrote, Cercenado, 2003; Gaynes, Edwards, NNIIS, 2005; Yard, Cox, 2001).

Bacteremias causadas por *P. aeruginosa* ocorrem, frequentemente, em pacientes que fazem uso de cateter venoso central, em portadores de imunossupressão grave, pacientes com neoplasias malignas (principalmente leucemias agudas), AIDS, diabetes *mellitus* ou queimaduras extensas. Estas infecções estão relacionadas a um mau prognóstico e atingem altas taxas de mortalidade (Blot et al., 2003).

Pacientes com imunodeficiências primárias ou secundárias são mais suscetíveis à infecções por *P. aeruginosa*. A neutropenia causada por quimioterapia é um importante fator de risco para bacteremias por este agente e está relacionada às maiores taxas de mortalidade relatadas (30-50%) para infecções com *P. aeruginosa* (Mesaros et al., 2007).

Indivíduos infectados com o HIV, principalmente aqueles nos estágios mais avançados de AIDS, apresentam maior risco para desenvolver infecções pulmonares, bacteremias e sepse por *P. aeruginosa* (Vidal et al., 1999).

Pacientes que sofreram transplante de medula óssea ou transplante de órgãos sólidos exibem taxas aumentadas de bacteremias por *P. aeruginosa* quando comparados com pacientes hospitalizados e não transplantados. Este microrganismo é identificado como uma causa comum de infecções hospitalares em indivíduos submetidos a transplante duplos de coração-pulmão (Kramer et al., 1993; Lossos et al., 1995).

P. aeruginosa é um patógeno particularmente importante em pacientes portadores de fibrose cística, em quem as infecções crônicas e recorrentes são muito freqüentes, devido a uma colonização persistente dos seus seios paranasais e pulmões. Nas infecções crônicas, diferentes cepas de *P. aeruginosa* podem infectar um mesmo paciente, sendo comum a seleção de cepas que produzem o exopolissacarídeo alginato e formam biofilme. Os mutantes formadores de biofilme são protegidos da fagocitose, da atividade do

sistema complemento e são extremamente resistentes à ação dos antimicrobianos, o que favorece a persistência dos mesmos no pulmão e torna extremamente difícil a sua exterminação (Lee et al., 2005a). Hospitalizações freqüentes e altas taxas de mortalidade são verificadas entre pacientes pediátricos portadores de fibrose cística que apresentam culturas positivas para *P. aeruginosa*. Uma função pulmonar diminuída e baixo peso são verificados nestes pacientes em comparação com aqueles não colonizados ou infectados por *P. aeruginosa*. Os seios paranasais compreendem reservatório importante desta bactéria e predis põem a infecções recorrentes, mesmo após transplante de pulmão (Driscoll, Brody, Kollef, 2007).

Surtos de infecções por *P. aeruginosa* ocupam um lugar de destaque na literatura médico-hospitalar, especialmente aqueles causados por cepas multirresistentes. A forma de transmissão desta bactéria do ambiente para o paciente ocorreria devido a líquidos contaminados, por meio de contato direto, aspiração de aerossóis, ou transferência pelas mãos de profissionais da saúde. Como fontes de surtos de infecção por *P. aeruginosa* relacionados na literatura encontram-se: equipamentos de limpeza de ambientes, pias, endoscópios, broncoscópios, pasteurizadoras de leite, gaze para curativo, aparelhos de urodinâmica, água potável, soluções antissépticas, vasos de flores, entre outras (Kerr, Snelling, 2009). Os profissionais da área da saúde já foram identificados como fonte de surtos relacionados ao uso de unhas postiças e unha natural e à presença de otite externa intermitente e onicomicose. A transmissão ocorre com menor frequência quando técnicas assépticas recomendadas são seguidas por estes profissionais (Nouér, 2005).

A prevenção e o controle da colonização e infecção por *P. aeruginosa* requer uso racional dos antimicrobianos, adesão dos profissionais de saúde às praticas de higienização das mãos, precauções de contato para isolados multirresistentes, bem como adesão às técnicas de limpeza do ambiente e dos equipamentos médicos e hospitalares (Obritsch et al., 2005).

3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *P. AERUGINOSA*

3.1 DEFINIÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA

Na atualidade, diferentes expressões ou termos estão sendo utilizados na literatura biomédica para descrever os vários perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas bactérias. As expressões mais comumente verificadas são: multirresistência aos antimicrobianos (MR), extensiva resistência aos antimicrobianos (ER) e *pan*-resistência aos antimicrobianos (PR). Infelizmente, não existe nenhum critério aceito internacionalmente que padroniza a aplicação das mesmas em bactérias, com uma única exceção para *Mycobacterium tuberculosis*. Como resultado, estes termos são utilizados arbitrariamente originando divergências e confusões entre pesquisadores, profissionais da área da saúde e leitores de trabalhos científicos (Souli, Galani, Giamarelou, 2008).

Alguns estudos que tentam esclarecer a utilização destas expressões sugerem a seguinte padronização: MR se refere a isolados resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos com atividade significativa para uma espécie bacteriana. ER se aplica aos isolados resistentes a estas 3 classes significativas que caracterizam a MR e à mais uma ou duas outras classes de antimicrobianos. O termo PR é, em geral, utilizado quando a bactéria é resistente a todos os antimicrobianos disponíveis para o tratamento das infecções por uma espécie bacteriana (Fallagas, Bliozotis, 2007; Pappas, Saploura, Fallagas, 2009; Souli, Galani, Giamarelou, 2008).

Em *P. aeruginosa* estes termos são mais comumente aplicados da seguinte forma: isolados clínicos MR, em geral, são resistentes às penicilinas e cefalosporinas com atividade anti-pseudomonas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Os isolados clínicos considerados ER, mais comumente reportados, são resistentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos, apresentando sensibilidade apenas às polimixinas. Os isolados PR são resistentes a todas as classes disponíveis de antimicrobianos inclusive às polimixinas (Souli, Galani, Giamarelou, 2008; Falagas, Bliozotis, 2007).

3.2 IMPACTO CLÍNICO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O sucesso de *P. aeruginosa* como um dos mais importantes patógenos nosocomiais deve-se não somente à resistência intrínseca apresentada por esta bactéria, mas também à sua rapidez e habilidade para desenvolver resistência a qualquer antimicrobiano ao qual esteja exposta durante o tratamento das infecções (Mesaros et al., 2007).

A alta pressão seletiva exercida continuamente pelo uso abundante de antimicrobianos no ambiente hospitalar ocasionou o aparecimento de isolados clínicos MR, ER e PR. As infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* MR são complicadas e de difícil tratamento. Apresentam taxas de mortalidade três vezes mais altas que as infecções por isolados sensíveis. Além disso, estas infecções podem levar ao desenvolvimento de bacteremias secundárias a uma taxa nove vezes maior e prolongam o tempo de hospitalização do paciente em aproximadamente duas vezes, aumentando consideravelmente os custos hospitalares (Giamarellou, 2002; McGowan Jr, 2006).

Dados fornecidos por vários órgãos que realizam a vigilância da resistência entre isolados de *P. aeruginosa* demonstram uma tendência global na elevação das taxas de resistência aos antimicrobianos de diferentes classes. Embora existam variações geográficas nos padrões de resistência aos antimicrobianos o problema da MR em *P. aeruginosa* atinge todos os continentes e apresenta as maiores taxas na América do Sul, Europa e Ásia (Gaynes, Edwards, NNISS, 2005; Korten et al., 2007; Obritsch et al., 2005; Pappas, Saploura, Fallagas, 2009; Spellberg, et al., 2008).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* aumenta em maior proporção na América Latina que nos Estados Unidos. A prevalência da resistência ao meropenem dobrou seus valores de 17% em 1997 para 36% em 2001 e a taxa de multiresistência entre isolados de *P. aeruginosa* aumentou em mais que quatro vezes durante este período (de 4,1% para 17,1%) (McGowan Jr.; 2006).

Com o notável aumento na porcentagem de isolados ER, em um curto período de tempo, fez-se necessário retomar o uso clínico das antigas e tóxicas polimixina B e colistina (polimixina E). No entanto, múltiplos isolados de *P. aeruginosa* com sensibilidade diminuída a estes antimicrobianos foram relatados em anos recentes, limitando drasticamente as opções terapêuticas das infecções. Isto exemplifica a problemática da resistência máxima de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos e reforça a importância das medidas de controle de

infecção para diminuir ou retardar a disseminação deste agente no ambiente hospitalar (McGowan Jr.; 2006).

3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *P. AERUGINOSA*

Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em BGN incluem:

- alteração da ME resultando no decréscimo da permeabilidade ou no bloqueio da penetração dos antimicrobianos na célula bacteriana.
- extrusão do antimicrobiano da célula através de efluxo ativo
- inativação ou degradação enzimática dos antimicrobianos por enzimas endógenas
- alterações nas estruturas-alvo dos antimicrobianos através de mutações nos genes estruturais ou regulatórios que as codificam.

Praticamente todos os mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida, conhecidos para os BGNs, podem ser encontrados em *P. aeruginosa*. A extrema habilidade desta bactéria em utilizar e combinar estes mecanismos permite com que ela resista aos agentes tóxicos e sobreviva em ambientes como os hospitais modernos, com alta pressão seletiva exercida pelo uso abundante de antimicrobianos (Bonomo, Szabo, 2006; Hancock, Speert, 2000; Livermoore, 2002).

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos incluindo os β -lactâmicos, os macrolídeos, as tetraciclina, o cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim) e à maioria das fluoroquinolonas. Esta resistência é decorrente da integração de diferentes fatores como a baixa permeabilidade de sua membrana externa, da expressão constitutiva de vários sistemas de efluxo e da produção de enzimas inativantes de drogas (como por ex. as cefalosporinas) (Hancock, Speert, 2000). O fenótipo sensível de *P. aeruginosa* representado pela cepa selvagem (*wild type*) apresenta sensibilidade às carboxipenicilinas (ticarcilina, carbenicilina), ureidopenicilinas (piperacilina), combinações de beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases (piperacilina/tazobactam e ticarcilina/ácido clavulânico), cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftazidima, cefoperazona,

cefepime), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina), monobactâmicos (aztreonam), algumas fluoroquinolonas (levofloxacin e ciprofloxacina), carbapenêmicos (imipenem-cilastatina, meropenem e doripenem) e às polimixinas (colistina e polimixina B). No entanto, *P. aeruginosa* apresenta uma notável capacidade de desenvolver ou adquirir mecanismos de resistência a qualquer um destes agentes, frequentemente sob a influência de uma exposição prévia aos antimicrobianos (Driscoll, Brody, Kollef, 2007). Este microrganismo pode adquirir genes de resistência (ex. genes para beta-lactamases, para enzimas inativantes ou modificadoras de aminoglicosídeos), hiperexpressar sistemas ou bombas de efluxo, diminuir ou cessar a expressão de porinas, e desenvolver mutações nos genes que codificam os alvos para as quinolonas. Esta versatilidade pode estar relacionada ao grande tamanho e à complexidade de seu genoma, e à sua distribuição em habitats aquáticos, um reservatório para bactérias que carregam genes de resistência (Wright, 2007).

3.3.1 Alterações da Permeabilidade da ME

A ME das bactérias Gram-negativas constitui uma barreira semipermeável que diminui a velocidade de penetração dos substratos e antimicrobianos na célula bacteriana. É composta por uma bicamada assimétrica formada pelo LPS no folheto externo, fosfolipídeo (folheto interno) e de proteínas transmembrana denominadas porinas, estruturas protéicas que formam canais hidrofílicos através dos quais nutrientes essenciais penetram na célula bacteriana.

O LPS é largamente responsável pela impermeabilidade da ME às moléculas hidrofílicas de alguns antimicrobianos e detergentes. É composto pelo Lipídeo A, por um polissacarídeo “core” e pelo antígeno O. Os ácidos graxos do LPS são saturados dando à estrutura da ME um aspecto de gel, com baixa fluidez. A natureza do antígeno O, altamente carregado por cargas aniônicas e as ligações cruzadas do polissacarídeo por grupos fosfato e cátions divalentes, também contribuem para a baixa permeabilidade do LPS. A região do core do LPS de *P. aeruginosa* é mais fosforilada quando comparada com os cores dos LPS de outros BGN estudados, como resultado disto, a ME desta bactéria constitui uma forte barreira à difusão de substratos e antimicrobianos (Kumar, Schweizer, 2005).

Mutações em genes estruturais do LPS podem contribuir para a resistência aos antimicrobianos. Alterações nas cadeias laterais da molécula do polissacarídeo, com

mudança da estrutura e carga do mesmo pode ocasionar resistência a certos antimicrobianos. Estas mudanças geralmente ocorrem em resposta à pressão seletiva exercida por antimicrobianos, caracterizadas pela mutação em genes responsáveis pela síntese e organização dos polissacarídeos da ME. As mudanças nestes polissacarídeos parecem diminuir a capacidade de ligação de certos antimicrobianos catiônicos, levando ao desenvolvimento da resistência a antimicrobianos policatiônicos como à polimixina B e colistina (polimixina E) (Kumar, Schweizer, 2005).

A análise do genoma de *P. aeruginosa* identificou 163 genes que codificam proteínas na ME desta bactéria sendo que 64 destas correspondem a três famílias de porinas (*Outer porine* - Opr). Estas porinas são estruturas tridimensionais formando canais preenchidos por água que permitem a entrada, por difusão, de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular (sacarídeos, aminoácidos, fosfatos, cátions divalentes e sideróforos) e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1994). Dentre as difentes porinas, OprC, OprD, OprE e OprF que se encontram na ME de *P. aeruginosa*, a maior e a mais abundante é a porina OprF, um polipeptídeo de 36 kDa. A OprF é uma proteína constitutiva e inespecífica, utilizada por vários tipos de substratos para penetração na bactéria. Provavelmente, esta é, também, a porina mais utilizada pela maioria dos β -lactâmicos para penetrar no interior da bactéria (Vila, Marco, 2002). Embora esteja presente na ME de *P. aeruginosa* em um alto número de cópias e forme poros ou largos canais, esta proteína representa uma via de penetração ineficiente porque somente uma pequena proporção destas é funcional. Além disso, a OprF de *P. aeruginosa* transporta solutos lentamente (a uma taxa 2 vezes menor que em *E. coli*), dificultando a penetração de moléculas. Por isto, a permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* é limitada quando comparada a de outros BGN. A taxa geral de permeabilidade da ME desta bactéria é de aproximadamente 12-100 vezes menor que a de *E. coli*. Esta limitação da ME de *P. aeruginosa* somada aos sistemas de efluxo constitutivos são responsáveis em grande escala pela resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos (Hancock, Speert, 2000).

A proteína OprD, inicialmente denominada D2, é uma porina substrato-específica que facilita a difusão de aminoácidos básicos e pequenos peptídeos para o interior da célula. Os carbapenêmicos mimetizam dipeptídeos naturais e ligam-se aos sítios específicos para estes aminoácidos na OprD e, assim, utilizam-na para penetrar até o espaço periplasmático. Desta forma, a OprD parece servir como a via de penetração preferida dos carbapenêmicos na ME bacteriana. Alterações na porina OprD, diminuindo seu número ou sua expressão, altera significativamente a sensibilidade de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos

utilizados na terapêutica das infecções por *P. aeruginosa*: imipenem, meropenem e o mais novo carbapenêmico, doripenem (Lister, Wolter, Hanson, 2009; Livermoore, 2001).

Um estudo recente realizado por Sakyo e colaboradores (2006) comparou pares isogênicos de *P. aeruginosa* (constituído de cepas selvagens e de seus mutantes deficientes em OprD), para verificar o impacto da perda de OprD em termos de mudanças nos valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de carbapenêmicos. Este estudo demonstrou que a perda de OprD diminuiu a sensibilidade de *P. aeruginosa* ao meropenem de 4 a 32 vezes, ao imipenem de 4 a 16 vezes e de 8 a 32 vezes para o doripenem (Sakyo et al, 2006). Para os vários mutantes deficientes em OprD estudados, o impacto na potência do meropenem foi maior que o impacto na potência dos outros carbapenêmicos. No entanto, embora as CIMs do meropenem obtidas para os mutantes foram bem maiores que as CIMs do meropenem obtidas para as cepas selvagens, os valores destas variaram de 2 a 4 µg/mL, o que ainda está dentro dos valores de sensibilidade ao meropenem. Estes dados parecem conflitantes com o estudo anterior realizado por Perez e colaboradores (1996) que sugeriram que o meropenem utiliza vias alternativas à OprD para penetração através da membrana externa de *P. aeruginosa* e, portanto, pode não ser diretamente afetado pela deficiência em OprD como o imipenem. No entanto, Perez e colaboradores não estudaram pares de mutantes isogênicos na sua análise de deficiência em OprD e sensibilidade ao meropenem e utilizaram isolados clínicos não relacionados, que exibiam um fenótipo de resistência ao imipenem e sensibilidade ao meropenem (Perez et al, 1996).

Embora a perda de OprD pareça impactar a sensibilidade ao imipenem menos do que o meropenem (baseados nas mudanças verificadas nas suas CIMs), este mecanismo de resistência, frequentemente, eleva os MICs do imipenem acima do *breakpoint* de resistência estabelecido para este antimicrobiano (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

Meropenem e doripenem exibem uma potência intrínseca que é quatro vezes maior que aquela do imipenem (Brown, Traczewski, 2005). Desta forma, o impacto da deficiência de OprD na potência destes carbapenêmicos pode não elevar as CIMs acima dos *breakpoints* de sensibilidade, e mecanismos de resistência adicionais podem ser requeridos para que a bactéria possa desenvolver resistência a estes dois carbapenêmicos (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

Em geral, os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos mediados pela OprD envolvem diminuição na transcrição do gene *oprD*, que codifica esta porina, e/ou mutações que interferem na expressão de uma porina funcional na ME bacteriana.

3.3.2 Resistência Mediada por Efluxo

Enquanto a perda de porinas como OprD representam uma barreira efetiva para entrada dos antimicrobianos na célula, uma redução no acúmulo destas substâncias pode ser conseguida através da extrusão ativa das mesmas por sistemas de efluxo associadas à membrana.

Os sistemas de efluxo em bactérias têm sido agrupados em cinco famílias. Esta classificação é baseada primariamente na identidade da sequência dos aminoácidos ou na relação filogenética entre os sistemas, na fonte de energia utilizada para exportar o substrato, e na especificidade dos substratos exportados. Desta forma, as cinco famílias são: ABC (*ATP Binding Cassete*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) e RND (*Resistance-Nodulation-Division*) distribuídos tanto em bactérias Gram-negativas, como também em Gram-positivas (Poole, 2007)

Embora a análise da sequência do genoma de *P. aeruginosa* revelou a presença de sistemas de efluxo pertencentes a todas as cinco superfamílias, o maior número pertence à família RND, ou seja, foram identificados 12 sistemas de efluxo da família RND no genoma desta bactéria (Stover et al, 2000).

A família RND de sistemas de efluxo é a mais ampla em especificidade de substratos frente a antimicrobianos de relevância clínica e desempenha um importante papel na resistência intrínseca e adquirida em *P. aeruginosa*. Através do antiporte de íons H^+ , os sistemas RND de efluxo exportam grande variedade de substratos entre os quais estão incluídos antibióticos, antissépticos, biocidas, desinfetantes, detergentes, corantes, solventes orgânicos, hidrocarbonetos aromáticos, sais biliares, inibidores da síntese de ácidos graxos e homoserina lactona (Poole, 2007). Estas bombas podem, também, exercer papel fisiológico adicional na célula, como por exemplo, participam da comunicação célula a célula e da patogenicidade (Pidcock, 2006).

Os sistemas de efluxo da família RND, prevalentes em bactérias Gram-negativas geralmente existem como um sistema tripartido organizado da seguinte forma: i) uma proteína transportadora inserida na membrana citoplasmática que desempenha o papel de bomba propriamente dita, também chamada de transportador RND (*RND transporter*); ii) uma proteína de membrana externa ou porina, que forma o canal extrusivo denominada fator da membrana externa (*Outer membrane factor- OMF*); iii) o terceiro, um componente

essencial que é uma proteína de fusão localizada no espaço periplasmático que une os outros dois constituintes, a bomba e o canal de extrusão, denominada proteína de fusão da membrana periplasmática (*Periplasmatic membrane fusion protein- MFP*). Este complexo forma um canal que se estende pela membrana toda, permitindo o transporte de antimicrobianos do espaço citoplasmático e periplasmático para o ambiente extracelular (Lister, Wolter, Hanson, 2009) (Figura 1).

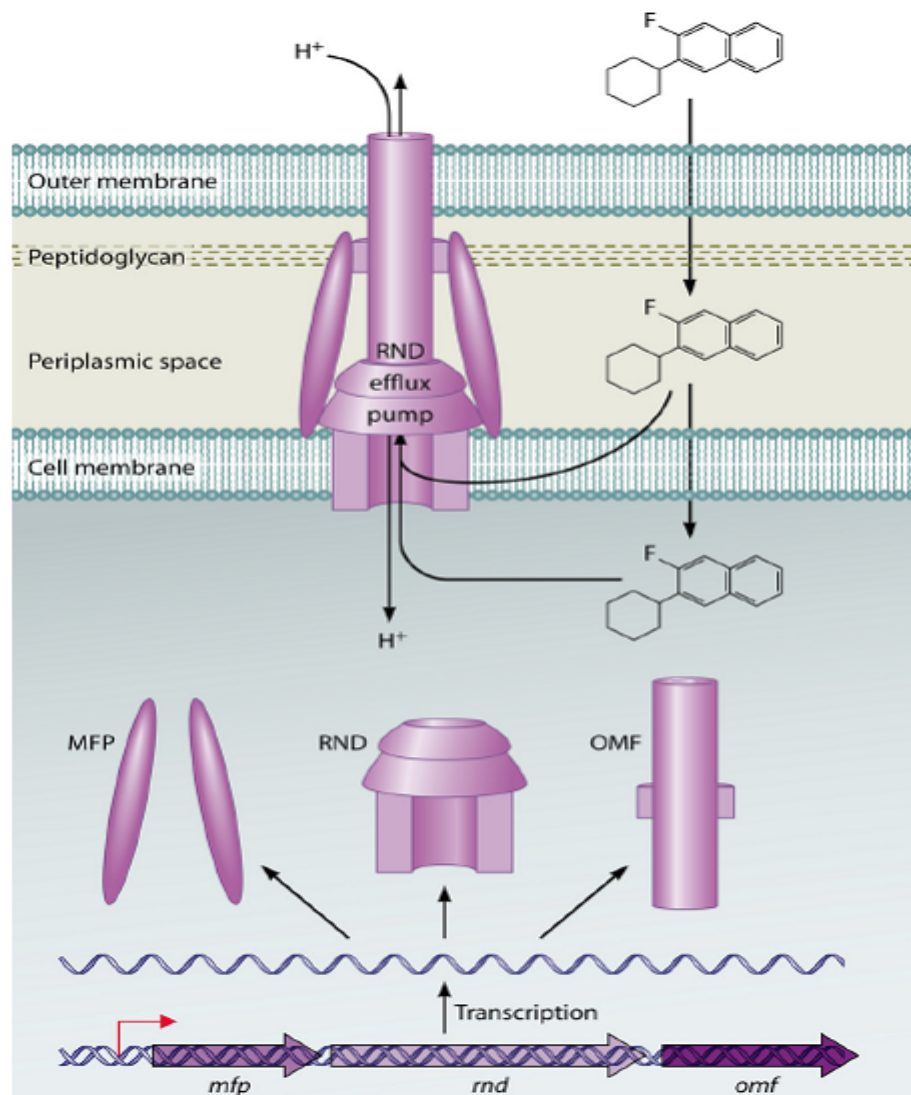


Figura 1 – Estrutura e função do sistema de efluxo RND em *Pseudomonas aeruginosa*. Este sistema existe como um complexo tripartido consistindo de um transportador da membrana citoplasmática (RND), uma proteína de fusão da membrana (MFP) e uma proteína da membrana externa (OMF). O complexo forma um canal que permite com que sejam transportadas os antimicrobianos do citoplasma através da membrana citoplasmática, espaço periplasmático, peptidoglicano e membrana externa. O sistema RND também pode exportar antimicrobianos do espaço periplasmático antes que elas atravessem a membrana citoplasmática.

Fonte: Lister; Wolter; Hanson (2009)

Os genes que codificam estes sistemas de efluxo estão organizados em operons no cromossomo de *P. aeruginosa*. Cada operon é composto de pelo menos dois genes, um codificando para a proteína de fusão e o outro para a proteína transportadora. Seis dos doze operons possuem um gene que codifica para uma porina, completando o sistema tripartido, enquanto os outros não possuem este gene. Vários operons tem um gene regulatório adjacente (transcrito na mesma orientação ou na orientação divergente do operon), cujo produto funciona como repressor ou ativador da expressão da bomba (Lister, Wolter, Hanson, 2009) (Figura 2).

Excluindo dois sistemas que são transportadores de cátions divalentes, os outros dez sistemas de efluxo caracterizados em *P. aeruginosa* são denominados: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OPmE, MexMN, e TriABC. Mex do inglês “multidrug eflux pump” e Tri referindo-se a “Triclosan efflux”. Dos sistemas RND de efluxo caracterizados em *P. aeruginosa*, somente MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY, tem sido relacionados, até o momento, à resistência intrínseca e adquirida a uma ampla variedade de antimicrobianos de importância clínica. Os outros sistemas Mex de *P. aeruginosa* provavelmente possuem limitada significância clínica, uma vez que, são capazes de ejetar um menor número de antimicrobianos (Poole, 2007).

Existem pelo menos 18 proteínas de membrana externa homólogas à OprM que podem estar associadas como porinas às diversas bombas de efluxo em *P. aeruginosa* (Jo, Brinkman, Hancock, 2003).

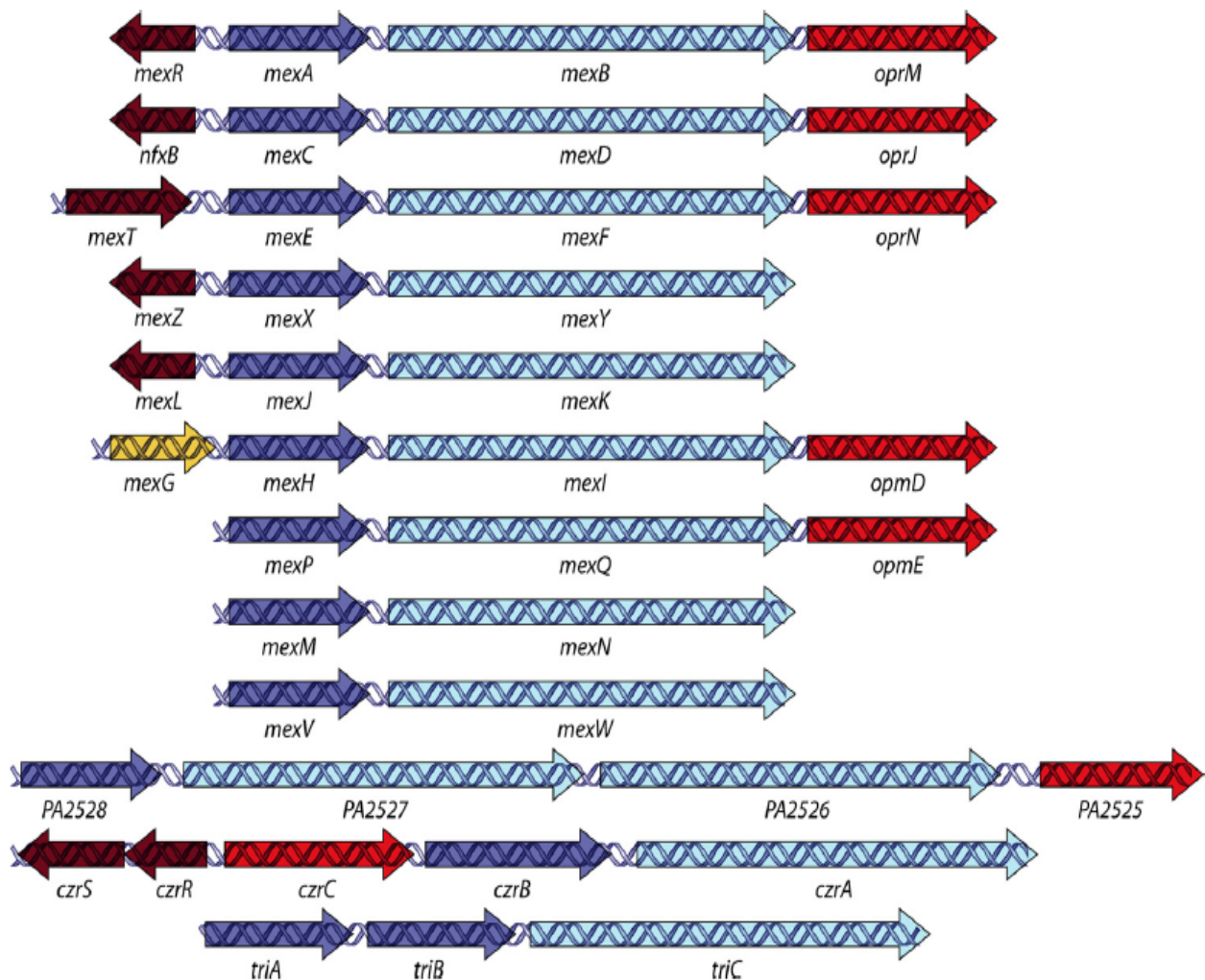


Figura 2 – Organização dos operons do sistema de efluxo RND no cromossomo de *Pseudomonas aeruginosa*. Os genes que codificam os componentes das proteínas ou bombas são apresentados pelos seus nomes correspondentes e os genes que codificam proteínas ainda não caracterizadas são designados como PA seguido pelos respectivos números que possuem no genoma de *P. aeruginosa*. Os genes são representados com o seguinte esquema de cores: seta de cor vinho - gene que codifica o regulador transcricional; seta azul escura - gene que codifica a proteína de fusão da membrana (MFP), seta azul clara gene que codifica a proteína transportadora RND; seta vermelha – gene que codifica a proteína de membrana externa (OPM); adicionalmente, a seta amarela, representa um gene que codifica uma proteína de função desconhecida.

Fonte: Lister; Wolter; Hanson (2009)

3.3.2.1 Sistema de efluxo MexAB-OprM

O MexAB-OprM foi o primeiro sistema de efluxo descrito em *P. aeruginosa*. É codificado pelo operon *mexAB-OprM* e expresso constitutivamente por cepas selvagens desta bactéria (Poole, 2005a). Este sistema possui uma ampla variedade de

substratos incluindo fluoroquinolonas, a maioria dos β -lactâmicos, inibidores de β -lactamases, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina, sulfonamidas, trimetoprim e tiolactomicinas. Em adição aos antimicrobianos, outros compostos podem ser exportados pelo sistema MexAB-OprM, como: corantes, detergentes, triclosan, solventes orgânicos, inibidores da síntese de ácidos graxos e homoserino lactonas associadas com *quorum-sensing*. A principal característica que o distingue dos outros sistemas de efluxo é a habilidade em exportar uma grande variedade de β -lactâmicos, tais como as carboxipenicilinas, o aztreonam, as cefalosporinas de espectro ampliado (ceftazidima e cefotaxima) e os carbapenêmicos meropenem e panipenem, mas não exportam o imipenem e o biapenem. O sistema MexAB-OprM participa na resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos agentes listados acima por meio da sua expressão constitutiva nas células do tipo selvagem (Poole, 2005a).

A expressão do sistema MexAB-OprM é regulada pela proteína MexR, codificada pelo gene *mexR*, localizado *upstream* ao operon *mexAB-oprM*. A proteína MexR, na forma de dímero se insere na dupla hélice de DNA na região intergênica *mexR-mexA*, correspondente à região promotora do operon, auto-regula a sua expressão e atua como repressor da expressão do sistema MexAB-OprM (Livermoore, Yang, 1987). Um segundo fator regulatório do operon *mexAB-oprM* é a proteína NalD, que apresenta atividade regulatória negativa direta sobre este operon quando liga-se à sua região promotora. Mutações no gene *nalD* resultam na resistência de *P. aeruginosa* à múltiplos antimicrobianos devido a repressão diminuída de *mexAB-OprM* (Lynch, Drusano, Mobley 1987).

A hiperexpressão do sistema MexAB-OprM foi detectada em três tipos de mutantes de *P. aeruginosa* resistentes à vários antimicrobianos, mutantes *nalB*, *nalC* e *nalD*. Estes mutantes foram selecionados *in vivo* e *in vitro* e apresentam altos níveis de resistência às fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas, inibidores de β -lactamases e ao meropenem, mas não ao imipenem. A hiperexpressão de MexAB-OprM parece ser o principal contribuinte para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

3.3.2.2 Sistema de efluxo MexCD-OprJ

MexCD-OprJ pode exportar uma variedade de agentes antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas, β -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetoprim e macrolídeos. Diferentemente do MexAB-OprM, o sistema MexCD-OprJ, não

apresenta um amplo perfil de substratos para os β -lactâmicos, exportando preferencialmente as cefalosporinas de quarta geração (cefepime, cefpiroma e ceftazolidim). A transcrição do operon *mexCD-OprJ* pode ser observada em células do tipo selvagem, mas os níveis de transcrição não são suficientes para produzir níveis detectáveis das proteínas. Em adição, a deleção do operon *mexCD-OprJ* não tem impacto na sensibilidade das cepas selvagens, indicando que este sistema de efluxo não contribui para a resistência intrínseca de *P. aeruginosa* (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

A expressão do *mexCD-OprJ* é regulada pelo produto de um gene denominado *nfxB* localizado *upstream* deste operon o qual é transcrito divergentemente do mesmo. A proteína NfxB regula negativamente a expressão do *mexCD-OprJ* por se ligar à região intergênica *nfxC-mexC*. Mutações dentro do gene *nfxB* parecem alterar a atividade repressora do NfxB, levando à hiperexpressão do *mexCD-OprJ* nos mutantes denominados mutantes *nfxB*. Várias mutações tem sido descritas para o gene *nfxB* em isolados clínicos ou cepas de laboratório de *P. aeruginosa*, tais como substituições, deleções e interrupções com sequências de inserção (SI) ou elementos *IS* (Poole et al., 1996).

Os mutantes *nfxB* são classificados em dois tipos: *nfxB* tipo A e tipo B, com diferentes níveis de produção de MexCD-OprJ e diferenças na sensibilidade aos antimicrobianos. O mutante *nfxB* tipo A apresenta resistência à ofloxacina, à eritromicina e às cefalosporinas de quarta geração e o mutante *nfxB* tipo B produz maiores quantidades de MexCD-OprJ, e apresenta resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol, em adição aos agentes mencionados para o tipo A (Masuda et al., 1996).

A expressão do operon *mexCD-OprJ* é induzível em resposta a compostos como cloreto de benzalcônio, gluconato de clorexidina, cloreto de tetrafenilfosfônio, brometo de etídeo, rodamina 6G e acriflavina, mas não em resposta a antimicrobianos relevantes clinicamente (Morita et al., 2001).

Uma característica importante dos mutantes *nfxB* é que, embora a hiperexpressão de *mexCD-OprJ* produza resistência à várias classes de antimicrobianos, verifica-se nestes mutantes, principalmente nos mutantes do tipo B, uma hipersensibilidade a vários β -lactâmicos e aminoglicosídeos. Os mutantes *nfxB* são de 4 a 8 vezes mais sensíveis as carbenicilinas, sulbenicilinas, cefpodoxima, ceftriaxona, aztreonam, carbapenênicos (imipenem, meropenem e biapenem) e aos aminoglicosídeos que as cepas selvagens de *P. aeruginosa* (Masuda et al., 2001). A hipersensibilidade destes mutantes ao aztreonam, meropenem e carbenicilina, foi previamente relacionada a uma concomitante diminuição da expressão do MexAB-OprM, que exporta estes antimicrobianos (Gotoh et al., 1998). No

entanto, durante análises de isolados clínicos (mutantes *nfxB*) verificou-se que os níveis de transcrição do gene *mexB* e os níveis de proteína MexB não estavam diminuídos ou regulados negativamente apesar da hipersensibilidade aos β -lactâmicos. Para explicar esta hipersensibilidade então, sugeriu-se que uma diminuição na atividade do sistema de efluxo MexAB-OprM pudesse ocorrer nestes mutantes (Jeannot et al, 2008). O mecanismo de hipersensibilidade ao imipenem permanece não caracterizado até o momento, embora alguns pesquisadores tenham sugerido que a hipersensibilidade de mutantes *nfxB* à este antimicrobiano possa ser decorrente de uma interferência na indução do gene *ampC* que codifica para a cefalosporinase AmpC ou na expressão de OprD, mas estas hipóteses não puderam ser confirmadas até o momento. O mecanismo responsável pela hipersensibilidade aos aminoglicosídeos também permanece desconhecido (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

3.3.2.3 Sistema de efluxo MexEF-OprN

Este sistema é expresso em cepas denominadas mutantes *nfxC*, os quais apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos. Os substratos reconhecidos pelo sistema MexEF-OprN incluem as fluoroquinolonas, o cloranfenicol, e o trimetoprim, não tendo afinidade aparente pelos β -lactâmicos. A seleção de mutantes *nfxC* pode ser observada in vitro após a exposição às fluoroquinolonas e acredita-se que estes mutantes também possam ser selecionados clinicamente (Kumar, Schweizer, 2005; Li, Barre, Poole, 2000).

A transcrição de *mexEF-OprN* é dependente da presença de MexT, uma proteína ativadora da sua transcrição, codificada pelo gene *mexT*, localizado *upstream* ao operon *mexEF-OprN* e que parece estar reprimido em cepas selvagens de *P. aeruginosa*. A transcrição de *mexT* é suficiente para ativar a expressão do operon MexEF-OprN, mas a transcrição de *mexT* é ativada pela ligação de moléculas efetoras, sugerindo que a expressão do *mexEF-OprN* é resultado da interação dessas moléculas que normalmente induzem sua expressão na presença de seus substratos fisiológicos (Kohler et al., 1999).

Variações em *mexT* são observadas entre cepas mutantes que hiperexpressam MexEF-OprN, porém a atividade regulatória de *mexT* parece estar relacionada ao produto de um gene localizado *upstream*, denominado *mexS*. Inativações no *mexS* parecem regular positivamente a produção de *mexT*, que por sua vez, regula

positivamente a expressão de *mexEF-OprN*. No entanto, a regulação deste operon é complexa e ainda não foi totalmente caracterizada (Sobel, Neshat, Poole, 2005).

Similar aos mutantes *nfxB*, os mutantes *nfxC* tornam-se hipersensíveis a certos β -lactâmicos e aminoglicosídeos. A hipersensibilidade aos β -lactâmicos foi associada com a repressão da hiperexpressão do *mexAB-OprM* pelo MexT (Poole, 2002).

Uma das principais características do sistema de efluxo MexEF-OprN consiste na sua co-regulação com a porina OprD, verificada em mutantes *nfxC* de *P. aeruginosa*. Isolados de *P. aeruginosa* que hiperexpressam *mexEF-OprN* (mutantes *nfxC*), tornam-se resistentes aos antibióticos que são exportados pela bomba, mas também perdem a sensibilidade ao imipenem que não é exportado por este sistema de efluxo. A perda da sensibilidade ao imipenem está associada com um decréscimo na expressão do gene *oprD* que codifica a porina OprD (Ochs et al., 1999). A proteína MexT é capaz de regular negativamente a expressão de *oprD* em nível transcricional e pós transcricional, causando uma significativa redução na quantidade da porina OprD na ME celular e, por consequência, dificultando a penetração do imipenem na célula bacteriana. Dessa forma, MexT parece atuar como um regulador global, controlando a expressão de *mexEF-OprN*, de OprD, e de genes relacionados a hiperexpressão de MexAB-OprM (Kohler et al., 1999, Ochs et al., 1999).

3.3.2.4 Sistema de efluxo MexXY

Em contraste aos outros operons descritos anteriormente, o operon *mexXY* não possui o gene que codifica a proteína de membrana externa. Para esta função o sistema MexXY utiliza a OprM, que também exerce a função de canal extrusivo para vários outros sistemas de efluxo identificados em *P. aeruginosa* (Mine et al., 1999). Possivelmente, outras proteínas de membrana externa como OpmB, OpmG, OpmH e OpmI possam ser, também, utilizadas pelo MexXY para formar um sistema tripartido funcional (Murata, Gotoh, Nishino, 2002).

Fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, β -lactâmicos específicos (isto é, cefepime), tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina são substratos para o sistema MexXY (Poole, 2002)

A deleção dos genes *mexXY* em cepas selvagens de *P. aeruginosa* resulta no aumento da sensibilidade aos aminoglicosídeos, à tetraciclina, e à eritromicina, indicando que

esse sistema é responsável pela resistência intrínseca de *P. aeruginosa* a estes antimicrobianos. A expressão do operon *mexXY* em *P. aeruginosa* é induzida na presença destes agentes. Acredita-se que o efluxo ativo de antimicrobianos pelo sistema MexXY seja o mecanismo responsável pela resistência adaptativa de *P. aeruginosa* aos aminoglicosídeos. A exposição prolongada de cepas selvagens de *P. aeruginosa* sensíveis aos aminoglicosídeos resulta no desenvolvimento de resistência a estes antimicrobianos e, conseqüente, à hiperexpressão desse sistema de efluxo (Hocquet et al., 2003).

O sistema MexXY quando está hiperexpresso em cepas mutantes de *P. aeruginosa*, também é capaz de causar resistência às fluoroquinolonas (que são substratos desta bomba de efluxo), apesar de não contribuir para a resistência intrínseca destes agentes pois os mesmos não conseguem induzir o operon *mexXY* (Mine et al., 1999).

O produto do gene *mexZ*, localizado *upstream* ao operon *mexXY*, regula negativamente a expressão deste operon. No entanto a expressão do operon *mexXY* parece ser regulado por múltiplos fatores (Poole, 2002).

Uma correlação positiva da expressão de MexXY com a resistência a cefepima foi observada em um estudo que avaliou isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes internados em um hospital francês e que apresentavam resistência a cefepime e sensibilidade a ceftazidima. A hiperexpressão do sistema de efluxo MexXY foi o mecanismo responsável por este fenótipo de resistência (Hocquet et al., 2006).

3.3.2.5 Sistema de efluxo MexJK

O sistema de efluxo MexJK foi identificado como resultado da exposição de *P. aeruginosa* ao triclosan, um biocida comumente utilizado em vários produtos de uso doméstico. O operon *mexJK* também não possui o gene que codifica a proteína de membrana externa, mas um sistema de três componentes é formado pela associação com as proteínas OprM ou OpmH. MexJK-OprM exporta eritromicina e tetraciclina da célula, enquanto MexJK-OpmH remove o triclosan (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

A exposição ao triclosan foi capaz de selecionar organismos que apresentam mutação no gene *mexL*, localizado imediatamente *upstream* ao operon *mexJK* e cujo produto de sua expressão exerce a função regulatória sobre este operon. O MexL liga-se na região

intergênica *mexL-mexJ* e reprime a transcrição do *mexJK* e a do *mexL*, desta forma autoregula negativamente a sua própria expressão (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

O sistema de efluxo MexJK parece não ser expresso em cepas selvagens de *P. aeruginosa* (Chuanchuen et al., 2005). A hiperexpressão deste sistema foi detectada em alguns poucos isolados clínicos, no entanto, a contribuição deste sistema para o desenvolvimento de fenótipos de resistência aos antimicrobianos no ambiente hospitalar permanece ainda desconhecido (Chuanchuen et al., 2005).

3.3.2.6 Outros sistemas de efluxo da família RND

As contribuições de outros sistemas de efluxo da família RND para a resistência começaram a ser elucidados:

A expressão do sistema MexGHI-OpmD é detectável em células do tipo selvagem de *P. aeruginosa* e está sobre o controle da proteína SoxR. Este sistema contém uma proteína de fusão MexH, localizada no espaço periplasmático, uma proteína de membrana interna MexI que funciona como bomba e uma proteína de membrana externa OpmD que representa o canal extrusivo. Também apresenta uma pequena proteína MexG, cuja função é desconhecida. Diversos estudos observaram que a expressão de MexGHI-OpmD confere resistência à norfloxacin, ao brometo de etídeo, à acriflavina, à rodamina 6G. Em adição, este sistema exporta vanádio (Aendekerk et al., 2002).

Os perfis de substratos dos sistemas de efluxo MexVW, MexPQ-OpmE e MexMN foram examinados utilizando um mutante deficiente nos outros sistemas de efluxo caracterizados ($\Delta meAB-oprM \Delta MexCD-oprJ \Delta mexEF-OprJ \Delta mexXY$) no qual foram introduzidos plasmídeos com genes que codificavam para cada sistema de efluxo a ser estudado individualmente (Li et al., 2003, Mima et al., 2005). MexVW utilizou OprM e outras proteínas de membrana externa para formar o sistema tripartido e exportar fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (Li et al., 2003). MexPQ-OpmE elevou as CIMs das fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e vários macrolídeos. A sensibilidade ao cloranfenicol e ao tianfenicol foi diminuída nas cepas receptoras contendo MexMN associado ao OprM (Mima et al., 2005).

TriABC foi a última bomba de efluxo a ser caracterizada para *P. aeruginosa*. O operon *triABC* difere de outros operons da família RND pois nele os genes

triA e *triB* codificam conjuntamente para proteínas de fusão da membrana e ambas são requeridas para exportar um substrato. A proteína externa OmpH associa-se com TriABC para organizar um sistema de efluxo funcional capaz de exportar triclosan. Nenhum antibiótico foi reportado como substrato para este sistema até o momento (Lister, Wolter, Hanson, 2009).

3.3.3 Inativação Enzimática dos Antimicrobianos

A inativação enzimática dos antimicrobianos por *P. aeruginosa* tem sido descrita como um mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos e aos β -lactâmicos. (Mesaros et al., 2007)

3.3.3.1 Inativação enzimática dos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos muito utilizados na terapia de infecções causadas por *P. aeruginosa*, principalmente nas infecções pulmonares e em pacientes com fibrose cística. Estes agentes são bactericidas e exibem sinergismo com outras classes de antimicrobianos como os β -lactâmicos, com os quais são frequentemente administrados nos regimes terapêuticos que associam estes fármacos. A resistência aos aminoglicosídeos, que possuem atividade anti-pseudomonas, inclui gentamicina, tobramicina e amicacina. A resistência a estas drogas é comum e está presente em praticamente todo o mundo, mas principalmente na Europa e na América Latina. A resistência está associada à hiper-expressão de bombas de efluxo (MexXY-OprM), pela produção de enzimas modificadoras destes antimicrobianos ou, em algumas situações, está relacionada à impermeabilidade da ME (Bonomo, Szabo, 2006; Poole, 2005b).

A inativação de aminoglicosídeos em cepas resistentes de *P. aeruginosa* envolve a modificação destes antimicrobianos por enzimas que efetuam a fosforilação (aminoglicosídeo fosfotransferases- APH), acetilação (aminoglicosídeo acetiltransferases- AAC) ou adenilação (aminoglicosídeo nucleotidiltransferases-ANT) das moléculas. Estas enzimas são determinantes comuns de resistência aos aminoglicosídeos em *P. aeruginosa*, sendo que um único isolado desta bactéria pode carregar múltiplos determinantes de

resistência (de 2 a 5 enzimas diferentes) e, dessa forma, exibir resistência de amplo espectro aos aminoglicosídeos (Poole, 2005b).

A acetilação dos aminoglicosídeos pelas AACs pode ocorrer nas posições 1,3,6' e 2' dos grupos amino destes antimicrobianos e envolve praticamente todos os compostos de uso clínico (gentamicina, tobramicina, netilmicina e amicacina). As enzimas que acetilam a posição 3 – AAC(3) e a posição 6'-AAC(6'), foram as primeiras a serem descobertas em *P. aeruginosa* e permanecem como as mais comuns acetiltransferases (Poole, 2005b).

A inativação dos aminoglicosídeos tais como kanamicina, neomicina, e estreptomicina pela fosforilação é realizada pelas fosfotransferases APH(3') que modificam a região 3'-OH destes antimicrobianos. Várias APH(3') foram descritas em *P. aeruginosa* e são predominantes em isolados clínicos resistentes a kanamicina e neomicina. Enzimas APHs que promovem resistência a outros aminoglicosídeos incluem a APH(3')-VI que confere resistência a amicacina e isepamicina e a APH(2'') que confere resistência a gentamicina e tobramicina.

A adenilação dos aminoglicosídeos estreptomicina e gentamicina por cepas resistentes de *P. aeruginosa* é mediada pelas enzima ANT(2'')-I que juntamente com a AAC(6') e a AAC(3), representam os determinantes de resistência aos aminoglicosídeos mais comuns em *P. aeruginosa*. A ANT(2'') inativa a gentamicina e a tobramicina mas não atua sobre a amicacina ou netilmicina. Outras ANTs que estão associadas com resistência aos aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* incluem a ANT(3'') que confere resistência a estreptomicina e a ANT(4')-II, associada à resistência à amicacina, tobramicina e isepamicina (Poole, 2005b).

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos podem ser codificadas por genes cromossomais, localizados em elementos genéticos que carregam determinantes de resistência adicionais. Os genes *aac(3)* e *aac(6)* estão associados com transposons e/ou integrons em *P. aeruginosa* que carregam adicionalmente genes para ESBL, MβL, e até mesmo genes para outras enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. A presença destes determinantes em integrons com múltiplos genes de resistência pode explicar a MR em isolados de *P. aeruginosa* (Hancock, Speert, 2000; Mesaros et al., 2007; Poole, 2005b).

3.3.3.2 Inativação enzimática dos β -lactâmicos

A produção de β -lactamases (β -las) é o mais importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. Estas enzimas constituem uma família de proteínas muito eficazes nos BGNs porque se concentram no espaço periplasmático e degradam ou modificam as moléculas dos β -lactâmicos antes que eles possam alcançar suas estruturas-alvo na célula bacteriana, as proteínas ligadoras de penicilina - PBPs (*Penicillin-Binding Protein*). As β -las ligam-se covalentemente à molécula carbonil do anel β -lactâmico e hidrolisam sua ligação amida, inativando o antimicrobiano (Babic, Hujer, Bonomo, 2006; Livermoore, Woodford, 2006).

Devido ao crescente número de β -las identificadas e a diversidade de características bioquímicas e moleculares apresentadas pelas mesmas, diferentes esquemas de classificação foram propostos para estas enzimas.

Em 1980, Ambler propôs classificar as β -las com base na sua estrutura protéica primária e na identidade da suas seqüências de aminoácidos em quatro classes moleculares principais:

- classe A: serino β -lactamases, incluindo as β -lactamases de espectro ampliado (ESBL), penicilinases e carbenicilinases;
- classe B: metalo- β -lactamases
- classe C: cefalosporinases codificadas por genes cromossomais
- classe D: oxacilinases.

Uma segunda classificação proposta por Bush em 1989 correlacionava o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima (Bush, 1989a; Bush, 1989b). Em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram uma atualização da classificação inicial de Bush que combinava as características estruturais e funcionais das β -las.

A tabela 1 apresenta de modo simplificado a correlação entre a classificação molecular de Ambler (1980) e a de Bush-Jacoby-Medeiros(1995) para as β -las.

Enzimas β -las de todas as classes são produzidas por isolados clínicos de *P. aeruginosa*, e desempenham um papel muito importante na resistência aos β -lactâmicos. Os genes codificadores de β -lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou

em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons. Genes que codificam β -las (genes *bla*) são descritos continuamente como genes cassetes ancorados em integrons e estes elementos, por sua vez, podem estar localizados em plasmídeos e transposons atuando como importantes fontes de disseminação de genes *bla* e de outros determinantes de resistência em procariotos (Mesaros et al., 2007).

A tabela 2 apresenta as principais β -las produzidas por *P. aeruginosa*. Apresentaremos nas seções seguintes apenas a revisão referente às enzimas do grupo funcional 1- classe molecular C, AmpC ou cefalosporinases cromossomais e às enzimas do grupo funcional 3-classe molecular B – M β L.

Tabela 1 – Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.

Classificação de BUSH-JACOBY-MEDEIROS, 1995		Classificação de AMBLER, 1980	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas codificadas por genes cromossômicas e plasmidiais em Gram negativos. Isoladamente, conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A, D	Grande maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos graus de resistência às penicilinas.
	2b	A	β -lactamases de espectro limitado de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1, TEM-2 e SHV-1.
	2be	A	β -lactamases de espectro ampliado conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
	2br	A	β -lactamases derivadas de TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases (IRT).
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina com maior eficiência
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); fracamente inibidas pelo ácido clavulânico
	2e	A	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens possuem serina no sítio ativo e são inibidas pelo ácido clavulânico
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico
4		ND	Enzimas com estrutura de aminoácidos não determinada e que não são classificadas nos outros grupos

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado de Bush; Jacoby; Medeiros, 1995).

Tabela 2 – β -lactamases identificadas em *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular

Grupo funcional de BUSH-JACOBY-MEDEIROS	Classe molecular de AMBLER	Enzimas	Referências
1	C	AmpC (PDC-1, PDC-2 ^a , PDC-3 ^a , PDC-4, PDC-5 ^a , PDC-6, PDC-7, PDC-8, PDC-9, PDC-10)	(Rodriguez-Martinez et al., 2009)
2b	A	TEM-1, TEM-2, TEM-90 (TLE-1), TEM-110, SHV-1	(Kalai et al., 2009; Strateva & Yordanov, 2009)
2be	A	PER-1, PER-2 VEB-1, -2, -3 TEM-4, -21, -24, -42, -116 SHV-2a, -5, -12 GES-1, -2 ^b , -5 ^b , -8 (IBC-2), -9 BEL CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-43	(Strateva, Yordanov, 2009), (Celenza et al., 2006) (Strateva, Yordanov, 2009), (Jiang et al., 2006) (Strateva, Yordanov, 2009) (Strateva, Yordanov, 2009) (Strateva, Yordanov, 2009) (Poirel et al., 2005; Strateva, Yordanov, 2009) (al Naiemi et al., 2006; Celenza et al., 2006; Picao et al., 2009)
2c	A	PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3, CARB-4, CARB-like, AER-1	(Strateva & Yordanov, 2009)
2d	D	Espectro restrito: LCR-1, NPS-1, OXA-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, -10, -12, -20, -21, -30, -31, -46 ESBL: OXA-4, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -18, -28, -31, -32, -35, -45 e -143. carbapenemase - cromossomal: OXA-50 - adquirida: OXA-24/40	(Sanschagrín et al., 1998) (Giuliani et al., 2005; Pai, Jacoby, 2001; Strateva, Yordanov, 2009) (Paterson, Bonomo, 2005) (Girlich et al., 2004; Poirel, Naas, Nordmann, 2009) (Sevillano et al., 2009)
2f	A	KPC-2, KPC-5.	(Bennett et al., 2009; Villegas et al., 2007; Wolter et al., 2009)
3	B	IMP-1, -4, -6, -7, -9, -10, -12, -13, -15, -16, -18, -22. VIM-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -11, -13, -15, -16, -17, -18. SPM-1 GIM-1 AIM-1	(Strateva, Yordanov, 2009; Bert et al., 2007; Docquier et al., 2003; Duljasz et al., 2009; Garza-Ramos et al., 2008; Iyobe et al., 2002; Mendes et al., 2004; Ryoo et al., 2009). (Castanheira et al., 2009; Koh et al., 2008; Siarkou et al., 2009) (Toleman et al., 2002) (Castanheira et al., 2004) (Yong et al., 2007)

^a: Variantes que apresentam maior atividade contra cefepime e imipenem, consideradas ESAC (cefalosporinas de espectro estendido)

^b: Variantes que apresentam atividade hidrolítica contra imipenem.

Fonte: Picão, (2009); Zavascki et al. (2010).

As β -las do grupo funcional 1 ou da classe molecular C, denominada AmpC, são codificadas por genes localizados no cromossomo de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e em algumas espécies de enterobactérias. Estas enzimas hidrolisam penicilinas e cefamicinas com grande eficiência, enquanto hidrolisam o aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração com menor eficiência. Normalmente, as cefalosporinas de quarta geração e os carbapenêmicos são fracamente hidrolisados por AmpC (Jacoby, 2009)

Entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* do tipo selvagem, a produção desta β -la está normalmente reprimida, havendo a produção da mesma em baixas quantidades ou em níveis basais, na ausência de β -lactâmicos. No entanto, na presença de β -lactâmicos indutores, estas enzimas passam a ser produzidas em grande quantidade. Alguns β -lactâmicos como a ampicilina e as cefalosporinas de 1^a e 2^a geração são considerados fortes indutores de AmpC embora sejam hidrolisados pelas mesmas. Os carbapenêmicos, principalmente o imipenem, são fortes indutores. No entanto, permanecem estáveis à sua hidrólise sendo o meropenem mais estável à hidrólise da AmpC que o imipenem. O mecanismo de indução de AmpC é controlado pela atividade de três proteínas AmpG, AmpD e AmpR. O grau de indução depende do β -lactâmico indutor e, em alguns casos, a produção dessa enzima pode aumentar de 100 a 1000 vezes. Quando esses antimicrobianos indutores são retirados do meio, a produção volta a níveis basais (Jacoby, 2009; Lodgee, Piddock, 1991).

Durante a terapia antimicrobiana às infecções por *P. aeruginosa*, pode ocorrer a seleção de mutantes parcial ou totalmente “desreprimidos” que hiperproduzem AmpC β -la permanentemente. As mutações que ocorrem nos genes *ampR* e *ampD* podem causar hiperexpressão constitutiva de *ampC*, ou seja, a produção destas β -lactamases não diminui com a retirada do agente indutor. Os mutantes apresentam o fenótipo desreprimido, e mostram-se também resistentes às cefalosporinas de quarta geração cefepima e ceftiroma. As ureidopenicilinas e a piperacilina, tão bem quanto as cefalosporinas de espectro ampliado são β -lactâmicos considerados indutores fracos, mas capazes de selecionar estes mutantes. A frequência de mutações que leva à produção de β -lactamases AmpC desreprimidas em uma população de *P. aeruginosa* é de 10^{-7} a 10^{-9} por unidade formadora de colônia (UFC) (Jacoby, 2009; Schmidtke, Hanson, 2006).

Recentemente, pesquisadores franceses detectaram variantes enzimáticas de AmpC, as quais apresentavam mutações nos genes codificadores destas enzimas. As mutações levavam a substituições de aminoácidos específicos nos sítios ativos das enzimas e promoviam um aumento do espectro hidrolítico das mesmas, podendo hidrolisar o imipenem.

Estas variantes de AmpC foram denominadas cefalosporinases de espectro ampliado (estendido) e passaram a ser conhecidas na literatura mundial como *Extended-Spectrum AmpCs*- ESACs. Os autores que caracterizaram estas variantes de AmpC enzimas propuseram que as mesmas fossem nomeadas como PDE, *Pseudomonas-derived cephalosporinases* (Rodriguez-Martinez et al., 2009).

As metalo-beta-lactamases classificadas no grupo funcional 3 e classe molecular B serão descritas mais detalhadamente na próxima seção (seção 4).

3.3.4 Alteração das Estruturas-Alvo dos Antimicrobianos

Em *P. aeruginosa* este mecanismo pode conferir resistência aos β -lactâmicos por alterações nas PBPs, aos aminoglicosídeos pela metilação do RNA ribossomal 16S e às quinolonas pela modificação dos alvos primários de ligação destes antimicrobianos.

3.3.4.1 Alteração de PBPs

O mecanismo mais raro de resistência aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa* envolve modificações no seu sítio alvo, as PBPs. PBP-4s alteradas, com baixa afinidade por β -lactâmicos foram detectadas em isolados recuperados de pacientes após o tratamento com imipenem. Após a administração de altas doses de piperacilina em um portador de fibrose cística, uma diminuição gradual da afinidade das PBPs por penicilina G foi correlacionada com a resistência aos β -lactâmicos e a um aumento na expressão da PBP-6. A hiperprodução de PBP-3 também foi relacionada à redução da sensibilidade ao aztreonam, cefepime, cefsulodina e ceftazidima (Pechere, Kohler, 1999; Strateva, Yordanov, 2009)

3.3.4.2 Metilação do RNA ribossomal 16S

A metilação do RNAr 16S tem emergido recentemente como um novo mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos entre BGNNF como *P. aeruginosa* e *A.*

baumanii e em espécies da família Enterobacteriaceae (Doi, Arakawa, 2007). Este evento é mediado por um novo grupo de metilases do RNAr 16S. Os genes que codificam estas enzimas estão localizados em transposons, que por sua vez encontram-se em plasmídeos transferíveis, os quais promovem a transferência horizontal destes genes, explicando parcialmente a grande distribuição mundial deste novo mecanismo de resistência (Strateva, Yordanov, 2009).

A primeira metilase do RNAr 16S, denominada RmtA foi descrita em um isolado clínico de *P. aeruginosa* resistente aos aminoglicosídeos, recuperada no Japão em 2003 (Yokoyama et al., 2003). A enzima conferiu alto nível de resistência a todos os aminoglicosídeos administrados por via parenteral, incluindo amicacina, tobramicina, isepamicina, kanamicina, arbekacina e gentamicina (CIMs > 1024 µg/mL). O gene estrutural da RmtA estava associado a um elemento genético semelhante ao transposon Tn5041 (que codifica resistência ao mercúrio) de um plasmídeo transferível (Yamane et al., 2004).

Uma nova metilase RNAr 16S, denominada RmtD, foi identificada em um isolado clínico PR de *P. aeruginosa* recuperada em 2005, de um paciente no Brasil. Bactérias produtoras desta enzima apresentaram alto nível de resistência à amicacina, tobramicina e gentamicina e esta enzima exibiu um moderado grau de identidade com a RmtA. O referido isolado produzia concomitantemente SPM-1 que conferia resistência a todos os β-lactâmicos (Doi et al, 2006). Uma taxa de 51% de co-produção de RmtD e SPM-1 foi verificada em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem recuperados no Hospital São Paulo em 2007, sugerindo que este achado é um fenômeno comum nesta área geográfica (Doi et al., 2007).

3.3.4.3 Alteração dos alvos de ligação das quinolonas

Dois mecanismos estão envolvidos na resistência de *P. aeruginosa* a estes antimicrobianos: mutações nos genes regulatórios dos sistemas de efluxo (principalmente MexXY-OprM e MexCD-OprJ) e mutações associadas às enzimas-alvo das quinolonas, a DNA girase (DNA Gyr) e a topoisomerase IV. O segundo mecanismo parece ser o mais importante e essencial para conferir resistência às quinolonas em *P. aeruginosa* e altos níveis de resistência a estas antimicrobianos são verificados quando ocorre associação dos dois mecanismos (Bonomo, Szabó, 2006).

As enzimas DNA Gyrase e Topoisomerase IV são compostas por dois pares de sub-unidades. As sub-unidades da DNA Gyrase são GyrA e GyrB, codificadas respectivamente pelos genes *gyrA* e *gyrB* e as subunidades correspondentes da Topoisomerase IV são ParC e ParE codificadas pelos genes *parC* e *parE*. As duas enzimas atuam em conjunto na célula bacteriana nas etapas de replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA. As quinolonas bloqueiam a ação destas enzimas por ligarem-se em locais específicos das sub-unidades formando um complexo irreversível DNA-Enzima-Antimicrobiano, ocorrendo a denaturação enzimática e quebras na dupla fita do DNA (Jacoby, 2005; Lambert, 2005).

A resistência às quinolonas resulta de mutações cromossômicas nos genes que codificam as suas sub-unidades, principalmente no gene *gyrA* (em *P. aeruginosa* e nos BGN, em geral). Estas mutações resultam em substituições nos aminoácidos da subunidade GyrA (frequentemente nos aminoácidos de número 83 ou 87) numa região denominada *Quinolone Resistance Determining Region* - QRDR. Uma vez alteradas, as sub-unidades reduzem a afinidade pelas quinolonas, resultando numa diminuição da ligação destes antimicrobianos ao complexo DNA-enzima e proporcionando resistência a estes fármacos em diferentes níveis (Higgins et al., 2003).

Altos e baixos níveis de resistência ao ciprofloxacina estão associados com mutações no *gyrA*. Mutações no gene *parC* são encontradas em isolados altamente resistentes nos quais ocorre conjuntamente a mutação em *gyrA*. Mutações nos genes *gyrB* já foram descritas, mas são menos comuns e conferem menores níveis de resistência que as mutações nos genes *gyrA* (Bonomo, Szabó, 2006; Higgins et al., 2003).

4 METALO-BETA-LACTAMASES

As MβLs constituem um grupo de enzimas que receberam esta denominação porque utilizam um ou dois ions zinco (Zn^{+2}) ou outros cátions divalentes no seu sítio ativo para catalisar a hidrólise do anel β-lactâmico. Embora sejam capazes de inativar todas as classes de β-lactâmicos, com exceção apenas do aztreonam, estas hidrolases são enzimas especiais, pois exercem uma atividade hidrolítica eficiente e constante sobre a classe mais estável de β-lactâmicos, os carbapenêmicos. Esta característica fez com que as MβLs sejam conhecidas também, como carbapenemases. Na verdade, estas enzimas constituem o grupo mais importante de carbapenemases detectados na atualidade e o mais prevalente determinante de resistência aos carbapenêmicos isolados de patógenos clinicamente importantes como *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e outras espécies da família Enterobacteriaceae (Bebrone, 2007; Maltezou, 2008).

A capacidade de disseminação destas enzimas entre espécies de microrganismos clinicamente importantes, as dificuldades para detecção das mesmas, bem como a indisponibilidade, até o momento, de inibidores de MβLs, tornaram a emergência destas enzimas um problema de saúde pública e um desafio terapêutico mundial (Maltezou, 2008).

4.1 CLASSIFICAÇÃO DAS MβLS

Baseado nas propriedades funcionais das MβLs, Bush classificou estas enzimas como pertencentes ao grupo 3 das β-lactamases (Bush, 1989b). Este esquema foi primariamente baseado nas seguintes características universais apresentadas pelas MβLs:

- capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos, principalmente o imipenem.
- inibição universal das mesmas pelo ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) ou outros agentes quelantes de íons metálicos (zinco), como os compostos derivados do ácido tiolático (ex. ácido 2-mercaptopropiônico)
- resistência aos inibidores das serino-β-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

A habilidade das MβLs para realizar a hidrólise do imipenem e dos outros β-lactâmicos pode variar consideravelmente e a taxa de hidrólise pode ou não estar correlacionada com o nível de resistência da bactéria aos carbapenêmicos, ou seja, nem sempre a produção destas enzimas confere altos níveis de resistência aos carbapenêmicos. (Walsh et al., 2005).

Rasmussem e Bush (1997) atualizaram esta classificação separando as enzimas nos subgrupos 3a, 3b e 3c, com base na hidrólise do imipenem e de outros β-lactâmicos:

- 3a- possuem amplo espectro de atividade sobre os β-lactâmicos
- 3b- apresentam atividade preferencial por carbapenêmicos,
- 3c- hidrolisam fracamente os carbapenêmicos em comparação a outros substratos β-lactâmicos.

Na classificação molecular das β-lactamases feita por Ambler em 1980, as MβLs foram classificadas na classe B, pois apresentavam ions divalentes (Zn^{+2}) como cofatores no seu sítio ativo. As MβLs diferiam de outras carbapenemases agrupadas na classe A pois estas últimas apresentavam, no seu sítio ativo, o aminoácido serina, sendo então, denominadas serino carbapenemases (Ambler, 1980). Com a obtenção da sequência de nucleotídeos das MβLs, Galleni e colaboradores (2001) subdividiram o grupo B em 3 subclasses: B1, B2 e B3. Este esquema foi atualizado por Garau e colaboradores (2004) após a elucidação da estrutura tridimensional de algumas MβLs representantes de cada subclasse.

As enzimas agrupadas na subclasse B1, são representadas pela enzima protótipo BCII de *Bacillus cereus*, CCra de *Bacteroides fragilis*, BlaB de *E. meningoseptica* e EBr-1 de *Ependobacter brevis* (Bebrone, 2007). Neste subgrupo estão acomodadas também as MβLs adquiridas (IMP, VIM, GIM, SIM, SPM-1) (Walsh et al., 2005).

As enzimas da subclasse B2 incluem as MβLs intrínsecamente produzidas por várias species de *Aeromonas*, como a Cph produzida por *Aeromonas hydrophyla* e ImiS produzida por *Aeromonas veronii*, tão bem quanto a Sfh-I produzida por *Serratia fonticola* (Bebrone, 2007; Walsh et al, 2005).

A subclasse B3 das MβLs incluem a L1 e a GOB produzidas por isolados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, respectivamente e por FEZ-1 isolada de *Legionella gormanii*. Pertecem também à subclasse B3, as MβLs produzidas por isolados ambientais como: THIN-B, Mbl1b e BJP-1, produzidas

respectivamente por *Janthinobacter lividum*, *Caulobacter crescentus* e *Bradyrhizobium japonicum* (Bebrone, 2007; Walsh et al, 2005).

Como todas as β -lactamases, as M β LS são, também, classificadas como M β LS cromossômicas (aquelas codificadas por genes cromossomais) e as M β LS móveis ou transferíveis que podem ser codificadas por genes cromossomais ou podem estar presentes em elementos genéticos móveis como plasmídeos ou transposons (Walsh et al., 2005).

4.2 MBLs INTRÍNSECAS

As M β LS codificadas por genes cromossomais podem ser produzidas natural ou intrinsecamente por alguns microrganismos encontrados no meio ambiente e, menos frequentemente, por alguns agentes patogênicos considerados oportunistas, como resultado da pressão seletiva exercida pela exposição aos β -lactâmicos ao longo dos anos (Bebrone, 2007).

A primeira M β L foi identificada em 1966 em *Bacillus cereus*, sendo denominada BCII. Durante as duas décadas seguintes esta foi a única M β L detectada e, portanto, considerada apenas uma curiosidade bioquímica. Uma segunda penicilinase zinco-dependente foi descrita em 1982 em *S. maltophilia* (denominada L1) (Bebrone, 2007). Posteriormente foram descritas M β LS codificadas por genes cromossomais em várias outras bactérias: *Aeromonas* spp., *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas sobria*, *Bacillus anthracis*, *Caulobacter crescentus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Chryseobacterium gleum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Janthinobacterium lividum*, *Legionella gormanii*, *Serratia fonticola*, *Bradyrhizobacterium japonicum*, *Erwinia carotovora* (Bebrone, 2007; Stoczko et al, 2008).

4.3 MBLs MÓVEIS OU TRANSFERÍVEIS

Até o início dos anos 90 as M β L foram descritas como espécie-específicas, produzidas intrinsecamente e codificadas cromossomicamente por microrganismos de pouca relevância clínica. A partir desta década, começaram a ser descritas M β LS codificadas por genes inseridos em elementos genéticos móveis, em patógenos clinicamente importantes, tais

como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e em membros da família Enterobacteriaceae (Maltezou, 2008; Galani et al., 2007, Tognim et al., 2006). Estas enzimas passaram a ser conhecidas como M β L móveis ou adquiridas e geraram grande preocupação na comunidade médico-científica dado o potencial para sua disseminação e as limitações no tratamento das infecções causadas por estes patógenos (Walsh et al., 2005).

As M β L adquiridas são codificadas por genes *bla* (bla-beta-lactamases) tipicamente encontrados como genes cassettes em integrons da classe 1, que por sua vez, podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos. Estes genes movem-se entre os microrganismos principalmente por meio de plasmídeos conjugativos, facilitando a sua disseminação horizontal (Walsh, 2006).

Atualmente são conhecidas 9 subclasses de M β Ls adquiridas: IMP (imipenemase) (Watanabe et al., 1991, Osano et al., 1994), VIM (*Verona-Integron-encoded metallo-beta-lactamase*) (Lauretti et al., 1999), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) (Toleman et al., 2002), GIM (German imipenemase) (Castanheira et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (Lee et al., 2005), AIM (Australian imipenemase) (Young et al., 2007), KHM-1 (Kyorin Health Sciences M β L) (Sekiguchi et al., 2008), NDM (Nova Dheli M β L) (Young et al., 2009) e DIM-1, a mais recente M β L detectada em um isolado de *P. stutzeri* recuperado na Holanda.

Em *P. aeruginosa* foram descritas, até o momento, as subclasses IMP, VIM, SPM, GIM e AIM (Gupta, 2008).

4.4 CONTEXTO GENÉTICO E DISSEMINAÇÃO DAS MBL MÓVEIS

A grande capacidade de aquisição e disseminação dos genes que codificam as M β Ls entre espécies bacterianas de importância clínica contribuíram para que estas enzimas constituíssem um dos principais determinantes de resistência aos carbapenêmicos entre os BGNs (Maltezou, 2008).

Embora a transferência vertical de genes seja um processo importante para o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos em procariotos, a transferência horizontal dos genes codificadores das M β L tem exercido papel fundamental na aquisição e rápida mobilização dos mesmos entre bactérias da mesma espécie e/ou entre espécies e gêneros distintos. Uma variedade de elementos genéticos podem estar envolvidos

neste processo como: integrons da classe 1 e 3, transposons, plasmídeos e os mais recentemente relatados elementos *ISCR*, do inglês *Insertion Sequences Common Regions* também denominados elementos *CR* (*Common regions*) (Gupta, 2008; Toleman, Benet, Walsh, 2006). As combinações ou arranjos e as permutas destes elementos genéticos dentro das/ou entre as células bacterianas originam complexos genótipos que, por sua vez, resultam em desafiadores fenótipos de resistência aos antimicrobianos (Walsh, 2005)

Embora os genes das MβL possam ser codificadas por genes cromossomais ou por genes plasmidiais, a vasta maioria destes genes estão ancorados em integrons da classe 1 ou em elementos *ISCR* (Walsh, 2008).

4.4.1 Integrons

A maior parte dos genes que codificam as MβLs, principalmente das subclasses IMP, VIM, GIM e SIM são encontrados em integrons da classe 1, embora genes da subclasse IMP possam também ser encontrados em integrons da classe 3. Estes elementos são frequentemente relatados em isolados clínicos MRD onde estão localizados no cromossomos, em plasmídeos ou associados a transposons (Shibata et al., 2003; Walsh et al, 2005, Walsh, 2008).

Integrons são elementos genéticos capazes de capturar, expressar e mobilizar genes de resistência aos antimicrobianos denominados genes cassetes ou cassetes gênicos. São elementos que desempenham um papel importante na disseminação da resistência bacteriana porque podem acumular determinantes de resistência a diversas classes de antimicrobianos, formando complexas estruturas semelhantes a operons que podem ser expressos e disseminados por transferência horizontal de genes (Carattoli, 2001; Hall, Collis, 1995).

A estrutura básica de um integron compreende um gene *intI* que codifica uma proteína com atividade de recombinase sítio-específica, pertencente a família das integrases e um sítio de reconhecimento e ligação, denominado *attI* (*attachment site*), onde se integra o cassette gênico de resistência. Entre o *int* e o *attI* encontram-se os promotores P_{int} , P_1 e P_2 que promovem a expressão de qualquer gene que esteja integrado adequadamente. P_{int} promove a expressão do gene da integrase *intI* e P_1 e P_2 , a expressão dos genes cassetes

integrados, uma vez que os mesmos não possuem promotor próprio (Caratolli, 2001, Gonzalez et al., 2004).

Os genes cassetes constituem-se de DNA circular, com aproximadamente 1kb que compreendem um único gene capaz de codificar resistência à antimicrobianos como aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, trimetoprim, etc. Em seguida a este gene, na extremidade 3' do mesmo, encontra-se um sítio de recombinação integrase específico, denominado elemento de 59 bases (59-be), ou sítio *attC*. Cada 59-be possui terminações repetidas e invertidas (IR) de aproximadamente 20 pb. A integrase interage com os sítios primários de recombinação, o sítio *attI* dos integrons e o sítio *attC* do cassette gênico promovendo a inserção ou a excisão dos cassetes em um integron receptor. Vários genes cassetes podem ser inseridos em sequência, numa mesma orientação em um mesmo integron (Partridge et al., 2009). Desta forma considera-se que os genes de resistência encontrados nos genes cassetes podem ser altamente móveis, embora eles não codifiquem produtos envolvidos na sua própria mobilidade (Hall, Collis, 1995).

Várias classes de integrons associados a resistência aos antimicrobianos têm sido descritas de acordo com a sequência de nucleotídeos do gene *intI*. No entanto, a maioria dos genes de resistência dos BGNs e os que codificam as M β Ls estão ancorados em integrons da classe 1 (Partridge et al., 2009).

Os integrons da classe 1 são caracterizados pela presença de duas regiões conservadas, a região conservada 5' (5'-CS) e a região conservada 3' (3'-CS). A 5'-CS contém o gene *intI*, o sítio *attI* e os promotores, enquanto a 3'-CS é composta pelo gene *qacE Δ 1* que codifica resistência aos compostos quaternários de amônio (usados como desinfetantes), truncado ao gene *sulI*, que confere resistência às sulfonamidas. Em adição, a 3'-CS carrega a *open reading frame 5* (ORF5) que codifica uma proteína de função não conhecida (Caratolli, 2001). A Figura 3 esquematiza a estrutura básica de um integron da classe 1 e de um gene cassette circular e esboça o modelo de integração dos dois elementos genéticos.

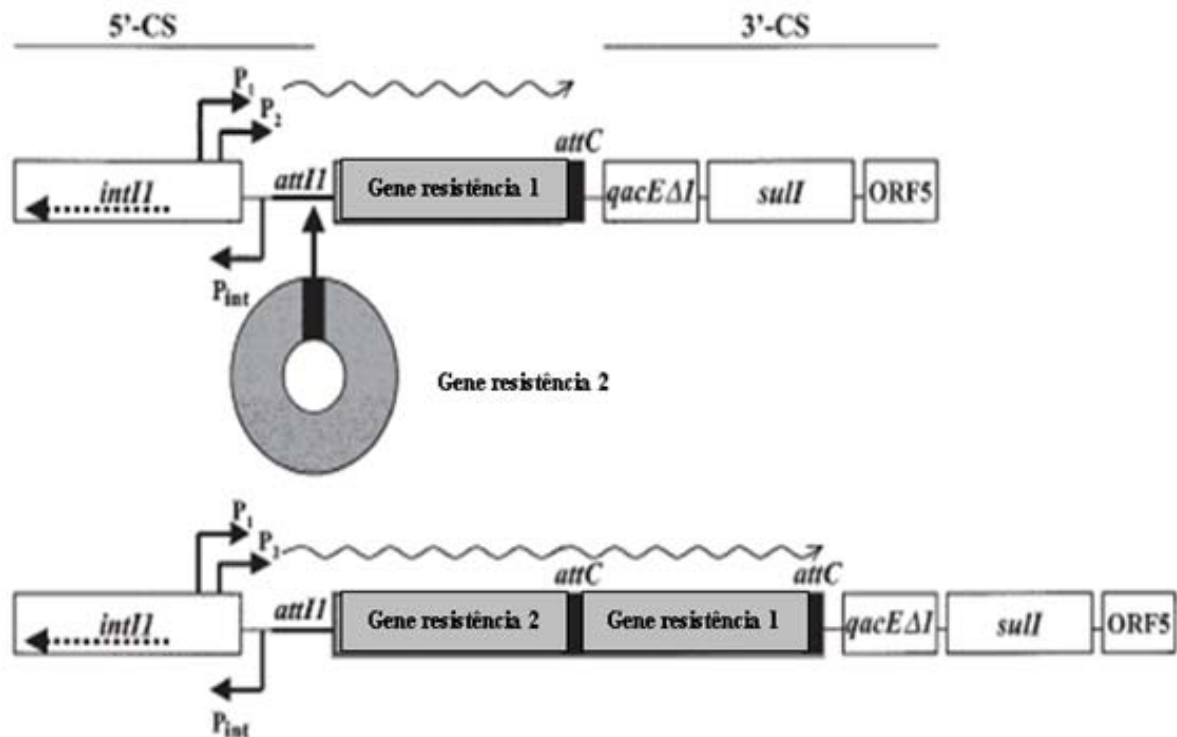


Figura 3 – Representação esquemática de um integron da classe 1 e de um modelo de aquisição de cassette gênico. O processo pelo qual um gene cassette circular livre (gene de resistência 2) é inserido no sítio *attI* em um integron da classe 1 contendo um gene cassette residente (Gene de resistência 1) é representado na figura. Os genes e as *open reading frames* das sequências conservadas 5'-CS e 3'-CS são representados pelos retângulos. Os genes cassetes de resistência inseridos no integron são indicados pelos retângulos cinzas e as barras verticais pretas representam os sítios de recombinação *attC*. P_1 e P_2 são os promotores associados ao integron. P_{int} é o promotor do gene da integrase (*intI1*). À direita, a 3'-CS, contendo a estrutura truncada *qacEΔI/sull* e *ORF5*.

Fonte: Adaptado de Carattoli (2001).

Entre as sequências conservadas 5'CS e 3'CS, os cassetes gênicos de resistência aos antimicrobianos são inseridos, sendo esta região denominada região variável dos integrons. A capacidade que os integrons possuem em adquirir novos genes cassetes ou de excisar genes cassetes já integrados tornam estes elementos importantes na evolução do genoma dos plasmídeos e transposons que os contêm (Hall, Collis, 1995; Partridge et al, 2009).

Uma característica importante dos integrons é a capacidade de integrar genes de resistência de diferentes classes de antimicrobianos em sua região variável. O sinergismo entre estes diferentes genes permitem que a bactéria que os contêm possa ser selecionada por cada classe individual de agente antimicrobiano (Carattoli, 2001; Walsh, 2006). A maioria dos integrons que contêm os genes das MβLs possuem, adicionalmente, em

sua região variável, outros genes cassetes que codificam resistência a antimicrobianos, principalmente os genes de resistência aos aminoglicosídeos. O gene mais frequentemente encontrado é o *aacA4* que codifica resistência a kanamicina, neomicina, amicacina e estreptomicina. Desta forma, estes antimicrobianos podem selecionar isolados clínicos que possuam integrons contendo o gene *aacA4*, comprometendo os regimes antimicrobianos (Walsh, 2006).

Os integrons são incapazes de moverem-se sozinhos, no entanto, os genes cassetes que os contém podem ser mobilizados para outros integrons ou para sítios secundários no genoma bacteriano. Eles podem ser disseminados de um microrganismo para o outro com a ajuda de plasmídeos conjugativos e/ou através de complexos plasmídeos conjugativos/transposons (Bennet, 1999).

A maioria dos genes que codificam MβLs são encontrados em plasmídeos com tamanhos que variam de 120 a 180 Kb. Contudo, plasmídeos com tamanhos inferiores já foram descritos como é o caso do plasmídeo conjugativo de 24 Kb que possui o gene *bla_{VIM-7}*, detectado nos Estados Unidos. A transferência *in vivo* de plasmídeos de alto peso molecular carregadores de genes de MβLs provavelmente envolve a plasticidade genética da bacteria receptora, tanto quanto o tamanho do plasmídeo e a natureza dos outros genes carregados por ele (Walsh et al., 2005).

A associação de genes codificadores de MβLs com a presença de transposons foi primeiramente descrita em 2003 para o gene *bla_{IMP13}* detectado em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado na Itália. Foi relatado que este gene fazia parte de um integron da classe 1 que, por sua vez, estava associado a estruturas que caracterizavam um transposon do tipo *Tn5051* (Toleman et al., 2003). Paralelamente, os autores detectaram um isolado de *P. aeruginosa* na Polônia que possuía o gene *bla_{VIM-2}* inserido em um integron da classe 1 e associado à idênticas estruturas que caracterizavam o transposon *Tn5051*. Os isolados de *P. aeruginosa* da Itália e da Polônia apresentaram perfis genéticos diferentes e não mostraram qualquer evidência da presença de plasmídeos. Desta maneira, foi sugerido que este transposon estava envolvido na disseminação do integron da classe 1, que por sua vez, foi capaz de capturar diferentes genes de MβLs em isolados clínicos de *P. aeruginosa* distintos (Toleman et al., 2003).

Um novo elemento carreador de genes de MβL foi descrito recentemente em um isolado de *P. aeruginosa* portadora do gene *bla_{VIM-2}*. Neste elemento genético, a estrutura truncada *qacEΔ1/sul1* do integron da classe 1 foi substituída por um transposon funcional conhecido como *Tn5090*. A detecção do mesmo foi feita por PCR do gene que codifica a

enzima resolvase deste transposon ou gene *tniC*. Os pesquisadores que descreveram este elemento propuseram que originalmente e anteriormente ao uso das sulfas e dos detergentes quaternários de amônio, o Tn5090 estaria acoplado à região 5'-CS de um integron da classe 1, e que a partir do uso destes agentes o *tniC* foi substituído pela região *qacEΔ1/sul1* (Toleman et al, 2007). Esta versão ancestral de integrons da classe 1 carreando o gene *bla_{VIM-2}* está largamente disseminada em algumas áreas geográficas e parece ser tão comum quanto os típicos integrons da classe 1, exercendo assim, um papel importante na disseminação de genes cassetes de resistência (Walsh, 2008).

4.4.2 Elementos *ISCR*

Enquanto a maioria de genes de MβL parecem estar associados a integrons e/ou transposons, alguns genes são mobilizados por *ISCR*, veículos genéticos recentemente descritos que estão associados com regiões de “mega resistência aos antimicrobianos” (Walsh, 2006)

Os *ISCR* ou simplificadalemente elementos *CR*, constituem um grupo não usual de *ISs* que apresentam similaridade estrutural e funcional com as *IS91*, no entanto, são distintos destas porque perderam as suas terminações repetidas invertidas e se mobilizam através de um evento de transposição denominado recombinação por círculo rolante (“*rolling circle*”-RC). Neste tipo de mobilização estão envolvidas duas estruturas, a *ori-IS* que funciona como origem de replicação e a *ter-IS* que representa o sítio de terminação. Estas regiões codificam transposases responsáveis pelas etapas de iniciação e término da replicação, anteriormente à etapa de recombinação envolvida no processo de transposição. Os elementos *ISCR* podem mobilizar estruturas adjacentes a ele quando durante a replicação, a transposase erra ao identificar a região que determina o término da replicação, prosseguindo a replicação do DNA adjacente. Desta forma, grandes fragmentos de DNA adjacentes podem ser co-transpostas com o elemento *ISCR* (Toleman, Bennet, Walsh, 2006).

Nos últimos anos, os *ISCR* estão sendo frequentemente detectados em localizações adjacentes a genes de resistência aos antimicrobianos, particularmente a genes que codificam β-lactamases em BGNs. Até o presente, 19 membros desta família de elementos genéticos foram descritos

(<<http://www.cardiff.ac.uk/medic/aboutus/departments/medicalmicrobiology/genetics/iscr/isc-relements.html>>) (último acesso 20/11/2009) (Toleman, Walsh, 2008).

Os elementos *ISCR* podem ser divididos em 2 grupos: Os elementos *ISCR*-1 que formam complexos com integrons da classe 1 (sendo também capazes de mobilizar estas estruturas) e os *ISCR*2 a *ISCR*-19 associados a outras classes de integrons. Alguns elementos *ISCR* foram encontrados adjacentes a genes de MβL tendo sido associados à mobilização dos mesmos. (Toleman, Bennet, Walsh, 2006).

O gene *bla*_{SPM-1} que codifica a MβL SPM-1, está localizado junto de uma variante de *ISCR* denominada *ISCR*-4 (Toleman, Bennet, Walsh, 2006). A *ISCR*-4 foi primeiramente detectada por amplificação do gene que codifica a sua transposase denominado de *orf495*. Em isolados clínicos de *P. aeruginosa* detectados no Brasil, foram encontrados 2 elementos *ISCR*4 flanqueando o gene *bla*_{SPM-1} (Poirel et al, 2004). A Figura 4 mostra a representação esquemática do elemento *ISCR*4 encontrado nestes isolados de *P. aeruginosa*. A sequência localizada *upstream* ao *ISCR*-4 codifica uma sequência de aminoácidos com 89% e 87% de identidade com as proteínas GroEL de *Desulfitobacterium hafniense* e *S. maltophilia*, respectivamente (Poirel et al, 2004). A sequência *downstream* ao gene *bla*_{SPM-1} codifica uma proteína com 73% de identidade à protein GroEL de *Xanthomonas campestris* (Toleman et al., 2002).

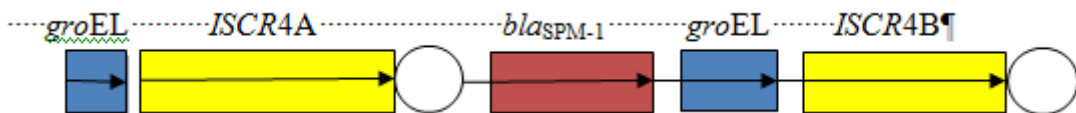


Figura 4 – Representação esquemática do *locus* genético do elemento *ISCR*4 encontrado em isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtoras da MβL SPM-1 e recuperadas no Brasil (números de acesso ao Genbank: AY3412249 e AJ492820). *Open reading frames* são representadas pelos retângulos coloridos e os círculos representam as origens de replicação dos elementos *ISCR*-4. Os elementos *ISCR*4A e *ISCR*4B apresentam as mesmas sequências de nucleotídeos.

Fonte: Toleman; Walsh (2008)

Um outro elemento classificado como *ISCR*-10 foi encontrado adjacente ao gene *bla*_{AIM-1} que codifica a MβL AIM-1 e parece estar envolvido na mobilização deste gene de forma semelhante ao *ISCR*4 ao gene *bla*_{SPM-1} (Yong et al., 2007).

A presença de elementos *ISCR* no genoma de patógenos bacterianos tem sido pesquisada extensivamente nos últimos anos e vários estudos detectaram estes elementos

em isolados clínicos de *P. aeruginosa* que possuem genes codificadores de MβLs. No entanto, a participação destes elementos na mobilização dos genes das MβLs necessita ainda ser caracterizada. O elemento *ISCR2* foi detectado em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado no Brasil que também possuía o gene *bla_{IMP-1}*, enquanto o *ISCR3* foi descoberto em duas cepas de *P. aeruginosa* que também continham o gene *bla_{VIM-1}*. O elemento *ISCR11* foi encontrado em um isolado clínico de *P. aeruginosa* da Grécia que continha o gene *bla_{VIM-1}*. Finalmente, um isolado clínico de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 recuperado no Brasil, apresentou no seu genoma 2 elementos *ISCRs*, *ISCR4* e *ISCR12* (Toleman, Bennet, Walsh, 2006).

4.5 SUB-CLASSES DE MBL TRANSFERÍVEIS PRODUZIDAS POR *P. AERUGINOSA*

4.5.1 MβL da Sub-classe IMP

O primeiro relato de uma MβL transferível ocorreu em 1991, a partir de uma cepa de *P. aeruginosa* isolada no Japão (Watanabe et al, 1991). O gene responsável pela resistência ao imipenem foi encontrado num plasmídeo conjugativo transferível capaz de mover-se facilmente para outras cepas de *P. aeruginosa*. Esta enzima foi caracterizada bioquimicamente, entretanto, não foi sequenciada ou nomeada. Três anos após, Osano et al (1994) encontraram o mesmo gene codificando uma MβL e a denominaram IMP-1 (imipenemase). Esta enzima foi detectada em um isolado de *Serratia marcescens* recuperado da urina de um paciente do Hospital de Aichi, Okazaki, Japão. O gene *bla_{IMP-1}* foi encontrado em um integron da classe 3, que por sua vez estava localizado em um plasmídeo de alto peso molecular (120kb) (Arakawa et al, 1995)

Uma característica importante, verificada pelos pesquisadores dos dois primeiros trabalhos descritos acima, foi que a presença dos gene *bla_{IMP-1}* nem sempre estava associada com níveis elevados de resistência ao imipenem. Alguns isolados de *S. marcescens* e *P. aeruginosa* apresentaram CIMs ao imipenem inferiores aos *breakpoints* de resistência estabelecidos para este antimicrobiano. Os autores denominaram estes genes de genes “crípticos”, sugeriram que a atividade das sequências promotoras destes genes estruturais (crípticos) poderia estar suprimida por mecanismos regulatórios ainda não identificados e

discutiram que a análise das sequências promotoras deveria constituir objeto de investigação (Ito et al., 1995, Senda et al., 1996).

Inicialmente, as MβLs do tipo IMP foram detectadas quase que exclusivamente no Japão e poucas outras localizações do sudeste asiático. Em um estudo conduzido no Japão durante 2001 e 2002, MβLs foram detectadas em 73,4% (431/587) de BGN MR, dos quais 357 possuíam o gene *bla*_{IMP-1} (Shibata et al, 2003). A identificação de enzimas do tipo IMP, fora do Japão ou do continente asiático, ocorreu com a detecção de IMP-2 e IMP-5 em isolados de *A. baumannii* da Itália (1997) e em Portugal (1998), respectivamente, mudando assim o panorama de detecção desta sub-classe de enzimas (Riccio et al., 2000; Silva et al., 2002)

Atualmente, 26 variantes de MβLs do tipo IMP foram detectadas em isolados de *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e espécies da família Enterobacteriaceae, em países dos vários continentes (<www.lahey.org/studies>, último acesso em 18/11/2009)

4.5.2 MβLs da Sub-classe VIM

Em 1999 foi descrita a segunda subclasse de MβL adquirida denominada VIM-1, que exibiu menos que 31,4% de similaridade na sequência de aminoácidos com a enzima IMP-1. Esta enzima foi detectada em 1997, em uma cepa de *P. aeruginosa* recuperada de ferida cirúrgica de uma paciente hospitalizada na UTI do Hospital Universitário de Verona, na Itália. O gene *bla*_{VIM-1} estava localizado num integron da classe 1, por isso recebeu a denominação de VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*). A expressão do gene *bla*_{VIM-1} estava relacionado com uma reduzida sensibilidade às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas retinha a sensibilidade ao aztreonam (Lauretti et al, 1999).

Após o primeiro isolamento, várias outras detecções foram relatadas em patógenos do sul da Europa (França em 1995, Itália em 1997 e Grécia em 1998), seguido de outros relatos de detecção em países europeus como Polônia, Portugal, Espanha, Suécia, Hungria, Croácia e Alemanha. A princípio, as enzimas da subclasse VIM foram consideradas MβL européias devido a prevalência das mesmas nos países deste continente (Walsh et al, 2005). No entanto, atualmente, estas enzimas estabeleceram endemicidade não somente na

Europa mas também na Coréia e foram reportadas na América do Norte e América Latina, Austrália, Índia, Iran e, recentemente, no continente africano (Maltezou, 2008, Pitout et al, 2008).

Um total de 23 variantes de MβLs do tipo VIM foram relatadas (<www.lahey.org/studies>, último acesso em 18/11/2009) em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e Enterobacteriaceae. Destas, a variante VIM-2 é considerada a MβL mais detectada no mundo todo, tendo sido encontrada em 38 países de 5 continentes (Walsh, 2008; Pitou et al., 2008)

Recentemente, o gene *bla*_{VIM-2} foi detectado em duas cepas de *P. aeruginosa* isoladas de um rio e de água de um esgoto próximos a um hospital de Portugal. Por meio de métodos moleculares verificou-se que ambas as cepas tiveram origem hospitalar (Quinteira, Peixe, 2006). O significado epidemiológico deste achado ainda é desconhecido, mas os autores sugeriram que o sistema de esgoto e aquático pode exercer um papel na manutenção e transferência do genes das MβLs (Maltezou, 2008).

4.5.3 MβLs da Sub-classe SPM

A terceira subclasse de MβL adquirida denominada SPM-1 (São Paulo MβL) foi detectada em uma cepa de *P. aeruginosa* obtida a partir da cultura de urina de uma paciente com leucemia linfoblástica aguda, hospitalizada em 1997 no Complexo Hospitalar São Paulo da cidade de São Paulo. Um isolado clínico de *P. aeruginosa* foi obtido do sangue da paciente a partir de 5 dias do isolamento de *P. aeruginosa* da urina. A paciente apresentou neutropenia febril e foi a óbito devido a um quadro de choque séptico (Toleman et al., 2002). O isolado clínico produtor de SPM-1 apresentou-se resistente a todos os β-lactâmicos (com exceção do aztreonam), aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sendo apenas sensível a colistina. A cepa obtida de hemocultura denominada 48-1997A é representativa de SPM-1 e é utilizada em vários estudos para comparação do perfil genotípico de isolados de diferentes locais (Walsh et al., 2005).

A MβL SPM-1 apresentou moderada identidade em sua sequência de aminoácidos com a IMP-1 (35.5%), no entanto difere significativamente das enzimas da subclasse VIM. A enzima SPM-1 apresenta uma inserção de 24 aminoácidos logo após o sítio ativo, que mostrou ser muito flexível atuando como uma alça que, provavelmente, aumenta a ligação e hidrólise dos β-lactâmicos de diferentes classes (Walsh et al., 2005).

Uma característica importante das enzimas da subclasse SPM-1 é que elas não estão associadas a integrons e transposons como a maioria das MβLs IMP ou VIM. O gene *bla*_{SPM-1} não é um gene cassete que faz parte de um integron, nem sequer encontra-se nas proximidades de um integron da classe 1. Até o momento, este gene foi encontrado adjacente aos elemento *ISCR4* e pode estar também relacionado ao elemento *ISCR12* como descrito anteriormente. A localização do gene *bla*_{SPM-1} foi, a princípio descrita por Poirel e colaboradores (2004) como adjacente a um elemento *ISCR* que, por sua vez, fazia parte de uma ilha de patogenicidade genômica móvel encontrada em um plasmídeo de alto peso molecular (aproximadamente 180 Kb), altamente relacionada com *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*. No entanto, um trabalho de revisão recente afirma que as SPM-1 descritas até o momento são, sem exceção, codificadas por genes cromossomais (Walsh, 2008).

O gene *bla*_{SPM-1} foi detectado apenas em *P. aeruginosa* até o momento e a enzima SPM-1 está amplamente disseminada no Brasil, com um clone endêmico identificado em diferentes cidades denominado clone São Paulo (clone SP) (Gales et al., 2003). Esta enzima foi detectada exclusivamente no território brasileiro até 2008, quando houve o relato de SPM-1 em um isolado de *P. aeruginosa* recuperada na Suíça (El Salabi et al., 2009)

4.5.4 MβL da Sub-classe GIM

Uma nova subclasse de MβL detectada em 2002 foi denominada GIM-1 (*German imipenemase*). Esta enzima foi detectada em cinco isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos que foram recuperados de diferentes pacientes internados na mesma ala de um hospital em Dusseldorf, Alemanha (Castanheira et al., 2004). Os isolados produtores de GIM-1 foram sensíveis apenas às polimixinas e apresentaram o mesmo genótipo quando submetidos a análise de eletroforese em campo de pulsos alternados (Castanheira et al., 2004).

O gene *bla*_{GIM-1} foi encontrado como gene cassete localizado na primeira posição de um integron da classe 1 (In77) que, por sua vez, é carregado por um plasmídeo pequeno (~45kb), não conjugativo. Este integron apresentou, adicionalmente, três outros genes de resistência, dois genes de resistência aos aminoglicosídeos (*aacA4* e *aadA1*) e um gene que codificava uma β-lactamase *bla*_{OXA-2} (Castanheira et al., 2004).

4.5.5 MβL da Sub-classe AIM

AIM-1 (*Australian imipenemase*) constitui uma nova subclasse de MβL detectada em 2002 num isolado de *P. aeruginosa*. O isolado clínico foi recuperado de um paciente aborígine do sexo masculino que apresentava imunossupressão e encontrava-se hospitalizado no *Royal Adelaide Hospital*, Austrália. *P. aeruginosa* produtora de AIM-1 foi resistente a todos os agentes anti-pseudomonas com exceção de amicacina, aztreonam e colistina. O gene estrutural da MβL, *bla*_{AIM-1} contém 915 pb e codifica uma proteína com 305 aminoácidos. A sequência de aminoácidos da proteína AIM-1 apresentou pouca identidade com outras MβLs clinicamente importantes como IMP, VIM, SPM-1 ou GIM e foi classificada como uma MβL B3. Adjacente ao gene *bla*_{AIM-1} foi encontrado um elemento genético *ISCR*-10, indicando que, semelhante a SPM-1 os elementos *ISCR* podem estar implicados na mobilidade deste gene (Yong et al., 2007).

4.6 EPIDEMIOLOGIA DAS MβLS DE *P. AERUGINOSA* NO BRASIL

O primeiro relato de *P. aeruginosa* produtora de MβL no Brasil foi publicado em 2002 por Pellegrino e colaboradores. O estudo desenvolvido por este grupo analisou isolados de *P. aeruginosa* MR obtidos de 4 hospitais do Rio de Janeiro, recuperados entre 1999 e 2000. A presença de MβL foi verificada por métodos fenotípicos, mas nenhuma detecção de genes codificadores destas enzimas foi realizada (Pellegrino et al., 2002).

Paralelamente, neste mesmo ano, Toleman e colaboradores (2002), caracterizaram uma subclasse de MβL denominada SPM-1. Conforme descrito anteriormente, esta enzima foi detectada em um isolado de *P. aeruginosa* recuperada no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP em 1997.

Em 2003, Gales e colaboradores realizaram um estudo multicêntrico onde foi avaliada a produção de MβLs em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem recuperados em hospitais de diferentes regiões do Brasil (Bahia, Ceará, Distrito Federal, São Paulo e Paraná). O HU de Londrina participou deste estudo enviando ao laboratório ALERTA/UNIFESP, isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, recuperados no laboratório de Microbiologia Clínica do HU no ano de 2002. Entre as 16

cepas de *P. aeruginosa* avaliadas no estudo, 15 foram produtoras de SPM-1, sendo que entre estas, a cepa Pa2528, isolada em Londrina, apresentou-se positiva para esta enzima. Todos os isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 pertenceram a um único clone que foi denominado SP (clone São Paulo), mostrando assim que o mesmo estava disseminado em várias regiões do Brasil e estava associado a um fenótipo MR de resistência aos carbapenêmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Gales et al., 2003).

Um relato de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 em isolados clonais de diversos hospitais de Recife foi realizado em 2004. Neste estudo, a localização do gene *bla*_{SPM-1} foi investigada e os autores caracterizaram pela primeira vez o elemento *ISCR4* adjacente ao gene de SPM-1, sugerindo que este elemento é responsável pela mobilização do respectivo gene (Poirel et al., 2004).

Em 2004, Mendes e colaboradores reportaram uma nova variante de M β L, a IMP-16, detectada em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado em 2002, no hospital de Base de Brasília. Esta nova variante de IMP apresentou alta identidade na sua sequência de aminoácidos com a variante IMP-11 (90,3%). O gene *bla*_{IMP-16} foi localizado em um integron da classe 1 que possui, adicionalmente, 2 genes cassetes fundidos [*aac*(6')-30/*aac*(6')Ib] os quais codificam duas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. O isolado de *P. aeruginosa* produtor de IMP-16 apresentou altos níveis de resistência aos β -lactâmicos (incluindo os carbapenêmicos) e aos aminoglicosídeos (Mendes et al., 2004).

Em 2005, Sader e colaboradores relataram a presença de diversas subclasses de M β L em isolados clínicos de *P. aeruginosa* isoladas de hemoculturas no Hospital São Paulo entre os anos de 2000 e 2001. Os autores verificaram que, aproximadamente um a cada 5 isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos produziam algum tipo de M β L transferível. A subclasse mais frequente foi a SPM-1 (55,6%), seguida por VIM-2 (30,6%) e IMP-1(8,3%). Os isolados apresentaram diversidade clonal sendo que 7 ribogrupos foram detectados entre o isolados produtores de SPM-1 (Sader et al., 2005).

O primeiro surto de infecção nosocomial causado por *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foi relatado por Zavascki e colaboradores, em 2005, num hospital de Porto Alegre. Neste estudo, os autores verificaram uma prevalência muito alta de SPM-1 entre os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos ($\geq 77,1\%$). A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 mostraram resistência a todos os agentes anti-pseudomonas sendo sensíveis apenas à colistina (Zavascki et al., 2005).

Em 2006, Marra e colaboradores detectaram a presença de três subclasses de M β Ls (SPM-1, IMP-1 e IMP-16) entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de

hemoculturas no período de 2002 a 2003 de pacientes hospitalizados em um hospital de São Paulo. Esta foi a segunda detecção de IMP-16 no território brasileiro e a primeira detecção desta enzima no sudeste do Brasil. O isolado produtor de IMP-16 foi resistente a todos os agentes anti-pseudomonas inclusive aos carbapenêmicos sendo sensível apenas à colistina. Os autores observaram que pacientes com infecções na corrente sanguínea por *P. aeruginosa* produtoras de MβLs apresentaram altas taxas de morbidade e mortalidade (Marra et al., 2006).

Neste mesmo ano foi relatada a presença de IMP-18 em isolados de *P. aeruginosa* MR recuperadas em Salvador no ano de 2001. O gene *bla*_{IMP-18} estava localizado num integron da classe 1 (Xavier et al., 2006).

Em 2006 dois grupos de pesquisa independentes relataram a presença de SPM-1 em isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados em dois hospitais universitários distintos do Rio de Janeiro entre os anos de 1999 e 2002 (Pellegrino et al., 2006; Carvalho et al., 2006). A frequência de ocorrência de SPM-1 obtida para os dois hospitais foi de aproximadamente 20%, e o clone SP foi detectado em todos os isolados produtores de SPM-1 em um destes hospitais (Carvalho et al., 2006).

A partir do primeiro relato da detecção de SPM-1 (Toleman et al, 2002) e da constatação que isolados de *P. aeruginosa* produtores desta enzima estavam disseminados pelo país (Gales et al., 2003) vários relatos desta enzima foram obtidos em diferentes estados e cidades do Brasil. Isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 foram detectados em centros como São Paulo, Brasília, Salvador, Fortaleza, São Luis do Maranhão, Santo André, Londrina, Curitiba, Blumenau, Porto Alegre (Mendes et al., 2006).

Em 2007, Martins e colaboradores relataram a disseminação de isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1-like e IMP-1-like em dois hospitais de Porto Alegre. Entre os 92 isolados clínicos de *P. aeruginosa* estudados, 18 foram produtores de SPM-1-like e 5 de IMP-1-like. Dois clones diferentes foram obtidos para cada subclasse de enzima. Três dos cinco isolados produtores de IMP-1-like foram sensíveis aos imipenem (CIMs= 4μg/mL) (Martins et al., 2007).

Um achado de grande importância na epidemiologia das MβLs do Brasil foi o relato de um isolado clínico de *P. aeruginosa* sensível aos carbapenêmicos que carregava o gene *bla*_{SPM-1} mas não era produtor da enzima SPM-1. Em geral, os isolados clínicos produtores de SPM-1 apresentam complexos fenótipos MR e altas CIMs aos carbapenêmicos. O isolado relatado foi resistente aos aminoglicosídeos, β-lactâmicos e fluoroquinolonas, mas apresentou CIM=1μg/mL para o imipenem. Este isolado foi recuperado da urina de um

paciente de 46 anos, que recebeu vários cursos de antibioticoterapia após ter sido admitido no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho do Rio de Janeiro (Pellegrino et al., 2008).

Nos últimos anos, estudos relataram a presença de MβLs em BGN isolados de sistemas aquáticos e esgotos hospitalares. No Brasil, um estudo realizado por Fuentesfria e colaboradores (2009), pesquisou a presença dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{SPM}* em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de amostras de esgoto hospitalar de cinco hospitais de Porto Alegre e Passo Fundo - Rio Grande do Sul e de águas superficiais de corpos de água que recebem o esgoto de 2 destes hospitais. Dos 614 isolados clínicos de *P. aeruginosa* isolados, 5% apresentaram o gene *bla_{SPM-1}* e produziram a respectiva MβL. Este achado atenta para o risco da disseminação ambiental deste determinante de resistência bacteriana.

SPM-1 é a subclasse de MβL mais prevalente no Brasil e, até o momento, só foi detectada entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Até 2007 esta enzima estava restrita ao território brasileiro, quando foi detectada em um isolado clínico de *P. aeruginosa* na Suíça. O isolado BH121 foi recuperado de um paciente de 34 anos de idade que apresentou uma infecção de ferida e foi hospitalizado no University Hospital Basel, Suíça. Um fato importante é que este paciente recebeu atendimento primário no Hospital Regional Geral de Recife antes de ser transportado para a Suíça. O perfil genético apresentado por este isolado foi similar ao de isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 recuperados em hospitais brasileiros no período de 1997 a 2007. O gene *bla_{SPM-1}* estava localizado no cromossomo desta cepa de *P. aeruginosa* que, curiosamente apresentou 2 cópias deste gene. Adjacente aos genes *bla_{SPM-1}* foram encontradas 2 cópias do elemento *ISCR4* flanqueando estes genes, exatamente como a descrição feita por Poirel et al (2004) para a primeira cepa de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 isolada em 1997. Este achado indicou dois fatos importantes: primeiro, que o elemento *ISCR4* foi perfeitamente conservado entre cepas de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 durante 10 anos (1997-2007) e segundo, que o elemento *ISCR4* estava provavelmente ativo dada a presença de uma segunda cópia do gene *bla_{SPM-1}* no cromossomo do isolado suíço de *P. aeruginosa* (El Salabi et al., 2009).

4.7 DETECÇÃO LABORATORIAL DA PRODUÇÃO DE MβLS E DE GENES CODIFICADORES DESTAS ENZIMAS

A realização na rotina clínica de testes para a detecção de MβLS ainda não foi recomendada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2009). Nem mesmo outros comitês internacionais, como os europeus, sugeriram um teste para a detecção de isolados clínicos produtores de MβL. No entanto, taxas crescentes de ocorrência de isolados clínicos produtores destas enzimas são verificadas por todo o mundo assim como no território brasileiro, onde valores tão altos quanto 70% ou maiores já foram obtidos em situações de surtos de infecção nosocomiais (Zavascki et al., 2005). Além disso, existem evidências clínicas de que a implementação de medidas para controlar a disseminação de isolados produtores de MβLS podem não obter sucesso em locais (ambientes hospitalares) onde as taxas de ocorrência destes isolados excedem a 25% (Maltezou, 2008; Walsh, 2008). Desta forma, torna-se fundamental a realização de testes de detecção para este fenótipo de resistência em laboratórios de microbiologia clínica.

Embora a detecção de genes codificadores de MβLS através de técnicas moleculares e a avaliação espectrofotométrica da hidrólise de carbapenênicos sejam, respectivamente, os testes padrão-ouro para detecção genotípica e fenotípica da produção destas enzimas, estas técnicas são laboriosas, requerem técnicos altamente treinados e equipamentos especiais, nem sempre disponíveis nos laboratórios de rotina.

Vários testes fenotípicos podem ser utilizados para detectar estas enzimas e todos eles se baseiam na propriedade universal das mesmas de serem inibidas ou inativadas por quelantes de íons divalentes ou de Zn^{+2} , como o EDTA. Adicionalmente, as MβLS são também sensíveis à inibição por agentes que alteram a conformação do sítio ativo, como os derivados do tiol e ácido dipicolínico (Boerzel et al., 2003; Payne et al., 1997).

O teste descrito por Arakawa e colaboradores (2000) é amplamente utilizado para a detecção fenotípica de MβLS, denominado como teste de disco aproximação (ANEXO B - Figura 1). Para a realização do mesmo, um disco contendo um substrato β-lactâmico e um disco contendo um inibidor de MβL são dispostos em uma placa de agar Müller-Hinton previamente inoculada com a bactéria teste. A deformação do halo do antimicrobiano em direção ao disco contendo o inibidor, ou o aparecimento de uma zona fantasma entre os dois discos é o critério positivo para detectar a produção de MβL. Os autores utilizaram ceftazidima como substrato e EDTA e derivados do tiol, ácido mercaptopropiônico (MPA),

ácido mercapto acético (MAC) e mercaptoetanol (MET), como inibidores. A ceftazidima foi utilizada com o intuito de aumentar a sensibilidade do teste, devido ao fato de que alguns isolados produtores de M β L apresentam baixo grau de resistência aos carbapenêmicos.

O teste de disco combinado proposto por Yong e colaboradores (2002) consiste na comparação do tamanho dos halos formados por discos de imipenem e discos de imipenem associados com um inibidor de M β L (disco combinado). O aumento igual ou superior a 7 mm na zona de inibição produzida pelo disco combinado é o critério positivo adotado para a produção de M β L. De acordo com o resultado deste estudo, discos de imipenem combinados com 750 μ g de EDTA foram altamente sensíveis para a detecção de M β L em diferentes isolados.

O Etest® para detecção de M β L tem sido amplamente utilizado por pesquisadores do mundo todo principalmente para detecção de M β L em isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*. Este teste baseia-se em uma fita impregnada com concentrações crecentes de imipenem de um lado (4-256 μ g/mL) e, do lado oposto, com imipenem (1-64 μ g/mL) associado ao EDTA (320 μ g/mL). São considerados produtores de M β L os isolados que apresentarem uma redução da CIM de imipenem \geq a três diluições (Walsh et al., 2002)(ANEXO B- Figura 2).

As técnicas de dupla difusão em ágar e de discos combinados, como as descritas anteriormente, são as mais utilizadas para detectar a produção de M β Ls nos diversos gêneros bacterianos. Entretanto, algumas limitações podem ser encontradas. O nível de inibição apresentado por diferentes inibidores de M β Ls varia entre estas enzimas e também é variável a habilidade das mesmas em conferir resistência à ceftazidima e ao imipenem, os dois substratos mais utilizados nas triagens para detecção de M β L (Walsh et al., 2005).

Resultados falso-negativos foram verificados quando se utilizou a metodologia do Etest® para detecção de M β Ls em isolados clínicos com baixos valores das CIMs para o imipenem (Walsh et al., 2002). Além disso, este teste também apresentou limitações para isolados em que as CIMs para imipenem foram maiores que 256 μ g/mL e ou imipenem+EDTA apresentaram valores de CIM maiores que 64 μ g/mL. Nestes casos o resultado do teste é inconclusivo (Walsh et al., 2002; Martins et al., 2007).

Um estudo recente realizado por Picão e colaboradores (2008) avaliou a acuracidade do teste de Disco – Aproximação (ou disco sinergismo) e do teste de disco combinado utilizando dois substratos (imipenem e ceftazidima) e vários inibidores de M β L, para detectar a produção de M β L entre isolados não relacionados geneticamente de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Acinetobacter* spp e algumas espécies de Enterobacteriaceae. Este

estudo avaliou a produção de enzimas variantes do tipo IMP, VIM, SPM-1 e GIM-1. Neste estudo os autores verificaram que o teste de disco aproximação, utilizando o ácido 2-mercapto-propiónico como inibidor de M β L a 2,0 cm de distância dos discos de ceftazidima e imipenem, constitui um bom método para detecção de isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. produtores de M β Ls, podendo ser recomendado para a triagem da produção destas enzimas em isolados clínicos dos respectivos gêneros bacterianos. Entre as enterobactérias, o teste com maior acurácia para detectar M β L foi o de disco combinado, utilizando imipenem associado a 10 μ L de uma solução de EDTA a uma concentração de 100 mM. Desta forma, os autores verificaram que o método a ser empregado para a detecção de M β L deve levar em conta o gênero bacteriano a ser testado (Picão et al., 2008).

Métodos moleculares têm sido utilizados para pesquisar os genes que codificam as M β L e os integrons da classe 1 que contém estes genes. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a utilização de sondas de DNA são os métodos moleculares mais frequentemente utilizados. Várias sequências de genes que codificam diferentes variantes de M β Ls são depositadas no Genbank e o desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos pode ser realizado para detecção, por PCR, dos genes que codificam estas enzimas (Gupta, 2008). No entanto, estes dois métodos moleculares indicam apenas a subclasse da enzima a ser detectada. Para se conhecer a variante enzimática é necessário que se realize o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos (Walsh et al, 2005). Recentemente, dois estudos descrevendo a metodologia de PCR multiplex e PCR multiplex em tempo real foram padronizadas para detecção de genes que codificam as principais subclasses de M β Ls: IMP, VIM, SPM, GIM e SIM, com o objetivo de tornar o ensaio mais rápido e diminuir os custos dos mesmo (Ellington et al., 2007; Mendes et al., 2007).

4.8 IMPACTO CLÍNICO DE PATÓGENOS PRODUTORES DE M β LS

Infecções causadas por patógenos produtores de M β Ls ocorrem principalmente em pacientes com severas co-morbidades, internados nas UTIs ou com histórico de cirurgia. Neonatos de baixo peso internados nas UTIs neonatais também apresentam alto risco para contrair infecções por estes agentes (Maltezou, 2008).

Um estudo de caso-controle desenvolvido no Japão por Hirakata e colaboradores (2003) comparou 69 pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa*

produtoras de IMP com 247 pacientes com infecções por *P. aeruginosa* não produtoras de MβLs. Os autores verificaram que hospitalização prolongada, quimioterapia, corticosteróides, cateteres urinários, duração da administração de antimicrobianos, dose total de antimicrobianos administrada e dose total de carbapenêmicos utilizada nos pacientes, foram fatores estatisticamente significativos associados com o desenvolvimento de infecções por *P. aeruginosa* produtoras de IMP (Hirakata et al., 2003).

No Brasil, dois estudos avaliaram fatores de risco para aquisição de *P.aeruginosa* produtoras de SPM-1. O primeiro deles realizado em um hospital universitário do Rio de Janeiro verificou que o principal fator de risco para aquisição de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foi o uso de antimicrobianos, sendo que entre estes agentes o uso de quinolonas foi o maior fator de risco associado à colonização e infecção por este patógeno (Nouér et al, 2005). O segundo estudo realizado em 2 hospitais universitários de Porto Alegre verificou que a exposição aos β-lactâmicos foi o principal fator de risco associado com as infecções por estes agentes. Doenças neurológicas, ITUs, insuficiência renal e tempo de permanência em UTIs foram também fatores associados com alto risco para aquisição de infecções por *P.aeruginosa* produtoras de SPM-1 (Zavascki et al., 2006b).

Surtos de infecção por patógenos produtores de MβLs tem sido reportados em vários hospitais e instituições de cuidados da saúde por todo o mundo, principalmente em UTIs, unidades de cuidados para neonatos, em departamentos médicos e cirúrgicos e em unidades de transplantes de medula óssea. Geralmente estes surtos de infecção envolvem várias alas ou departamentos de um hospital e podem se estender por meses ou anos (Maltezou, 2008). Ensaio de tipagem molecular usando a técnica de PFGE mostram que estes surtos podem ser monoclonais ou oligoclonais na sua origem e que as mãos dos profissionais responsáveis pelos cuidados da saúde dos pacientes são os principais veículos de disseminação de MβLs entre pacientes. Os pacientes colonizados ou infectados por estes microrganismos são as principais fontes de infecção (Chikhani et al., 2006). Bactérias produtoras de MβLs de baixa virulência encontradas no ambiente hospitalar (ex. *P. putida* e *P. fluorescens*) podem também constituir reservatórios para a disseminação nosocomial dos genes de MβLs (Koh, Wang, Song, 2004). Equipamentos como estetoscópios e superfícies úmidas contaminadas do ambiente hospitalar (pias, torneiras) também estão implicados na transmissão nosocomial destes patógenos (Crespo et al., 2004; Tsakris et al., 2008).

Infecções causadas por isolados clínicos produtores de MβLs estão associadas à taxas de mortalidade que variam de 25 a 75%. Em um estudo realizado com *P. aeruginosa* causando infecções noscomiais isoladas em dois hospitais brasileiros, os autores

verificaram que os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de MβLs da subclasse SPM-1 apresentam taxas maiores de mortalidade intra hospitalar (51,2% versus 31,2%, respectivamente) e de mortalidade geral (17,3 versus 11,8 por 1000 pacientes dia, respectivamente) quando comparados com os isolados não produtores destas enzimas (Zavascki et al., 2006b). Similarmente, um estudo canadense encontrou um número aumentado das taxas de mortalidade entre os pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa* produtores de MβLs (IMP-7, VIM-2), comparados com pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa* não produtoras destas enzimas (Laupland et al., 2005). Zavascki e colaboradores (2006) sugeriram que uma terapia inicial inapropriada parece estar relacionada às maiores taxas de mortalidade, e que a introdução de uma terapia antimicrobiana adequada até 72 horas após o início da infecção pode ser o único fator capaz de diminuir a mortalidade dos pacientes (Zavascki et al., 2006b).

4.9 TERAPIA DAS INFECÇÕES POR PATÓGENOS PRODUTORES DE MβLS

O tratamento das infecções causadas por patógenos produtores de MβLs constitui um desafio uma vez que estas bactérias são usualmente resistentes aos β-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, permanecendo sensíveis apenas às polimixinas. Uma terapia adequada para tratar estas infecções ainda permanece desconhecida. Como alternativas terapêuticas, têm sido utilizadas combinações de agentes antimicrobianos na tentativa de se obter sinergismo entre fármacos que seriam ineficazes como monoterapia, ou ainda, faz-se o uso de antimicrobianos antigos, como as polimixinas (Walsh, 2005).

Um dos principais motivos para detectar a produção de MβLs em isolados clínicos é a contra-indicação do uso dos carbapenêmicos no tratamento das infecções. Poucos estudos avaliaram os resultados da utilização destes agentes em monoterapia ou em associação com outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, e a utilização destes agentes na terapia das infecções por isolados clínicos produtores de MβLs continua incerta. (Rossolini, 2005).

Embora as MβLs não hidrolisem eficientemente o aztreonam e um grande número de isolados produtores de MβLs apresentem sensibilidade *in vitro* a este antimicrobiano, o uso deste fármaco como monoterapia ou em associação com outros antimicrobianos no tratamento das infecções por patógenos produtores de MβLs é duvidoso.

Estudos utilizando modelos animais obtiveram resultados conflitantes e os dados clínicos são limitados (Belais et al., 2002; Lee et al., 2004; Peleg et al., 2005)

Alguns isolados bacterianos produtores de M β LS apresentam sensibilidade *in vitro* à piperacilina-tazobactam e este antimicrobiano foi largamente utilizado em infecções por *P. aeruginosa* produtoras de M β LS na região de Calgary, Canadá entre 2002 e 2004. Nos 46 pacientes tratados adequadamente com este agente, 29 como monoterapia, a sobrevida foi de 84% (Parkins et al., 2007).

Estudos *in vitro* tem mostrado que tigeciclina e as polimixinas são os agentes que apresentam consistente atividade contra isolados bacterianos produtores de M β LS. Tigeciclina é uma glicilglicina análoga à minociclina que exibe atividade contra BGNs com taxas que podem chegar a 100% em isolados clínicos MR de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e outras espécies da família Enterobacteriaceae; No entanto, este agente não apresenta atividade efetiva contra isolados de *P. eruginosa* (Maltezou, 2008; Grossi, Gasperina, 2006).

As polimixinas constituem uma antiga classe de antibióticos polipeptídeos catiônicos que incluem 5 diferentes compostos químicos (polimixina A, B, C, D e E). Somente duas delas, polimixina B e E (colistina) são utilizadas na clínica médica. O espectro de atividade das polimixinas engloba alguns BGNs como: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp. Estes antimicrobianos são utilizadas há décadas para o tratamento tópico de infecções, mas o seu uso parenteral foi abandonado desde o início dos anos 80 em muitos países, devido a relatos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade. No entanto, com a aumentada incidência de BGNs MR, PR e de patógenos produtores de M β LS, estes antimicrobianos passaram a ser novamente introduzidas para a terapia das infecções causadas por BGN (Grossi, Gasperina, 2006; Maviglia, Nestorini, Pennisi, 2009). Estudos recentes mostraram a eficácia das polimixinas para o tratamento das infecções causadas por BGN MR ou que apresentaram sensibilidade somente a este antimicrobiano. Adicionalmente, estes estudos também relataram que as polimixinas apresentaram menor toxicidade do que a relatada em estudos anteriores (Levin et al., 1999; Michalopoulos et al, 2005; Sader et al, 2006). Em um estudo em que foram avaliados 60 pacientes tratados com polimixina B, 14% apresentaram falência renal, no entanto esta condição clínica não foi associada exclusivamente ao uso da polimixina, pois outros antimicrobianos e fármacos nefrotóxicos foram administrados concomitantemente (Ouderikik et al., 2003). Estes estudos demonstram também que a toxicidade das polimixinas não difere muito dos outros antimicrobianos

utilizados e que a função renal pode ser recuperada com a retirada do antimicrobiano (Sader et al., 2006).

Alguns estudos recentes relatam a utilização das polimixinas em combinação com outros antimicrobianos (Petrosillo, Ioannidou, Fallagas, 2008; Maviglia, Ventorini, Pennisi, 2009). Um estudo *in vitro* verificou sinergismo entre polimixina B e rifampicina e esta combinação mostrou-se favorável para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* MR ou produtoras de MβLs (Tascini et al., 2004). Recentemente, Bassetti e colaboradores (2008) relataram resposta clínica e microbiológica em 76% dos casos de infecções graves por *A. baumannii* MR tratadas com esta associação.

A emergência da resistência às polimixinas é preocupante, uma vez que estas drogas podem, em muitas ocasiões, representar a única opção terapêutica para o tratamento das infecções por patógenos produtores de MβLs. Até o momento são poucos os relatos de cepas que apresentaram resistência a estas drogas (Landman et al., 2005, Li et al., 2006). Embora o uso clínico de terapias combinadas de polimixina com outros antimicrobianos necessita de mais estudos, a utilização da terapia combinada de polimixina com rifampicina e/ou carbapenêmicos e, possivelmente, com azitromicina, parece contribuir na prevenção da resistência às polimixinas (Landman et al., 2005).

Em uma revisão sobre opções terapêuticas para infecções por *P. aeruginosa* MR, Mesaros e colaboradores apresentaram as novas drogas que estão em fase III de estudo clínico. Uma cefalosporina de amplo espectro (ceftobiprol), um novo carbapenêmico (doripenem), são duas das principais drogas em estudo (Mesaros et al., 2007).

O ceftobiprol é uma cefalosporina de amplo espectro, utilizada para administração endovenosa, é ativa *in vitro* contra estreptococos e estafilococos inclusive isolados de *Streptococcus* spp. resistentes a penicilina e *S. aureus* resistentes a meticilina. Apresenta atividade *in vitro* contra *P. aeruginosa* comparável a do cefepime e ceftazidima. São necessários estudos em infecções com *P. aeruginosa* MR, mas o espectro de atividade deste antimicrobiano sugere que o mesmo pode ser um agente apropriado para o uso em regimes combinados com aminoglicosídeos ou fluoroquinolonas (Mesaros et al., 2007).

O doripenem é um carbapenêmico parenteral com uma estrutura que confere estabilidade à β-lactamases e resistência às dehidropeptidases renais, portanto não necessita ser administrado com cilastatina. A atividade contra Gram-positivos é semelhante a do imipenem e contra Gram-negativos apresenta atividade duas vezes maior que a do meropenem e 4 vezes maior que a do imipenem (Pappas, Saplaoura, Fallagas, 2009). Este agente tem sido relacionado a menores taxas de resistência espontânea quando comparado

com outros agentes anti-pseudomonas inclusive quando comparados com os outros carbapenêmicos. No entanto este antimicrobiano está sujeito a efluxo pelo sistema MexAB-OprM (Grossi, Gasperina, 2006).

Nos últimos anos, novos compostos têm sido investigados como inibidores de MβLs. No entanto, até o presente, nenhum agente está sob desenvolvimento ou pode ser utilizado na clínica médica. Embora estes inibidores sejam extremamente desejáveis para o tratamento das infecções por patógenos produtores de MβLs, as variações no sítio ativo apresentada pelas diferentes subclasses e variantes de MβLs, constituem o maior obstáculo para o desenho de um inibidor que possa atuar contra todos os tipos destas enzimas (Mesaros et al., 2007).

Uma vez que nenhum antimicrobiano para o tratamento das infecções por BGNs encontra-se em fase final de desenvolvimento pré-clínico, faz-se necessário direcionar os esforços na prescrição racional dos antimicrobianos já existentes, em associação com uma vigilância eficaz da emergência de mecanismos de resistência e implementação de medidas de controle de infecção. Além disso, a resistência aos antimicrobianos mais eficazes no tratamento das infecções por patógenos produtores de MβLs, as polimixinas e a tigeciclina, deve ser monitorada (Maltezou, 2008).

5 TIPAGEM MOLECULAR DE *P. AERUGINOSA* POR PFGE

Os métodos de tipagem são importantes meios para se estabelecer as fontes e o modo de transmissão de cepas bacterianas epidêmicas. Diferentes sistemas de tipagens para *Pseudomonas aeruginosa* têm sido descritos e as vantagens e desvantagens inerentes aos diversos métodos tem sido consideradas (Sader et al., 1995, Pfaller et al., 2001).

Nos últimos anos, com as facilidades de manipulação do DNA, técnicas de tipagem molecular estão sendo utilizadas, as quais permitem produzir perfis genotípicos para estudos epidemiológicos. Estas técnicas são mais reprodutíveis e discriminatórias que a análise das características fenotípicas (Pfaller et al., 2001).

A caracterização de cepas bacterianas usando técnicas de tipagem molecular pode ajudar na avaliação de surtos hospitalares causados por um determinado microrganismo, na detecção de disseminação local, regional e global de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos e na avaliação de infecções recorrentes (Sader et al., 1995, Pfaller et al., 2001).

Dentre os métodos moleculares utilizados na diferenciação de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, destacam-se:

- Métodos que não utilizam amplificação do DNA por PCR: Estes métodos analisam o DNA cromossômico após clivagem com enzimas de restrição. Os mais utilizados são: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE e *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP.
- Métodos que utilizam amplificação do DNA cromossômico por PCR: *Random-amplified polymorphic-DNA*, RAPD, *Repetitive element based PCR*: Rep-PCR e *Multilocus Sequencing Typing* - MLST

O PFGE é um método ou técnica frequentemente considerado como o padrão-ouro ou *gold standard* dos métodos de tipagem molecular. Apresenta um elevado poder discriminatório e elevada reprodutibilidade. Para a técnica de PFGE, os isolados bacterianos crescidos em caldo ou em meio sólificado são combinados com agarose fundida e introduzidos em pequenos moldes (*plugs*). Os *plugs* resultantes, contendo agarose e as células bacterianas inteiras são sujeitas a uma lise *in situ* com enzima e detergente e, numa próxima etapa, o DNA cromossômico é, então, clivado com enzimas de restrição que permitem a formação de um número limitado de fragmentos (5 a 20), relativamente grandes (10 a 800 kb). Os *plugs* contendo o DNA bacteriano digerido são inseridos dentro de um gel de agarose e submetidos à eletroforese em um aparelho no qual a polaridade da corrente é

mudada em diferentes posições a intervalos pré-determinados. Os padrões ou perfis de eletroforese são visualizados após coloração do gel com um corante fluorescente como brometo de etídio. O gel pode então ser fotografado e os dados analisados visualmente ou por meio de *softwares* disponíveis comercialmente que podem gerar dendogramas (Olive, Bean, 1999).

Tenover e colaboradores (1995) propuseram um sistema de padronização para interpretação dos padrões de PFGE em relação à similaridade dos perfis de bandas (fragmentos) eletroforéticas geradas. No seu esquema, isolados bacterianos originando o mesmo padrão ou perfil de PFGE são considerados a mesma cepa, ou isolados indistinguíveis. Isolados bacterianos que diferem por 1 a 3 bandas eletroforéticas (em decorrência de um evento genético - de substituição de um nucleotídeo até inserções ou deleções de sequências de DNA maiores) são estritamente relacionados. Isolados que possuem 4 a 6 bandas diferentes (representando dois eventos genéticos independentes), são possivelmente relacionados. Finalmente, isolados bacterianos contendo mais que 6 bandas de diferença (representativo de três ou mais eventos genéticos) são considerados não relacionados. Estes critérios são muito utilizados, principalmente quando as análises são realizadas por inspeção visual e geralmente são aplicados em pequenos estudos locais nos quais a variabilidade genética é limitada (Olive, Bean, 1999; Van Belkum et al., 2007).

A análise dos perfis eletroforéticos por meio de programas computadorizados são utilizados quando um grande número destes perfis deve ser comparado, ou quando os perfis são gerados em diferentes momentos ou tempos. Nos programas computacionais cálculos de similaridade e análise de grupos clonais são obtidos. Para isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., em geral, uma porcentagem de similaridade $\geq 80\%$ tem sido o ponto de corte para delinear um clone, correspondendo aos critérios de Tenover de até 3 bandas ou fragmentos eletroforéticos de diferença (Van Belkum et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- AENDEKERK, S.; GHYSELS, B.; CORNELIS, P.; BAYSSE, C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**, v.148, p. 2371-2381, 2002.
- ALBRECHT, S.J.; FISHMAN, N.O.; KITCHEN, J., et al. Reemergence of gram-negative health care-associated bloodstream infections. **Arch Intern Med** v.166, p.1289-1294, 2006.
- AL NAIEMI, N.; DUIM, B.; BART, A. A. CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Med Microbiol**, v.55, p.1607-1608, 2006.
- AMBLER R.P. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond Biol Sci**, v.289, p.321-331, 1980.
- ARAKAWA, Y.; MURAKAMI, M.; SUZUKI, K.; ITO, H.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHSUKA, S.; KATO, N.; OHTA, N. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. **Antimicrob Agents Chemoter**, v.39, p.1612-1615, 1995.
- ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUGIWARA, H.; GOTO, M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol** 38:40-43, 2000.
- BABIC M., HUJER A.M., BONOMO R.A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Update**, v.9, p.42-156, 2006.
- BASSETI, M.; REPETTO, E.; RIGHI, E.; BONI, S.; DIVERIO, M.; MOLINARI, M.P.; MUSSAP, M.; ARTIOLI, S.; ANSALDI, F.; DURANDO, P.; ORENZO, G.; BOBBIOPALLAVICINI, F.; VISCOLI, C. Colistin and rifampicin for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 61, p. 417-420, 2008.
- BEBRONE, C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochem Pharmacol**, v.74, n.12, p.1686-1701, 2007.
- BELLAIS, S.; MIMOZ, O.; LEOTARD, S.; JACOLOT, A.; PETIJEAN, O. NORDMNANN, P. Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactmase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemoter**, v.46, p. 2032-2034, 2002.
- BENNET, J.W.; HERRERA. J.S.; LEWIS, J.S.; WICKES, B.W.; JORGENSEN, J.H. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. **Antimicrob Agents Chemoter**, v.53, p.292-294, 2009.
- BENNET, P.M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **J. Antimicrob Chemoter**, v.43, p. 1-4, 1999.
- BERT, F.; VANJAK, D.; LEFLON-GUIBOUT, V.; MREJEN, S.; DELPIERRE, S.; REDONDO, A.; NICOLAS-CHANOINE, H. IMP-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a

French patient repatriated from Malaysia: impact of early and control measures. **Clin Infect Dis**, v. 44, p. 764-765, 2007.

BLONDEL-HILL, E.; HENRY, D.A.; SPERT, D. In: Murray, P.R. et al. *Pseudomonas. Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, p. 734-748, 2007.

BLOT, S.; VANDEWOUDE, K.; HOSTE, E.; COLARDIN, E. Reappraisal of attributable mortality in critically ill patients with nosocomial bacteraemia involving *Pseudomonas aeruginosa*. **J Hosp Infect**, v.53, p. 8-24, 2003.

BOERZEL, H.; HOECKERT, H.; BU, W.; SPINGLER, B.; LIPPARD, S.J. Zinc-bound thiolate-disulfide exchange: a strategy for inhibiting metallo-beta-lactamases. **Inorg Chem**, 42: 1604-1615, 2003.

BONOMO R.A.; SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, v.1, p.S49-56, 2006.

BOUZA, E.; GARCIA-GARROTE, F.; CERCENADO, E. *Pseudomonas aeruginosa*: estudio multicéntrico en 146 hospitales españoles. **Rev Esp Quimioter**, v.16, p.45-52, 2001.

BROWN, S.D.; TRACZEWSKI, M.M. Comparative in vitro antimicrobial activity of a new carbapenem, doripenem: tentative disk-diffusion criteria and quality control. **J Antimicrob Chemother**, v.55, p. 944-949, 2005.

BURGESS, D.S.; RAPP, R.P. Bugs versus drugs: Addressing the pharmacist's challenge. **Am J Health-Syst Pharm**, v.65, Suppl.2, p.S4-S15, 2008.

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, p.264-260, 1989a.

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, p. 271-276, 1989b.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1211-1233, 1995.

CAMPANA, E.H.; PASTA, A.A.C.; SANCHEZ, B.J.; SONG, E.Y.W.; BRONDI, F.O.; TOGNIM, M.C.B.; CARRARA-MARRONI, F.E. **Anais do IX Congresso Brasileiro de Infecção e Epidemiologia Hospitalar**, Sociedade Brasileira de Infecção Hospitalar, Salvador, 2004.

CARATOLLI. A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Vet Res**, v. 32, p.243-259, 2001.

CARRILHO, C.M.D.M.; BELEI, R.A.; CAVASSIN, E.D.; GARCIA, J.C.P., PERUGINI, M.R.E. Avaliação da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* hospitalar em 7 anos, resuscitando velhas drogas? **Anais do IX Congresso Brasileiro de Infecção e Epidemiologia Hospitalar**, Sociedade Brasileira de Infecção Hospitalar, Salvador, 2004.

CARVALHO, A.P.D.; ALBANO, R.M.; OLIVEIRA, D.N.; CIDADE, D.A.P.; TEIXEIRA, L.M.; MARQUES, E.A. Characterization of a epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist**, v.12, n.2, p. 103-108, 2006.

CASTANHEIRA, M.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; MATHAI, D.; JONES, R.N. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p. 1225-1227, 2009.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a β -lactamase gene *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.4654-4661, 2004.

CELENZA, G.; PELEGRINI, C.; CACCAMO, M.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Spread of *bla* (CTX-M-type) and *bla*(PER-2) beta lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J Antimicrob Chemother** v.57, p.975-978, 2006.

CHIKHANI, N.K.; DECRÉ, D.; GAUIER, V.; BURGHOFFER, B.; SALIBA, F.; MATHIEU, D.; SAMUEL, D.; CASTAING, D.; PETIT, J.C.; DUSSAIX, E.; ARLET, G. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*VIM-1 and *bla*SHV-5 in a French university hospital. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.1, p. 142-145, 2006.

CHOPRA, I.; SCHOFIELD, C.; EVERETT, M.; O'NEIL, A.; MILLER, K.; WILCOX, M.; FRÈRE, J.M.; DAWSON, M.; CZAPLEWSKI, L.; URLEB, I.; COURVALIN P. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. **Lancet Infect Dis**, v.8, n.2, p. 133-139, 2008.

CHUANCHUEN, R.; MURATA, T.; GOTOH, N.; SCWEIZER, P. Substrate-dependent utilization of OprM and OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.1844-1851, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement.** Clinical and Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2009.

CRESPO, J.; WOODFORD, N.; SINCLAIR, A.; KAUFMANN, M. E.; TURTON, J.; GLOVER, J.; VELEZ, J.D.; CASTAÑEDA, C.R.; RECALDE, M.; LIVERMORE D.M. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care Center in Cali, Colombia. **J. Clin Microbiol**, v.42, n.11, p.5094-5101, 2004.

CRNICH, C.J.; SAFDAR, N.; MAKI, D.G. The role of the intensive care unit environment in the pathogenesis and prevention of ventilator-associated pneumonia. **Resp. Care**, v.50, p.813-836, 2005.

DOCQUIER, J.D.; RICCIO, M.L.; MUGNAIOLI, C.; LUZZARO, F.; ENDIMIANI, A.; TONIOLO, A.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M. *imp*-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p. 1522-1528, 2003.

- DOI, Y.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; ADAMS, J.; PATERSON, D.L. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo beta lactamase SPM-1 in a pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p. 852-856, 2006.
- DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance against aminoglycosides. **Clin Infect Dis**, v.45, p.88-94, 2007.
- DOI, Y.; GHILARDI, A.C.; ADAMS, J.; DE OLIVEIRA-GARCIA, D.; PATERSON, D.L. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16Sr RNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.9, p.3388-3390, 2007.
- DRISCOLL, J.A.; BRODY, S.L.; KOLLEF, M.H.; The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v.67, n.3, p.351-368, 2007.
- DULJASZ, W.; GNIADKOWSKI, M.; SITTER, S.; WOJNA, A; JEBELEAN, C. First organisms with acquired metallo-beta-lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p. 2221-2222, 2009.
- ELLINGTON, M.J.; KLISTER, J.; LIVERMOORE, D.M.; WOODFORD, N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **J. Antimicrob Chemother**, v.59, n.2, p.232-232, 2007.
- EL SALABI, A.; TOLEMAN, M.A., WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. First report of the metallo- β -lactamase, SPM-1, in Europe. **Antimicrob Agents Chemother**, doi:10.1128/AAC.00719-09, 2009.
- FALLAGAS M.E.; BLIZIOTIS I.A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? **Int J Antimicrob Agents**, v.29, p.630-636, 2007.
- FLAHERTY J.P.; STOSOR V. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: MAYHALL, C. G.. **Infect Contr Hosp Epidemiol**. Philadelphia: Lippincott Williamms & Wilkins, 2004. p.575-602, 2004.
- FUENTEFRIA, D.B. Detecção de metalo-beta-lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 133p., 2009.
- GALANI, I.; SOULI, M.; KORATZANIS, E.; KORATZANIS, G.; CHRYSSOULI, Z., GIAMARELOU, H. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. **J Antimicrob Chemother**, v.59, p. 578-579, 2007.
- GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p.699-702, 2003.
- GALLEN, M.J.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; ROSSOLINI, G.M.; SPENCER, J.; DIDEBERG, O.; FRÉRE, J.M. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p. 660-663, 2001.

GARAU, G.; GARCIA-SAEZ, I; BEBRONE, C.; ANNE, C.; MERCURI, P.; GALLEN, M.; FRERE, J.M.; DIDEBERG, O. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.2347-2349, 2004.

GARZA-RAMOS, U.; TINOCO, P.; SILVA-SANCHEZ, J.; MORFIN-OTERO, R.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; LEON-GARNICA, G.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Metallo-beta-lactamas IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. **Int J Antimicrob Agents**, v.31, p. 78-80, 2008.

GAYNES, R.; EDWARDS, J.R.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM - NNIS. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**. v. 41, p. 848-854, 2005.

GIAMARELLOU H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. **J Antimicrob Chemother**, v.49, p.229-233, 2002.

GIRLICH, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacilinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p. 2043-2048, 2004.

GIULIANI, F.; DOCQUIER, J.D.; RICCIO, M.L.; PAGANI, L.; ROSSOLINI, G.M. OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a blaVIM-1-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.49, p. 1973-1980, 2005.

GONZALES, G.; MELLA, S.M.; ZEMELMAN, R.Z.; BELLO, H.T.; DOMINGUEZ, M.Y. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. **Rev Méd. Chile**, v.132, p.619-626, 2004.

GOTOH, N.; TSUGIMOTO, H.; TSUDA, M.; OKAMOTO, K.; NOMURA, A.; WADA, T.; NAKAHASHI, M.; NISHINO, T. Characterization of the Mex C-MexD- OprJ multidrug efflux system in delta *mexA-mexB-OprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, p.1938-1943, 1998.

GROSSI, P.; GASPERINA, D.D. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in critically ill patients. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.4, n.4, p.639-632, 2006.

GUPTA, V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opin Investig Drugs**, v.17, p. 131-143, 2008.

HALL, R.M.; COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. **Mol Microbiol**, v.15, p.593-600, 1995

HANCOCK, R.E.; SPEERT, D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resist Update**, v.3, p.247-255, 2000.

HIGGINS, P.G.; MILATOVIC, D.; VERHOEF, J.; SCHIMITZ, F.J. Mutations in GyrA, ParC, Mex R and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**, v.21, p.409-413, 2003.

HIRAKATA, Y.; YAMAGUSHI, T.; NAKANO, M.; IZUMIKAWA, K.; MINE, M.; AOKI, S.; KONDOH, A.; MATSUDA, J.; HIRAYAMA, M.; YANAGIHARA, K.; MIYAZAKI, Y.;

TOMONO, K.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; KOHNO, S. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- β -lactamases- producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, v.37, p. 26-32, 2003.

HOCQUET, D.; NORDMANN, P.; ELGARCH, F.; CABANNE, L., PLESIAT, P. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.4, 1347-1351, 2006

HOCQUET, D.; VOGNE, C.; EL, G.F.; VEJUX, A.; GOTOH, N.; LEE, A. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptative resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.46, p. 1371-1375, 2003.

HUGH, R.; LESSEL, E.F. *Pseudomonas aeruginosa* or *Pseudomonas pyocyaneae*, Request for an opinion. **Int J Syst Bacteriol**, v.17, n.1, p. 43-51, 1967.

ITO, H.; ARAKAWA, Y.; OHSUKA, S.; WACHAROTAYANKUN, R.; KATO, N.; OHTA, M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.824-829, 1995.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; TAKAHASHI, A.; YOMODA, S.; OKUBO, T.; NAKAMURA, A.; O'HARA. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.2014-2016, 2002

JACOBY G.A. AmpC beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Rev**, v.22, p.161-182, 2009.

JACOBY G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.41, p.S120-126, 2005.

JEANNOT, K.; ELSEN, S.; KOHLER, T.; ATTREE, I; VAN DELDEN, C.; PLESIAT, P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OPrJ efflux pump. **Antimicrob Agents and Chemother**, v.52, p.2455-2562, 2008.

JIANG, X.; ZHANG, Z.; LI, M.; ZHOU, D.; RUAN, F.; LU, Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v, 50, p. 2990-2995, 2006.

JO, J.J.; BRINKMAN, F.S.; HANCOCK, R.E. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p.1101-1111, 2003.

KALAI, B.S.; ACHOUR, W.; BEJAOU, A.; ABDELADHIM, BEN HASSEN, A. Detection of SHV-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains by genetic methods. **Pathol Bio Paris**, v.57, p. e-73-e-75, 2009.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable ever-present adversary. **J Hosp Infect**, v.73, p.338-344, 2009.

KIM J.M.; PARK E.S.; JEONG J.S.; KIM K.M.; OH H.S.; YOON S.W.; CHANG H.S.; LEE M.S.; SONG J.H.; KANG M.N.; PARK S.C.; CHOE K. W.; DAI C.H. Multicenter

surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. **Am J Infect Cont**, v.28, p.454-456, 2000.

KOH, T.H.; WANG, G.C.Y.; SONG, L.H. IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.2334-2336, 2004.

KOH, T.H.; YAMAGUCHI, K.; ISHII, Y. Characterization of the metallo-beta-lactamase VIM-6 and its genetic support. **Int. Antimicrob Agents**, v.32, p.446-449, 2008.

KOHLER, T.; EPP, S.F.; CURTY, L.K.; PECHERE, P.C. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OPrN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, 1999, v.181, n.20, p. 6300-6305, 1999.

KORTEN V.; ULUSOY S.; ZARAKOLU P.; METE B.; TURKISH MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.59, p.453-457, 2007.

KRAMER M.R., MARSHALL S.E., STARNES V.A., GAMBERG P., AMITAI Z., THEODORE J. Infections complications in heart-lung transplantation: analysis of 200 episodes. **Arch Inter Med**, Chicago, v.153, p.2010-2016, 1993.

KUMAR A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Adv Drug Deliv Rev**, v.57, p.1486-1513, 2005.

LAMBERT P.A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Adv Drug Deliv Rev**, v.57, p.1471-1485, 2005.

LANDMANN, D.; BRATU. S.; ALAM, M.; QUALE, J. City wide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. **J Antimicrob Chemother**, v.48, n.12, p. 954-957, 2005.

LAUPLAND, K.B.; PARKINS, M.D.; CHURCH, D.L., et al. Population based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamases in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (M β L)-producing strains. **J Infect Dis**, v.192, p.1606-1612, 2005.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from *Peudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother** v.43, p. 1584-1590, 1999.

LAUTENBACH, E; POLK, R. Resistant gram-negative bacilli: A neglected healthcare crisis. **Am J Health-Syst Pharm**, v. 64, (Suppl. 14), p.S3-S21, 2007.

LEE, B., HAAGENSEN J.A., CIOFU O., ANDERSEN J.B., HOIBI N., MOLIN S. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, Washington, v.43, p.5247-5255, 2005.

LEE, K., YUM, J.H; YOUNG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene *bla*_{SIM-1} in a class 1 integron

from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother.** v.49, p.4485-4491, 2005a.

LEE, N.Y.; YAN, J.J.; LEE, H.C.; LIU, K.H.; HUANG, S.T.; KO, W.C. Clinical experiences of bacteremia caused by metallo-beta-lactamase-producing gram-negative organisms. **J Microbiol Immunol Infect**, v.37, p.343-349, 2004.

LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENÇO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.G.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, S.F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v.28, p. 1008-1011, 1999.

LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; SPELMAN, D.; TAN, K.E.; LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n.9, p. 2946-2950, 2006.

LI. X. Z.; BARRE, N.; POOLE, K. Influence of Mex-A-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v.46, p.885-893, 2000.

LI, Y.; MIMA, T.; KOMORI, Y.; MORITA, T.; KURODA, T.; MIZUSCHIMA, T.; TSUCHIYA, T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p. 572-575, 2003.

LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial- Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.4, p.582-610, 2009.

LIVERMOORE, D.M. Of pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, v.47, p.247-250, 2001.

LIVERMOORE, D.M. Multiples mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis**, v.34, p.634-640, 2002.

LIVERMOORE D.M. has the era of untreatable infections arrived? **J Antimicrob Chemother**, v.64, S. 1, p. i29-i-36, 2009.

LIVERMOORE D.M.; YANG, Y.J. Beta lactamase lability and inducer power or newer beta-lactam antibiotics in relationa to their activity against beta-lactamases-inducibility mutantns of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Dis**, v.4, p. 775-782, 1987.

LIVERMOORE, D.M.; WOODFORD, N. The beta-lactamases threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends Microbiol** v.14, p413-420, 2006.

LIZIOLI A., PRIVITERA G., ALLIATA E., ANTONIETA BANFI E.M., BOSELI L., PANCERI M. L. PERNA M.C., PORRETA A.D., SANTINI, M.G., CARREREI V. Prevalence of nosocomial infections on Italy: result from the Lombardy survey in 2000. **J. Hosp. Infect.**, v.54, p.141-148, 2003.

LODGE, J.; PIDOCK, L.J. The control of class 1 beta-lactamase expression in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother.** v. 28, p.167-172, 1991.

- LOSSOS, I.S.; BREUER, R.; OR, R.; STRAUSS, N.; ELISHOOV, H.; NAPARSTEK, E.; AKER, M.; NAGLER, A.; MOSES, A.E.; SHAPIRO, M. Bacterial pneumonia in recipients of bone marrow transplantation: a five-year prospective study. **Transplantation**, v.60, p.672-678, 1995.
- LYNCH, M.J.; DRUSANO, G.L.; MOBLEY, H.L. Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.31, p. 1892-1896, 1987.
- MALTEZOU, H.C. Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **Int J Antimicrob Agents**, v.33, n.5, p.405.e1- 407, 2008.
- MAVIGLIA, R.; NESTORINI, R.; PENNISI, M. Role of old antibiotics in multidrug resistant bacterial infections. **Curr Drug Targets**, v.10, n.9, p.895-905, 2009.
- MARRA, A.R.; PEREIRA, C.A.; GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; CAL, R.G.; DE SOUZA, J.M.; EDMIOND, M.B.; FARO, C.; WEY, S.B. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.388-390, 2006.
- MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; GAPARETO, P.B.; BARTH, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from Southern Brazil. **Infection**, v. 35, n.6, p.457-460, 2007.
- MASUDA, N.; GOTOH, N.; OHYA, S.; NISHINO, T. Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in *nfxB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, p. 909-913, 1996.
- MASUDA, N.; SAKAGAWA, E.; OHYA, S.; GOTOH, N.; NISHINO, T. Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfxB* mutant to beta-lactams due to reduced expression of the AmpC beta lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p.1284-1286, 2001.
- MAYHALL C.G. Nosocomial burn wound infections. In: MAYHAL, C. G. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 385-399, 2004.
- McGOWAN JR, J.E. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Am J Infect Control**, v.34, p.S29-S37, 2006.
- MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M; PIGNATARI, A.C.; GALES, A.C. Metallo- β -lactamases. **J Bras Med Lab**, v.42, n.2, p. 103-113, 2006.
- MENDES, R.E.; KIYOTA, K.A.; MONTEIRO, J.; CASTANHEIRA, M.; ANDRADE, S.S.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; TUFIK, S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J. Clin Microbiol**, v.45, n.2, p. 544-547, 2007.
- MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.A.; RIBEIRO, J.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')*-Ib: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.4693-4702, 2004.

MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P.; ROUSSEL-DEVALLEZ, M.; VAN ELDERE, J.; GLUPCZYNSKI, Y.; VAN LAETHEM, Y.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULJKENS, P.M.; VAN BEBEKE, F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clin Microbiol Infect Dis**, v.13, p. 560-578, 2007.

MICHALOPOULOS, A.S.; TSIODRAS, S.; RELLOS, K.; MENTEZOPOULOS, S.; FALAGAS, M.E. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: The renaissance of an old antibiotic. **Clin Microbiol Infect Dis**, v.11, p. 115-121, 2005.

MIMA, T.Y.; MORITA, Y.; KATAOKA, T.; MIZUSHINO, T.; TSCHUYA, T. Gene cloning and properties of the RNP-type multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. **Microbiol Immunol**, v.49, p. 999-1002, 2005.

MINE, T.; MORITA, Y.; KATAOKA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, p.415-417, 1999.

MORITA, Y.; KOMORI, Y.; MIMA, T.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PA01: Mex CD-OPrJ is an inducible pump. **FEMS Microbiol Lett**, v.202, p.139-143, 2001.

MURATA, T, GOTOH, N.; NISHINO, T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. **FEMS Microbiol Lett**, 217:57-63, 2002.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, 264:382-388, 1994.

NOUÉR, S.A. Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. **Tese de Doutorado** Universidade Federal do Rio de Janeiro, 131 p., 2005.

NOUÉR. S.A.; NUCCI, M.; DE OLIVEIRA, M.P.; PELLEGRINO, F.L.; MOREIRA, B.M. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.9, p.3663-3667, 2005.

OBRITSCH, M.D.; FISH D.N.; MACLAREN, R.; JUNG R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. **Pharmacotherapy**, v.25, p.1353-1346, 2005.

OCHS, M.M.; McCUSKR, M.P.; BAINS, M.; HANCOCK, R.E. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic aminoacids. **Antimicrob Agents Chemother**. v.43, p.1085-1090, 1999.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v.37, p. 1661-1669, 1999.

OSANO, E.; ARAKAWA, R.; WACHAROTAYANKUN, M.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-

beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v.38, p.71-78, 1994

OUDERKIRK, J.P.; NORD, J.A.; TURETT, G.S.; KISLAK, W. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.47, n.8, p. 2659-2662, 2003.

PAI, H.; JACOBY, G.A. 2001. Sequences of the NPS-1 and TLE-1 beta-lactamase genes. **Antimicrob Agents Chemother** v.45, p.2947-2948, 2001.

PAPPAS, G.; SAPLAOURA, K.; FALAGAS, M.E. Current treatment of pseudomonal infections in elderly. **Drugs Aging**, v.26, p.363-379, 2009.

PARKINS, M.D.; PITOUT, J.D.; CHURCH, D.L.; CONLY, J.M.; LAUPLAND, K.B. Treatment of infections caused by metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region. **Clin Microbiol Infect**, v.13, n.2, p. 199-202, 2007.

PARTRIDGE, S.R.; TSAFNAT, G.; COEIRA, E.; IREDELI, J.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiol Rev**, v.33, p.757-784, 2009.

PATTERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum beta-lactamase: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v.18, p. 657-686, 2005.

PATTERSON, J.E. Multidrug resistant gram-negative pathogens: multiple approaches and measures for prevention. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.27, p.889-892, 2006.

PAYNE, D.J.; BATESON, J.B.; GASSON, B.C.; KHUSHI, T.; PROCTOR, D.; PEARSON, S.C.; REID, R. Inhibition of metallo-beta-lactamase by a series of thiol ester derivatives of mercaptophenylacetic acid. **FEMS Microbiol Lett**, v.157, p. 171-175, 1997.

PECHERE, J.C.; KOHLER, T. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Microbiol. Infect**, v.5, Suppl, 1, p. S15-S18, 1999.

PELLEG, A.Y.; FRANKLIN, C.; BELL, J.M.; SPELMAN, D.W. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP-4} among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clin Infect Dis**, v.41, p. 1549-1556, 2005.

PELLEGRINO, F.L.; CASALI, N.; DOS SNATOS, K.R.; NOUÉR, S.A.; SCHEIDGER, E.M.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying *bla*_{SPM} metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. **J Chemother**, v.18, n.2, p. 151-156, 2006.

PELLEGRINO, F.L.; CASALI, N.; NOUÉR, S.A.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. A carbapenem susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain carrying the *bla*_{SPM} gene. **Diagn Microbiol Dis**, v.61, n.2, p. 214-216, 2008.

PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; NOUÉR, S.A.; OLIVEIRA, M.P.; SAMPAIO, J.L.M.; FREITAS, A.A.F.; FERREIRA, A.L.P.; AMORIM, E.L.T.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Occurrence of a multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v.40, n.7, p. 2420-2424, 2002.

PEREZ, F.J.; GIMENO, C.; NAVARRO, D.; GARCIA-DE-LOMAS, J. Meropenem permeation through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* can involve pathways other than OprD porin channel. **Chemotherapy**, v.42, p.210-214, 1996.

PETROSILLO, N.; IOANNIDOU, E.; FALAGAS, M.E. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.9, p.816-827, 2008.

PICÃO, R.C. Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de São Paulo- Escola Paulista de Medicina, Depto de Medicina, Disciplina de Infectologia, 121f, 2009.

PICÃO, R.C.; ANDRADE, S.S.; NICOLETTI, A.G.; CAMPANA, E.H.; MORAES, G.C.; MENDES, R.E.; GALES, A.C. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk test for IMP-, GIM-, SIM-, SPM- or VIM-producing isolates. **J Clin Microbiol**, v.46, n.6, p. 2928-2937, 2008.

PICÃO, R.C.; L. POIREL.; GALES, A.C.; NORDMANN, P. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** v.53, p. 2225-2226, 2009.

PIDDOCK L.J. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. **Nat Rev Microbiol**, v.4, p.629-636, 2006.

PFALLER, M.A. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. **Emerg Infect Dis**, v.7, p. 312-318, 2001.

PITTET, D. Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.20, p.37-42, 1999.

PITOUT, J.D.; GREGSON, D.B.; POIREL, L.; McCLURE, J.A.; LEE, P.; CHURCH, D.L. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase in a large centralized laboratory. **J. Clin. Microbiol**, v.43, p.3129-3135, 2005.

PITOUT, J.D.; REVATHI, G.; CHOW, B.L.; KABERA, B.; KARIUKI, S.; NORDMANN, P.; POIREL, L. metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.8, p. 755-759, 2008.

POIREL, L.; MAGALHÃES, M.; LOPES, N.M.; NORDMANN, P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n.4, p.1406-1409, 2004.

POIREL, L.; BRINAS, L.; VERLINDE, A.; IDE, L.; NORDMANN, P. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron *In120* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.3743-3748, 2005.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Class D beta-lactamases; Diversity, epidemiology and genetics. **Antimicrob Agents Chemother**, doi:10.1128/AAC.01512-08, 2009.

- POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.B. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York : Churchil Livingstone, p.2310-2335, 2000.
- POOLE, K.; GOTOH, N.; TSUGIMOTO, H; ZHAO, Q; WADA, A; YAMASAKI, T.; NESHAT, S.; YAMAGOSHI, J.; LI, Z.T.; NISHINO, T. Overexpression of mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol Microbiol*, v.21, p.713-724, 1996.
- POOLE, K. Outer membrane and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Curr. Pharm Biotechnol**, v.3, p.77-98, 2002.
- POOLE K. Efflux mediated antimicrobial resistance. **J. Antimicrob Chemother**, v.56, p.20-51, 2005a.
- POOLE K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.479-487, 2005b.
- POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Ann Med**, v. 39, n.3, p. 162-176, 2007.
- QUINTEIRA, S.; PEIXE, L. Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? **Appl Environ Microbiol**, v.72, p. 3743-3745, 2006.
- RAHAL, J.J. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram-negative infections. **Critical Care**, v.12, (Suppl. 4), p.1-7, 2008.
- RASMUSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, p.223-232, 1997
- RICE L.B. The clinical consequences of antimicrobial resistance. **Curr Opin Microbiol**, v.12, p.1-6, 2009.
- RICCIO, M.L.; FRANCESCHINI, N.; BOSCHI, L.; CARAVELLI, B.; CORNAGLIA, G.; FONTANA, R.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla_{IMP}* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.44, n.5, 9.1229-1235, 2000.
- RODLOFF, A.C., GOLDSTEIN, E.J.C., TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **J Antimicrob Chemother** v.58, p.916-929, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Expectrum-extended cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p. 1766-1771, 2009.
- ROSSOLINI, G. M. Acquired metallo-beta-lactamase: an increasing clinical threat. **Clin Infect Dis**, v.41, n.11, p. 1557-1558, 2005.
- RYOO, N.H.; LEE, K; LIM, J.B.; LEE, Y.H.; BAE, I.K.; JEONG, S.H. Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo-beta-lactamase in a Korean hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.63, p. 115-117, 2009.

SADER H.S. Polimixinas: menos tóxicas e mais necessárias que imaginávamos. **Prática Hospitalar**, n.46, p. 216-220, 2006.

SADER, H.S.; HOLLIS. R.J.; PFALLER, M.A. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Clin Lab Med**, v.15, p. 407-431, 1995.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S., GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect** , v.11, p. 73-76, 2005.

SAKYO, S; TOMITA, H. TANIMOTO, K; FUJIMOTO, S.; IKE, I. Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antibiot**, v. 59, p. 220-228, 2006.

SANSHAGRIN, F.; BEJAOU, N.; LEVESQUE, R.C. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolysing beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p. 2030-2037, 2006.

SCHIMIDTKE, A.J.; HANSON, N.D. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.2030-2037, 2006.

SEKIGUCHI, J., MORITA, K; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p. 4194-4197, 2008.

SENDA, K.; ARAKAWA, Y.; ICHIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; OHSUKA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. PCR detection of metallo-beta-lactamases gene(*bla*_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. **J Clin Microbiol**, v.34, n12, p.2909-2913, 1996.

SEVILLANO, E.; GALLEGO, L.; GARCIA-LOBO, J.M. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *Acinetobacter baumannii*. **Pathol. Biol. (Paris)**, v.57, p.493-495, 2009

SIARKOU, V.I.; VITTI, D.; PROTONATORIOU, A; IKONOMIDIS, A.; SOFIANOU, D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant bla_{VIM-17} metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p. 1325-1330, 2009.

SILVA, D.J.; CORREIA, M.; VITAL, C.; RIBEIRO, G.; SOUSA, J.C.; LEITÃO, R.; PEIXE, L.; DUARTE, A. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **FEMS Microbiol Lett**. v.215, n.p. 350-354, 2001

SHIBATA, N.; DOI, Y.; YAMANE, K.; YAGI, T.; KUROKAWA, H.; SHIBAYAMA, K. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integrons. **J Clin Microbiol**, v.41, p.5407-5413, 2003

SLIGL W.; TAYLOR G.; BRINDLEY P.G. Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. **Int J Infect Dis**, v.10, p.320-325, 2006.

SLAMA, T.G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**, v.12 (Suppl. 4), p.1-7, 2008.

SOBEL, M.L.; NESHAT, S.; POOLE, K Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent mexEF-OprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol** 187:1246-1253, 2005

SOULI, M.; GALANI, I; GIAMARELOU, H. Emergence of extensively drug resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Eurosurveillance**. v.13, n 47, p. 1-11, 2008.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H.W.; SCHELD, W.M.; BARLETT, J.G.; EDWARDS, J. Jr.; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY AMERICA The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.46, p.155-64, 2008.

STOVER, C.K.; PHAN, X.O.; ERVIM, A.L.; MIZOGUCHI, S.D.; WARRENER, P.; HICKLEY, M. J.; BRINKMAN, F.S.; HUFNAGLE, W.O.; KOWALICK, D.J.; LAGROU, M.; GARBER, R.L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN Y.; BRODY, L.L.; COULTER, S.N.; FOLGER, K.R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G.K.; WU, Z.; PAULSEN, I.T.; REIZER, I.T.; REIZER, J.; SAIER, M.H.; HANCOCK, R.E.; LORY, S.; OLSON, M.V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.406, p.959-964, 2000.

STOCZKO, M; FRÈRE, J.M.; ROSSOLINI, G.M.; DOCQUIER, J.D. Functional diversity among metallo-beta-lactamases: characterization of the CAR-1 enzyme of *Erwinia carotovora*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.2473-2479, 2008.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **J Med Microbiol**, v.58, p.1133-1148, 2009.

TASCINI, C.; GEMIGNANI, G.; FERRANTI, S.; TAGLIAFERRI, E.; LEONILDI, A.; LUCARINI, A.; MENICHETTI, E. Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampicin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J. Chemother**, v. 16, n. 3, p. 282-287, 2004.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin Microbiol**, v.33, p 2233-2239, 1995.

TOGNIM, M.C.B. GALES, A.C.; PENTEADO, A.P.; SILBERT, S.; SADER, H. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, p. 742-747, 2006

TOLEMAN, M.A.; BENNET, P.M.; WALSH, T.R. *ISCR* elements: a novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiol Mol Biol Rev**, v.70, p. 296-316, 2006.

TOLEMAN, M.A.; BIEDENBACH, A.D.; BENNET, D.; JONES, R.N.; WALSH, T.R.

Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p. 583-590, 2003.

TOLEMAN, M.A.; SIM, A.M.; MURPHY, T.A., GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrob Agents Chemother**, 50, p.673-679, 2002.

TOLEMAN, M.A.; VINODH, H.; SEKAR, U.; KAMAT, V.; WALSH, T.R. *bla*_{VIM-2} harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.7, p. 2636-2638, 2007.

TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. Evolution of ISCR group of ISCR3 elements. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.10, p. 3789-3791, 2008

TSAKRIS, A.; IKONOMIDIS, A.; POULOU, A.; SPANAKIS, N.; VRIZIAS, D.; DIOMIDOUS, M.; POURNARAS, S.; MARKOU, F. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.6, p.588-594, 2008.

Van BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOOM, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N.K.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRULENS, M.; ESCMID, ESGEM. Guidelines for the validation and application of typing methods. **Clin Microbiol Infect**, 2007, v.13, Suppl. 3, p. 1-46, 2007.

VIDAL, F.; MENSA, J.; MARTINEZ, J.A.; ALMEIDA, M.; MARCO, F.; GATELL J.M.; RICHART, C.; SORIANO, E.; DE ANTA M.T.J. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.18, p.473-477, 1999.

VILA, J.; MARCO, F. Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.20, p.304-310, 2002.

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A. KATTAQN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolysing beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, p.1553-1555, 2007.

WALSH, T.R. The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 11, suppl.6, p. 2-9, 2005.

WALSH, T.R. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. **Curr Opin Microbiol**, v.9, p.476-482, 2006.

WALSH, T.R.; Clinically significant carbapenemases: an update. **Curr Opin in Infect Dis.** v.21, p. 367-371, 2008.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamase in routine clinical testing. **J. Clin Microbiol**, v.40, p. 2755-2759, 2002.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo- β -lactamases: the quiet before storm? **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n.2, p.306-325, 2005.

WATANABE, M; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemother**, v. 35, p. 147-151, 1991.

WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Bacteriologia Médica: Taxonomia, Morfologia, Fisiologia e Virulência. In: **Koneman, Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 6a edição, p.165-202, 2008a.

WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Abordagem para o isolamento e a identificação dos não fermentadores. In: **Koneman, Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 6a edição, p. 351-371, 2008b.

WOLTER, D.J.; KHALAF, N.; ROBLEDO, I.E.; VAZQUEZ, G.J.; SANTE, M.I.; AQUINO, E.E.; GOERING, R.V.; HANSON, N.D. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta lactamases. **Anticarb Agents Chemother** v.53, p.1660-1664, 2009.

WRIGHT G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nat Rev Microbiol.**, v.5, p.175-86, 2007.

XAVIER, D.E.; GALES, A.C.; MENDES, R.E.; PIGNATARI, A.C.C; SANTOS FILHO, L.; CIRILO, L.F.; CASTANHEIRA, M. IMP-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): increasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. 46th **ICAAC-Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, San Francisco, CA, Abstract C2-419, 2006.

YAMANE, K.; DOI, Y.; YOKOYAMA, K; YAGI, T.; KUROKAWA, H.; SHIBATA, N.; KATO, K.; ARAKAWA, Y. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p. 2069-2074, 2004.

YARD G.W., COX R.A. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contaminated urodynamic equipment. **J. Hosp. Infect.**, v.47, p.60-63, 2001.

YILDIRIM, S.; NURSAL, T.Z.; TARIM, A.; NOYAN, T.; DEMIROGLU, Y.Z.; MORAY G. HABERAL M. Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care units, and the hospital services unit of a single center. **J Burn Care Rehabil.**, v.26, p.488-492, 2005.

YOKOYAMA, K.; DOI, Y.; YAMANE, K.; KUROKAWA, H.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; YAGI, T.; KATO, H.; ARAKAWA, Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lancet** 362, 1888-1893, 2003.

YONG, D., BELL, J.M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. A novel sub-group metallo-beta-lactamase (MBL), AIM, emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **47th ICAAC- Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother**. Chicago, IL, Abstract C1-593, 2007.

YONG, D.; LEE, K.; YUM, J.H.; SHIN, H.B.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v.40, p.3798-3801, 2002.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin seterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; GOLÇALVES, A.L., et al. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections, **J Antimicrob Chemother**. 58:387-392, 2006a.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; GASPARETO, P.B.; GONÇALVES, A.L.; MORO, A.L.; FERNANDES, J.L.; GOLDANI, L.Z. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. **J. Antimicrob Chemother**, v.58, n.4, p.882-885, 2006b.

ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; GONÇALVES, A.L.; BARTH, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a teaching hospital in Southern Brazil. **J. Antimicrob. Chemother**, v.56, p. 1148-1151, 2005.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A.C. multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.8, n.1, p.71-93, 2010.

ZHANEL, G.G.; WIEBE, R.; DILAY, L., THOMSON, K.; RUBSTEIN, E.; HOBAN, D.J.; NOREDDIN, A.M.; KARLOWSKY, J.A.. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**. v.67, n.7, p. 1027-1052, 2007.

ARTIGO A**CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRODUCING SPM-1
AND IMP-16 METALLO-BETA-LACTAMASES IN BRAZILIAN TEACHING
HOSPITALS**

**Authors: Floristher Elaine Carrara–Marroni, Maria Cristina Bronharo Tognim,
Emerson José Venâncio, Barbara Gionco, Gisele Maria Andrade–Nóbrega, Jacinta
Sanchez Pelayo**

Artigo enviado para o periódico **Journal of Hospital Infection**

**CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRODUCING SPM-1
AND IMP-16 METALLO-BETA-LACTAMASES IN BRAZILIAN TEACHING
HOSPITALS**

**Authors: Floristher Elaine Carrara–Marroni¹, Maria Cristina Bronharo Tognim²,
Emerson José Venâncio³, Barbara Gionco¹, Gisele Maria Andrade–Nóbrega⁴, Jacinta
Sanchez Pelayo⁵**

Title Page

**TITLE: CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRODUCING
SPM-1 AND IMP-16 METALLO-BETA-LACTAMASES IN BRAZILIAN
TEACHING HOSPITALS.**

Running title: MβL-producing *Pseudomonas aeruginosa*

Summary

Metallo-β-lactamase (MβL) production is an important mechanism of carbapenem resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, and this mechanism is becoming more frequently observed in Brazil. This study was designed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile and describe the frequency and molecular characteristics of MβLs among *P. aeruginosa* isolates recovered from inpatients and outpatients treated at two teaching hospitals in Londrina, Brazil. A total of 240 *P. aeruginosa* isolates consecutively collected from March 2003 to March 2005 were evaluated and 141 isolates non-susceptible to ceftazidime and carbapenems were selected to detect MβL production and the presence of MβL genes by PCR. The MβL-producing isolates were submitted to molecular typing by PFGE. A high rate of antimicrobial resistance was found and only the polymyxins showed 100% activity against the *P. aeruginosa* isolates evaluated. A total of 47 isolates were MβL-producers, and the *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-16} genes were found in 45 and 2 isolates, respectively.

¹ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Av. Robert Koch, 60. CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3371 2200; fax: +55 43 3337 5100; e-mail: floristherelaine@hotmail.com

² Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

³ Pathological Sciences

⁴ Biological Sciences

⁵ Microbiology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

SPM-1 isolates comprised 11 clones with different multidrug-resistance profiles. The IMP-16 isolates belonged to another single clone. The SPM-1 isolates of clone A showed close genetic relatedness to the Brazilian epidemic SPM-1 strain termed the SP clone, indicating spread of this clone in our hospitals. The SPM-1-producing isolates were mainly recovered from patients hospitalized in the male patients' ward and ICUs, suggesting an important role of these areas in the nosocomial dissemination of M β L-producing strains.

Keywords: Carbapenem resistance. Metallo-beta-lactamase. Molecular epidemiology. *Pseudomonas aeruginosa*.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa strains producing metallo- β -lactamases (MBLs) are increasingly implicated in nosocomial infections. These strains constitute a therapeutic challenge that severely limit treatment options.¹ The acquired MBLs are zinc-dependent enzymes characterized by a broad hydrolytic activity against all β -lactams except aztreonam, and by non-susceptibility to therapeutic serine β -lactamase inhibitors.² Genes encoding these enzymes are usually clustered with other determinants of resistance, on mobile DNA elements that provide them with a broad potential for expression and dissemination.³

Five types of acquired MBLs (IMP, VIM, SPM, GIM and AIM) have been identified in clinical isolates of *P. aeruginosa* worldwide. The MBLs show complex multidrug-resistant (MDR) phenotypes and sometimes cause extensive outbreaks of nosocomial disease.^{3,4} In Brazil, IMP-1, IMP-16, VIM-2 and SPM-1 MBL-types have been identified to date in clinical isolates of *P. aeruginosa*^{5,6}. SPM-1 is the predominant MBL detected, and the *bla*_{SPM-1} gene is widely disseminated in Brazilian hospitals, contributing to the high carbapenem resistance rates among *P. aeruginosa* isolates.⁷

Since the early 2000s an increasing frequency of isolation of the MDR *P. aeruginosa* has been noted by the Division of Microbiology at the Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. An analysis of microbiological data showed an alarming rise of carbapenem resistance among *P. aeruginosa* producing nosocomial infections from 17% in 1998 to 70% in 2004 (unpublished data). In addition, a multicenter study, conducted in 2002, detected the presence of an epidemic SPM-1-producing *P. aeruginosa* strain in this hospital.⁷

Given the importance of MBL-producing *P. aeruginosa* as a pathogen and the recognition of its presence in our hospital we decided to investigate the molecular epidemiology of MBL-producing *P. aeruginosa* strains in the Hospital Universitário (HU) and

the Ambulatório do Hospital das Clínicas (AHC), two teaching hospitals of the Universidade Estadual de Londrina (UEL), located in the city of Londrina, southern Brazil.

Methods

Study setting

The HU/AHC complex includes two teaching hospitals affiliated with the Universidade Estadual de Londrina, which constitute a medical reference center for the region. They provide general and high-complexity medical and diagnostic services and public health care for the population of >1 million residing in the Londrina Metropolitan Region and numerous surrounding cities. The Division of Microbiology of the HU includes two integrated laboratories, the Clinical Microbiology Laboratories (CML) that perform all the routine clinical and infection control microbiology services for both hospitals.

Demographics data

Demographics data including gender, age, sex, unit, and body/site of bacterial isolation were collected from the microbiology archives at the CML.

Bacterial isolates

Non-duplicate isolates collected consecutively at the CML from March 2003 to March 2005 and obtained from single patients were selected for this study. Bacterial identification was performed by means of the MicroScan WalkAway (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) and by conventional techniques.⁸ Isolates were kept frozen at -20°C in trypticase soy broth (TSB) (Oxoid, Basingstoke, England) containing 30% glycerol (v/v) until further testing.

Antimicrobial susceptibility testing

The Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were initially determined by microdilution assay in the MicroScan Automated system (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) using the microdilution panels (MicroScan Gram-negative NMIC30; Dade Behring). The antimicrobials tested were, aztreonam, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, amikacin, gentamicin and tobramycin. In

addition, the antimicrobial susceptibility to colistin (Oxoid) was assessed by the disk diffusion method.⁹ All the isolates were confirmed by standard agar dilution for imipenem (Merck/Sharp & Dome, Rahway, NJ, USA), meropenem (Astra-Zeneca, Cotia, SP, Brazil) and polymyxin B (Sigma, Steinheim, Germany) on Muller Hinton medium (MH) (Oxoid) with a final inoculum of 10^4 CFU/spot, following the guidelines of Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).¹⁰ Quality control was carried out using *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Tests were read and interpreted as recommended by the CLSI guidelines.¹¹

Screening for carbapenemase activity and metallo-beta-lactamase detection

Those isolates which were intermediate or resistant (nonsusceptible–NS) to carbapenems (imipenem, meropenem) ($\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/mL}$) and/or to ceftazidime ($\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/mL}$), here termed C/CAZ-NS, were evaluated for carbapenemase activity and M β L production. The carbapenemase activities of cell sonicates from overnight broth cultures were determined by spectrophotometric assay as previously described.^{7,12} Briefly, 10 mL of an overnight broth culture was harvested and then disrupted by sonication. Whole-protein extracts were obtained after centrifugation. The hydrolytic activity of 20 μL of the crude extract was determined against 100 μM imipenem in 100mM phosphate buffer (pH 7.0), and measurements were carried out at a wavelength of 297nm. The C/CAZ-R *P. aeruginosa* isolates were evaluated for the presence of the M β L phenotype by the triple-disk synergy test (TDST) using EDTA (Sigma, Steinheim, Germany) and 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) (Sigma) for M β L inhibition.¹³ A 0.5 McFarland bacterial suspension was inoculated on a (MH) agar plate (Oxoid). Imipenem (10 μg), meropenem(10 μg) and ceftazidime (30 μg) disks (Oxoid) were aligned around blank filter disks containing 5.0 μL of 100 mM EDTA and 3.0 μL of 2-MPA (7.0 mM, diluted 1:8). The distances tested between the substrates and inhibitors were 1.5 and 2.0 cm (from center to center) for EDTA and 2-MPA, respectively. The appearance of either an enhanced or a phantom zone between the antimicrobial agents and the inhibitor disk was considered a positive result and indicative of M β L production. The clinical isolates that showed positive results for TDST were additionally assessed by the M β L E-test method (AB Biodisk, Solna, Sweden), as recommended by the manufacturer.

Amplifications of MBLs genes and sequence analysis

The presence of *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, and *bla*_{SIM} MBL genes was evaluated for all the C/CAZ-NS *P. aeruginosa* strains. A multiplex PCR was carried out using previously described conditions and primers targeting the conserved regions of the MBL.¹⁴ Sequencing of both strands of the purified amplicons (Purelink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was performed with the PCR primers¹⁴ and an Automated Sequencer (MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Sequencing of the IMP genes was performed using the class1 integron primers 5CS (5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3') and 3'CS (5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3') in combination with IMP primers.^{14,15} Analysis of the nucleotides sequences and their deduced protein products were performed by the computational program BioEdit Sequence Editor Version 5.0.9.¹⁶ Nucleotides sequences were compared with those available in the GenBank database by the basic local alignment search tool (BLAST) accessible through the Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Molecular strain typing

P. aeruginosa isolates producing MBLs were investigated for genetic relatedness by macrorestriction profiling of genomic DNA after the digestion of DNA with *SpeI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and fragment separation by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as described previously.¹⁷ The DNA patterns generated by PFGE were interpreted using the BioNumerics software, version 5.10 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium), for analysis. A dendrogram was constructed using the unweighted pair-group method of the arithmetic average clustering method with the Dice coefficient. Isolates were considered genetically related if the Dice coefficient correlation was 80% or greater, which corresponds to the “possibly related (4-6 bands difference)” criterion of Tenover *et al*¹⁸ in agreement with the guidelines described previously.¹⁹ An additional three non-MBL-producing strains of *P. aeruginosa* from our hospital, representative of each study year, were used as controls for PFGE. The *P. aeruginosa* isolate 48-1997A²⁰ (i.e., Brazilian epidemic SPM-1-producing strain termed the SP clone), was included in the PFGE experiments for direct comparison of genotypes.

Results

Demographics data of patients and bacterial isolates

During the 25-month study period, a total of 547 isolates of *P. aeruginosa* were consecutively collected at the CML, of which 240 (43.8%) were obtained from single patients and were evaluated in this study. One-hundred and-fifty-three (63.8%) and 87 (36.2%) were isolated from male and female patients, respectively. The patients' ages ranged from 17 days to 92 years with a median age of 54 years. *P. aeruginosa* isolates were recovered from patients hospitalized in medical-surgical wards 57.9% (139 of 240) and ICUs 26.7% (64 of 240;) at the HU, and the remaining 15.4% (37) from outpatients treated at the AHC. Specimens for the isolates were as follows: 110 isolated from urine, 60 from purulent exudates or secretions, 24 from blood and catheter tips, 23 from skin and soft tissues, 12 from peritoneal and cerebrospinal fluids, and 11 from respiratory specimens.

Antimicrobial susceptibility

The rates of resistance to 12 antipseudomonal antimicrobials for three groups of *P. aeruginosa* are listed in Table I. Of the 240 isolates included in this study, 141 (58.7%) were considered non-susceptible to carbapenems and/or ceftazidime (C/CAZ-NS). Only polymyxin B and colistin were active against 100% of the isolates. The MICs for polymyxin B ranged from 0.5 to 2.0 µg/mL. Except for polymyxins, the highest susceptibility was obtained for piperacillin-tazobactam (70.8%) followed by meropenem (58.4%), aztreonam (57.2%), imipenem (56.6%), ceftazidime (49.6%), cefepime (46.2%), amikacin (42.9%) ciprofloxacin (41.3%) tobramycin (40.8%) and gentamicin (32.9%) (Table 1). All the C/CAZ-NS were resistant to three or more antimicrobial classes (MDR). The MβL-producing *P. aeruginosa* isolates were always characterized by an MDR phenotype including 100% resistance to aminoglycosides, ciprofloxacin, and cephalosporins. Except for two isolates that showed susceptibility to meropenem and were intermediate for imipenem, all the others MβL-producing isolates showed resistance to both carbapenems and exhibited identical MIC₅₀ and MIC₉₀ for these drugs corresponding to 128 µg/mL and 256 µg/mL, respectively.

Table 1 – Antimicrobial activity of selected antipseudomonal agents tested against three groups of *P. aeruginosa* clinical isolates recovered at the HU/AHC complex during 2003-2005.

Antimicrobial	Antimicrobial activity (%)								
	Total isolates studied ^(a)			C/CAZ-NS ^(b)			MBLproducer ^(c)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Pip.Tazobactam	70.8	-	29.2	51.8	-	48.2	59.6	0.0	40.4
Aztreonam	57.2	11.6	31.2	45.4	11.3	75.9	70.2	4.3	25.5
Ceftazidime	49.6	5.8	44.6	14.2	9.9	75.9	0.0	0.0	100.0
Cefepime	46.2	9.2	44.6	14.9	11.3	73.8	0.0	0.0	100.0
Imipenem	56.6	6.7	36.7	25.5	11.4	63.1	0.0	4.3	95.7
Meropenem	58.4	5.8	35.8	29.8	9.9	60.3	4.3	0.0	95.7
Ciprofloxacin	41.3	0.8	57.9	14.2	0.7	85.1	0.0	0.0	100.0
Amikacin	42.9	1.3	55.8	14.2	9.9	75.9	0.0	0.0	100.0
Gentamicin	32.9	8.8	58.3	12.1	4.2	83.7	0.0	0.0	100.0
Tobramycin	40.8	2.1	57.1	13.5	0.7	85.8	0.0	0.0	100.0
Polymyxin B	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
Colistin	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0

	Total isolates studied ^(a)		C/CAZ-NS ^(b)		MBL producer ^(c)	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	Imipenem	4	256	32	256	128
Meropenem	4	256	32	256	128	256
Polymyxin B	2	2	2	2	2	2

a, 240 non-repetitive isolates selected for study; **b**, C/CAZ-NS: Non-susceptible isolates intermediate or resistant to carbapenems (n= 141); **c**, MBL-producer isolates (n=47). S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. (Interpretive criteria for each antimicrobial tested were those published by the CLSI¹¹); MIC, minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$)

Detection of M β L production

The spectrophotometric assay detected carbapenemase activity in 48 (34.0 %) of the 141 C/CAZ-NS isolates. Using the TDAT, 47 (33.3 %) of the 141 isolates were presumptive M β L producers and 45 (32.9%) of these isolates were confirmed as positive for M β L production by the E-test M β L strips. Two isolates that were M β L positives in TDAT showed negative results by the Etest method. In addition, the spectrophotometric assay detected carbapenemase activity in one isolate that did not show M β L production by the TDAT or the E-test. This isolate was further submitted to PCR assay for detection of *bla*_{K_{pc}} and *bla*_{GES} genes^{21,22} and originated one amplification product with the GES primers.

Identification and sequencing of the M β L genes

Of the 141 C/CAZ-NS *P. aeruginosa* strains assayed by PCR for M β L genes, 45 isolates showed amplification products with the SPM primers, and 2 isolates amplified with the IMP primers. The remaining 94(66.7%) isolates were negatives for all M β L genes tested.

Sequence analysis of the SPM amplicons revealed identity with the sequence of the *P. aeruginosa* strain, previously described (GenBank accession number AJ492820).²⁰ Nucleotide sequencing of two isolates that yielded amplification products with *bla*_{IMP} genes showed 100% identity to the *bla*_{IMP-16} gene (accession number AJ584652), first detected in a *P. aeruginosa* clinical isolate termed 101-4707 strain recovered from Brasília, Brazil in 2004.⁶

PFGE

PFGE identified 12 different clones among the 47 M β L producing isolates. Five clones included more one isolate which presented >80% similarity in the PFGE profiles (Figure 1). For one isolate, Pa537, satisfactory PFGE profile was not obtained. Two major clusters, A and B were observed among the SPM-1-producing isolates. The cluster A included 13 isolates recovered from inpatients admitted to the general wards of the HU and outpatients attended at two different clinics of the AHC. The PFGE profile displayed by SP clone, was closely related to PFGE profiles included in clone A. The 19 isolates pertaining to cluster B were predominantly recovered from patients admitted to the ICUs and the Male Patients' Ward (MPW) of the HU. The remaining 15 SPM-1-producing isolates were distributed in 9 other clones. The two IMP-16-producer isolates showed close PFGE profiles with 96.8 % similarity. They were designated as the same clonal group (clone D), although they were recovered from two non-related patients: one inpatient of the MPW of the HU, and another outpatient attended at the Urology Clinic of the AHC. Except for the two isolates producing IMP-16 M β L, which displayed the same resistance pattern, no correlation between the clones and specific resistance patterns could be established.

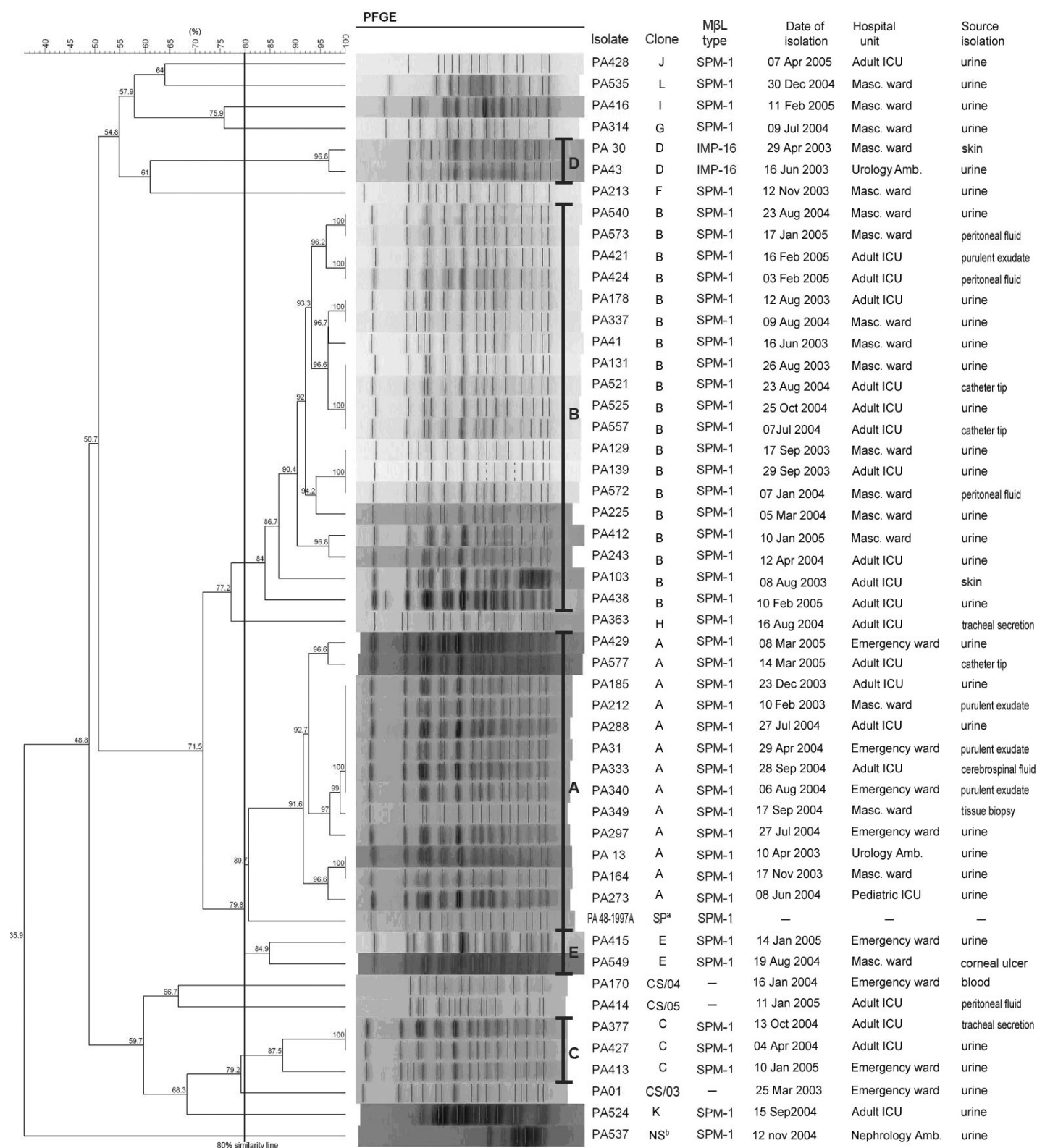


Figure 1 – Legend. PFGE patterns and dendrogram of MβL-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolates from the HU/AHC complex during March 2003 to March 2005. The scale represents percentages of similarity. The line in the dendrogram denotes the threshold 80% homology for defining groups of genetic similarity. Capital letters indicate clonal groups with $\geq 80\%$ homology. a, SP clone; b, non satisfactory PFGE profile; CS/03, CS/04, CS/05; three non-MβL-producing strains of *P. aeruginosa* from our hospital, representative of each study year.

Discussion

Pseudomonas aeruginosa isolated at the HU/AHC complex in the 2003–2005 period showed high rates of resistance to the majority of commercially available antipseudomonal drugs. Only the polymyxins showed consistent *in vitro* activity, and represented the only reasonable option for empirical treatment of severe infections caused by *P. aeruginosa*. Additionally, the C-CAZ-NS strains showed high rates of cross-resistance to other antimicrobial agents evaluated, including piperacillin-tazobactam, aztreonam, cefepime, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, and tobramycin. The intensive use of antimicrobial agents in the hospital setting may have favored the selection of MDR strains. However, this study did not evaluate the risk factors related to increased antimicrobial resistance.

Because an SPM-1-producing *P. aeruginosa* was detected at the HU in 2003⁷, we intended to assess the frequency of occurrence of this carbapenem resistance mechanism, as well as the current status of the MβLs-types in our institution. Among 141 C-CAZ-NS *P. aeruginosa* identified in our study, 47 (33.3%) were MβL-producers, suggesting that the production of this enzyme represents an important mechanism of carbapenem resistance in the HU/AHC complex. Even if this analysis includes the total number of *P. aeruginosa* studied (240 isolates) a worrisome rate of MβL occurrence is observed (19.5%), since there is evidence that implementation of infection-control measures for controlling the further spread of MβL-producing strains may not succeed in settings with rates of MβL-producing strains > 25%.³

An isolate of *P. aeruginosa* carrying *bla*_{SPM-1} gene was first described by Toleman et al. in 2002.²⁰ This is the most common MβL type in Brazil^{7,23}, and was also the most common MβL type found among our isolates (95.7%). As in other reports^{7,24,25}, the SPM-1-producing *P. aeruginosa* isolates assessed, in our study, also exhibited resistance to broad-spectrum cephalosporins and, aminoglycosides, and high levels of carbapenem resistance, with 9 isolates being pan-resistant (susceptible only to polymyxins), limiting the choices available for treatment of infections caused by this microorganism.

In contrast to other studies that reported that SPM-1-producing isolates frequently pertain to the same PFGE type or clonal group^{7,24,25}, our SPM-1-producing isolates belonged to 12 clonal groups. The majority of SPM-1-producing isolates (78.7%) were recovered from patients hospitalized in the MPW and ICUs of the HU, suggesting that these areas have an important role in the nosocomial spread of the MβL strains. Furthermore, we found different MDR patterns among SPM-1 isolates within the same clone. This probably

reflects different selective pressures and adaptations of the strains to areas or patient colonization.

SPM-1 producers have been reported as endemic in Brazilian territory because of the dissemination of SP clone⁷. This clone was previously documented in the early M β L-producer *P. aeruginosa* strain detected in our hospital⁷. In this study, we compared our M β L-producer isolates with SP clone strain and observed a close relatedness to the PFGE profiles of 13 isolates included in clone A, suggesting that the SP clone is also spreading in our hospitals.

In addition to the SPM-1-producing isolates, our study detected the presence of IMP-16 in southern Brazil. This strain has been previously found among *P. aeruginosa* isolated in Brasilia and São Paulo, two cities in different regions on the country.^{6,26} Here, the *bla*_{IMP-16} gene was detected in two isolates recovered from an outpatient seen at the AHC, and from another inpatient hospitalized in the HU. Although these isolates were recovered from non-related patients, they showed close genetic relatedness and were included in the same clone D.

Our study also verified the presence of one isolate that showed carbapenemase activity, but did not produce M β L or any amplification product using MBL primers. When tested for the presence of the *bla*_{GES} and *bla*_{KPC} genes, this isolate originated an amplification product with the GES primers. Unfortunately, this amplicon was not sequenced, and we could not confirm the detection of a possible GES with carbapenemase activity or a novel carbapenem resistance mechanism among our isolates. This possibility will be explored further.

In conclusion, we found a high level of antimicrobial resistance among the *P. aeruginosa* isolates obtained in the HU/AHC complex during the period studied. The relatively high rates of SPM-1-producing isolates probably contributed to the resistance to carbapenems, and may further represent a major determinant of dissemination and maintenance of an M β L endemic status in our hospitals. The presence of the two MBL-types, SPM-1 and IMP-16, coexisting in the same clinical setting indicates the necessity for continuous molecular surveillance to monitor the emergence of the novel M β L-types and to prevent the generalized spread of this powerful resistance mechanism in our institution.

Acknowledgements

We thank Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, for supplying the M β L control strains used in this study, and Janet W. Reid for revising the English text.

This study was supported by the Fundação Araucária, Paraná, Brazil (FA/PPSUS Convênio 375/2006) and by the PROAP/CAPES.

REFERENCES

1. Maltezou HC. Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents* 2009;**33**(5):405.e1-7.
2. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 2007;**74**(12):1686-1701.
3. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases; an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008; **21**(4):367-371.
4. Yong D, Ritchie R, Bell B, *et al.* A novel sub-group metallo- β -lactamase (M β L), AIM emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. 2007; *Abstr.47th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*, Chicago, IL.
5. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs, the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**:73-76.
6. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, *et al.* Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycosid-resistant gene *aac*(6')-Ib: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:4693-4702.
7. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**:669-702.
8. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*.14th edn. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.p.516-526.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: *Approved Standard-Ninth Edition M2-A9*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2006.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard-Seventh Edition M07-A7*. Clinical and Laboratory Standards, Wayne, Pa; 2006.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *19th informational supplement M100-S18*. Clinical and Laboratory Standards, Wayne, Pa; 2008.
12. Héritier C, Poirel L, Aubert D, Nordman P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolysing oxacilinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:268-273.
13. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, *et al*. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:40-43
14. Mendes RE, Kyiota KA, Monteiro J, *et al*. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:544-547.
15. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:195-191.
16. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; **41**:95-98.

17. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; **25**(10):847-851.
18. Tenover F, Arbeit R, Goering R, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:2233-2239.
19. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13** Suppl 3:1-46.
20. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**:673-679.
21. Smith ME, Hanson ND, Herrera VL, *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, Kpc-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*; **51**:711-714.
22. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analysis of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:622-632.
23. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**:57-61.
24. Carvalho APD, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DAP, Teixeira LM, Marques EA. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

- producing metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* 2006; **12**:103-108.
25. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from Southern Brazil. *Infection* 2007; **35**(6):457-460.
26. Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, *et al.* Bloodstream Infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*; Epidemiology, Microbiology, and Clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(1):388-390.

ARTIGO B**METALLO-B-LACTAMASE PRODUCTION AND CARBAPENEM NON-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: POTENTIAL FOR SILENT SPREAD.**

Floristher Elaine Carrara-Marroni; Renata Cristina Picão; Emerson José Venâncio; Ana Cristina Gales; Danilo Elias Xavier; Maria Cristina Bronharo Tognim; Jacinta Sanchez Pelayo.

Artigo em construção

Este artigo será enviado para periódico em forma de *Concise communication*

METALLO-B-LACTAMASE PRODUCTION AND CARBAPENEM NON-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: POTENTIAL FOR SILENT SPREAD.

Floristher Elaine Carrara-Marroni¹; Renata Cristina Picão²; Emerson José Venâncio³; Ana Cristina Gales²; Danilo Elias Xavier²; Maria Cristina Bronharo Tognim⁴; Jacinta Sanchez Pelayo⁵

Abstract

In this study we characterized two IMP-16-producing *P. aeruginosa* isolates non-resistant to carbapenems. Pa30 and Pa43 isolates carried the *bla*_{IMP-16} gene as a single cassette in a novel class-1 integron located in a 60Kb plasmid. Conjugation and transformation experiments failed to transfer pPa30 and pPa43. The same PFGE patterns were shared by Pa30 and Pa43 isolates indicating clonal origin. The isolates showed transcriptional level of *oprD* and *ampC* genes similar that Pa01, probably indicating normal expression of OprD and basal amounts of AmpC production. Transcriptional level of *mexD* and *mexY* of Pa30 and Pa43 isolates were significantly higher than that PA01, possibly indicating the MexCD-OprJ and MexXY hiperexpression. In addition, transcriptional levels of *bla*_{IMP} were similar among Pa30, Pa43 and PaIMP-18, a carbapenem-resistant isolate characterized in our laboratory. These findings are worrisome since *P. aeruginosa* carrying MβL-encoding genes may show carbapenem susceptibility, acting as reservoirs of such resistance determinants with potential for silent spread.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Carbapenem resistance. Metallo-beta-lactamases.

Introduction

In the last decades, different genes encoding acquired metallo-beta-lactamases (MβLs) have been reported in *Pseudomonas aeruginosa* from numerous geographic regions. To date, five families of MβLs, namely IMP, VIM, SPM, GIM and AIM, have been identified in *P. aeruginosa* (1, 2). These enzymes constitute the most clinically significant carbapenem resistance determinants in this species (3). However, a carbapenem susceptible *P. aeruginosa* clinical isolate that produced the MβL SPM-1 was recently noticed

¹ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Av. Robert Koch, 60. CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3371 2200; fax: +55 43 3337 5100; e-mail: floristherelaine@hotmail.com

² ALERTA Laboratory, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

⁵ Departments of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

in Brazil (4). Furthermore, three IMP-1-producing *P. aeruginosa* isolates showing imipenem susceptibility were detected in the same country (5). These findings are worrisome since *P. aeruginosa* carrying M β L-encoding genes may show carbapenem susceptibility, acting as reservoirs of such resistance determinants with potential for silent spread.

In the present study, we report 2 cases of infection with carbapenem non-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates producing the metallo- β -lactamase IMP-16. The expression of genes associated with carbapenem resistance was investigated, as well as the genetic context and support of the *bla*_{IMP-16} gene.

These cases were diagnosed in a complex of two teaching hospitals (HU and AHC), belonging to Universidade Estadual de Londrina, located in Southern Brazil.

Case report 1. On April 2003, a 24-year-old male patient victim of a traffic accident was admitted to the HU emergency room. He presented an open femur fracture and was submitted to femur osteosynthesis. He was hospitalized at the orthopedic ward for 74 days. After the surgical procedure, the patient received cephalotin 1g every 6 hours, gentamicin 80 mg every 12 hours and metronidazol 500 mg every 8 hours, for 31 days. A surgical wound infection was diagnosed on the 24th day of hospitalization and debridement of the necrotic tissue was performed. Antimicrobial therapy was empirically changed to vancomycin 500 mg every 6 hours (for 21 days) and ciprofloxacin 200 mg every 12 hours for 14 days. Culture of the necrotic tissue recovered three microorganisms: *P. aeruginosa* (Pa30), *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae*. Despite of inappropriate therapy according to the antimicrobial susceptibility testing, the infection was treated and the patient was discharged.

Case report 2. A 54 year-old male patient was admitted in the ambulatory of AHC for monitoring renal function and control of urinary tract infection (UTI). The patient had intermittent catheterization due to a neurogenic bladder caused by a spinal cord injury, reason why he had recurrent UTIs. The urine sample collected on June 2003 displayed leukocyturia of 5.100.000/mm³ with 3+ of bacteria. The patient received an empirical treatment with 160 mg trimethoprim (TMP) and 800 mg sulfamethoxazole (SMZ) every 6 hours for 14 days and was oriented to return in 15 days. Urine culture recovered *P. aeruginosa* (Pa43) with a count of 10⁷CFU/ml. When the patient returned, his antimicrobial therapy was changed to 500 mg levofloxacin every 12 hours, for 14 days. The next control urinary cultures were negative. Despite of inappropriate therapy according to the antimicrobial susceptibility testing, the infection was treated and the patient was discharged.

Characterization of *P. aeruginosa* clinical isolates Pa30 and Pa43.

Species identification and routine antibiogram of the Pa30 and Pa43 isolates were performed using the MicroScan Walkaway automated system (Dade Behring, West Sacramento, CA) with Combo negative CN30 Panels. Antimicrobials tested included piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, amikacin, gentamicin, tobramycin and ciprofloxacin. Susceptibility to aztreonam, ceftazidime, carbapenems (imipenem and meropenem) and polymyxins (polymyxin B and colistin) was simultaneously determined by the CLSI disk diffusion method (6). The MicroScan antibiogram showed that Pa30 and Pa43 isolates were only susceptible to aztreonam, polymyxins, piperacillin-tazobactam and carbapenems. Disk diffusion confirmed imipenem, meropenem and polymyxins susceptibility for both isolates (Table 1)

During the years 2003 and 2005, all ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates recovered in the microbiology laboratory of HU and AHC, were routinely screened for the production of carbapenemases using both Hodge test (7) and M β L phenotypic detection test by Disk-sinergy test and spectrophotometric assay (8, 9). Surprisingly, isolates Pa30 and Pa43 presented phenotypes that were suggestive of MBL production.

Susceptibility testing was subsequently determined by CLSI agar-dilution (10), and resistance to amikacin, ciprofloxacin, ceftazidime, cefepime was confirmed, as well as susceptibility to polymyxins and meropenem. However, the imipenem MICs increased to 8 μ g/ml, which is within the intermediate category of the current CLSI document (Table 1) (6).

Table 1 – Antimicrobial susceptibilities values obtained in different antimicrobial susceptibility methods for the *P. aeruginosa* isolates carrying bla_{IMP-16} gene.

<i>Method</i>	<i>Antimicrobial</i>	<i>Isolates</i>	
		<i>Pa30</i>	<i>Pa43</i>
<i>Microscan Walkaway automated method</i> MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Amikacin	>32	>32
	Aztreonam	≤ 8	≤ 8
	Cefepime	>16	>16
	Ceftazidime	>32	>32
	Ciprofloxacin	>2	>2
	Gentamicin	>8	>8
	Imipenem	$\leq 4^*$	$\leq 4^*$
	Piperacillin/Tazobactam	32	≥ 16
	Tobramycin	>8	>8
<i>E test- MβL</i> MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Imipenem	<4	<4
	Imipenem/EDTA	<1	<1
<i>E test</i> MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Meropenem	0.19	1
	Colistin	1.5	1.5
<i>Disk- Diffusion inhibition</i> zone diameter (mm)	Imipenem	18	22
	Meropenem	20	26
	Ceftazidime	10	0
	Aztreonam	26	27
	Polymyxin B	15	15
	Colistin	16	16
<i>Agar-Dilution</i> MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Imipenem	8*	8*
	Meropenem	1	1
	Ceftazidime	>64	>64
	Cefepime	32	32
	Ciprofloxacin	>8	>8
	Amikacin	>128	>128
	Polymyxin B	2	2

Interpretative criteria for each antimicrobial tested were those published by the CLSI (6)

MIC, Minimal Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/ml}$)

* Different Imipenem MICs obtained by MicroScan antibiogram and Agar –dilution methodology

The presence of MBL-encoding genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{SIM}, was performed by multiplex PCR, as previously described (11). Both Pa30 and Pa43 isolates presented an amplicon consistent with *bla*_{IMP} gene. PCR reactions targeting *bla*_{IMP} and the conserved sequences 5'CS and 3'CS of class 1 integrons were performed as described (12,13). Sequencing revealed that both isolates carried the *bla*_{IMP-16} gene as a single cassette in a novel class-1-integron. The corresponding integrase genes presented a weak P_c version (TGGACA-N17-TAAGCT) and an inactive P2 (Figure 1).

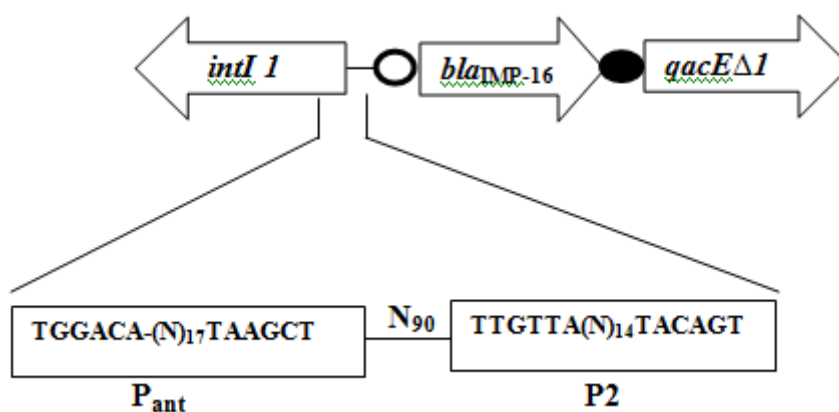


Figure 1 – Schematic representation of class-1-integron-containing clinical isolate *P. aeruginosa* Pa30 and Pa43. The novel integron carried *bla*_{IMP-16} as a single gene cassette. Arrows represent genes and their transcriptional direction. Open circle represent the *attI* site; filled circle represent the *attC* site (e.g. the 59-base element).

Plasmid extraction was performed by the Kieser method (14), using *Escherichia coli* NCTC50192 as positive control. Southern blot and hybridization using *bla*_{IMP-16} specific labeled probe (ECL direct nucleic acid labeling and detections system; GE Healthcare, Piscataway, NJ) revealed that *bla*_{IMP-16} was carried on a 60-kb plasmid in both Pa30 and Pa43. Conjugation experiments performed as described (15), failed. In addition, repetitive attempts to transfer pPa30 and pPa43 by transformation were unsuccessful, regardless of the recipient strain used, either *E. coli* TOP10 or *P. aeruginosa* PA01.

The genetic relatedness of Pa30 and Pa43 was evaluated by PFGE of SpeI-digested DNA samples (16), and results were interpreted according to the Tenover criteria (17). Pa30 and Pa43 shared the same restriction pattern, indicating their clonal origin.

We next analyzed the transcriptional levels of *oprD*, *ampC*, *mexB*, *mexD*, *mexF* and *mexY* genes, encoding the porin OprD, the chromosomal cephalosporinase AmpC, and constituents of the efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY-OprM, respectively. The transcriptional levels of clinical isolates were compared to

those observed in wild type *P. aeruginosa* PA01 reference strain. Transcriptional levels of *bla*_{IMP-16} in Pa30 and Pa43 were also evaluated, and results were compared to those obtained for *bla*_{IMP-18} from PaIMP-18, an IMP-18-producing *P. aeruginosa* previously characterized in our lab, that was fully resistant to carbapenems (MIC imipenem and meropenem > 64), ceftazidima (MIC>256) and cefepime (MIC>256) (18). Isolation of total RNA, cDNA synthesis and real-time PCR analysis were performed as previously described (19). The *rpsL* housekeeping gene coding for the ribosomal protein S12 was used as internal control.

Pa30 and Pa43 presented transcriptional levels of *oprD* similar to that of PA01 reference strain (Table 2), probably indicating normal expression of the OprD porin. Conversely, PaIMP-18 presented enhanced porin expression compared to PA01. Nevertheless, these results indicate that no MBL producer had porin loss contributing to the phenotype observed.

The analysis of *ampC* transcriptional levels showed that Pa30 and Pa43 probably produced basal amounts of AmpC enzyme (Table 2), whereas *ampC* transcriptional levels of PaIMP-18 were 109-fold higher than that of PA01, suggesting AmpC overproduction in that isolate.

Table 2 – Transcriptional levels of genes *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *ampC*, *oprD* and *bla*_{IMP} in clinical isolates of *P. aeruginosa*

Strains	Relative mRNA transcription level						
	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>	<i>oprD</i>	<i>ampC</i>	<i>bla</i> _{IMP} ^a
PA01(wt^b)	1	1	1	1	1	1	ND ^c
Pa30	4.5	1651	5.4	249	0.8	0.2	0.4
Pa43	1.9	2017	0.2	441	1.7	3.7	0.8
PaIMP-18	9.7	0.2	0.6	1.4	5.6	109	1

^a PaIMP-18 was used as reference strain,

^b wt- wild-type PA01 reference strain.

^c ND , not determined.

Transcriptional levels of *mexD* were significantly higher than that of PA01 in both Pa30 and Pa43, whereas PaIMP-18 presented increased transcriptional levels of *mexB*, possibly indicating MexAB-OprM overexpression. In addition, transcriptional levels of *bla*_{IMP} were similar among Pa30, Pa43 and PaIMP-18.

It has been previously observed that mutants hyperexpressing the MexCD-OprJ usually show imipenem hypersusceptibility (20). Although the mechanism involved in such phenotype is unknown, it is well established that it is not related to OprD loss or AmpC repression (21). In addition, it has been previously reported that ciprofloxacin may favor the selection of clinical isolates hyperexpressing MexCD-OprJ. In this study, the patients have received ciprofloxacin therapy previous to Pa30 and Pa43 recovery, which might have contributed to selection of such mutants.

Pa30 and Pa43 also showed higher transcriptional levels of *mexY* than PA01, possibly indicating MexXY-OprM hyperexpression, contributing to aminoglycosides and quinolones resistance observed.

In this study we have observed the occurrence of M β L-producing *P. aeruginosa* clinical isolates that were not resistant to carbapenems. Fortunately, despite of the inadequate therapy received, patients were not immunocompromised and had their infections treated.

Our results suggest that the expression of IMP-16 was not enough to confer high level resistance to carbapenems. In addition, the presence of a compensatory mechanism leading to imipenem hypersusceptibility among strains hyperexpressing MexCD-OprJ is probably enrolled in the phenotype observed. Our findings are worrisome since carbapenem non-resistant M β L producers might act as a silent reservoir of such resistance determinants, especially since *bla*_{IMP-16} was plasmid mediated.

REFERENCES

1. **Walsh, T. R.** 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr. Op. Infect. Dis.* **21**:367-371
2. **Young, D. R. Ritchie, B. Bell, R. Pratt, M.A. Toleman, and T.R. Walsh.** 2007. A novel sub-group metallo- β -lactamase (M β L), AIM emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Chicago, IL.
3. **Maltezou, H.C.** 2008. Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? 2008 Intern. J. of Antimicrob. Agents **33**(5):405e1-7
4. **Pellegrino, F.L.P.C., N. Casali, K.R.N. dos Santos, S. A. Nouér, É. M. D. Scheidegger, L.W. Riley, and B. M. Moreira.** 2006. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying *bla*_{SPM} metallo-beta lactamase detected in Rio de Janeiro. Brazil. *J. Chemother.* **18**(2):151-156.
5. **Martins, A.F., A.P. Zavascki, P.B. Gaspareto, and A.L. Barth.** 2007. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitais from Southern Brazil. *Infection.* **35**(6):457-460.
6. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement M-100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2009.
7. **Lee, K., Y.S.Lim, D. Yong, J.H.Yum and Y. Chong.** 2003. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Sinergy Test for Differentiating Metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. clin. Microbiol.* **41**(10): 4623-4629.
8. **Arakawa Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fugiwara, and M. Goto.** 2000. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol.* **38**:40-43.
9. **Héritier, C, L.Poirel, D.Aubert, and P. Nordman.** 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolysing oxacilinase OXA40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:268-273.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grown aerobically: Approved standard –seventh edition M07-A7, Wayne, PA, 2006.
11. **Mendes, R.E., K.A. Kyiota, J. Monteiro, M. Castanheira, S.S. Andrade, A.C. Gales, A.C. Pignatari, and S. Tuffic.** 2007. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* **45**:544-547

12. **Levesque, C., L. Piche, C. Laroseand, P. H. Roy.** 1995 PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:185-191.
13. **Siarkou. V.I., D. Vitti, E. Prontonotariou, A. Ikonomidis, and D. Sofianou.** 2009. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*_{VIM-17} metallo- β -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(4):1325-1330.
14. **Kieser, T.** 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**:19-36.
15. **Smith, M.E., N. D. Hanson, V. L. Herrera, J.A. Black, T.J. Lockhart, A. Hossain, J. A. Johansson, R. V. Goering, and K.S. Thomson.** 2003 Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, Kpc-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:711-714
16. **Poirel, L. M. Magalhães, M. Lopes, and P. Nordmann.** 2004. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1406-1409.
17. **Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P. A. Micklesen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.
18. **Xavier, D.E., A.C. Gales, R.E Mendes, A.C.C. Pignatari, L. Santos Filho, L.F. Cirilo, M. Castanheira.** 2006. IMP-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): inceasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. 46th **ICAAC-Interscience Conference on Antimicrobial Agents abnd Chemotherapy**, San Francisco, CA, Abstract C2-419.
19. **Dumas, J. L., C. Van Delken, K. Perron, and T. Köler.** 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:217-225.
20. **Wolter, D.J., J. A. Black, P. D. Lister, and N. D. Hanson.** 2009 Multiple genotypic changes in hipersusceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients do not always correlate with the phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:294-300.
21. **Wolter, D. J., N. D. Hanson, and P. D. Lister.** 2005. AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the *mexCD-OprJ* efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(11):4763-4766.

CONCLUSÕES

Altas taxas de resistência aos antimicrobianos foram verificadas entre os isolados de *P. aeruginosa* estudados. Os resultados de sensibilidade aos antimicrobianos obtidos para os isolados clínicos de *P. aeruginosa* sugerem a utilização da polimixina B e da colistina como antimicrobianos de escolha para o tratamento das infecções sérias por este agente nos hospitais estudados.

Aproximadamente 1/5 dos isolados clínicos estudados foram produtores de M β L indicando que estas enzimas constituem importantes determinantes de resistência aos β -lactâmicos entre os isolados de *P. aeruginosa* recuperados no HU/AHC.

A alta frequência de detecção do gene *bla*_{SPM-1} entre os isolados produtores de M β L sugere que este determinante de resistência exerce um papel importante na disseminação e manutenção intra-hospitalar de um possível estado endêmico de resistência aos carbapenêmicos.

A presença de dois clones predominantes entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L sugere a transmissão cruzada como o principal mecanismo de disseminação destes isolados nos hospitais estudados. Entretanto, a detecção de isolados produtores de M β L com diversidade genotípica indica que a pressão seletiva exercida pela utilização de antibióticos também deve ocorrer.

A presença do clone SP em 1/4 dos isolados produtores de M β L recuperados de pacientes internados em diferentes setores do HU indica que o clone epidêmico brasileiro encontra-se disseminado neste hospital.

A co-existência de duas sub-classes de M β L, SPM-1 e IMP-16, no mesmo ambiente hospitalar demonstra a necessidade para a contínua vigilância da detecção destas enzimas a fim de monitorar e prevenir a disseminação de novos tipos de M β L no HU/AHC.

A detecção de M β L em isolados clínicos de *P. aeruginosa* não resistentes aos carbapenêmicos alerta aos laboratórios de microbiologia para a pesquisa destas enzimas entre isolados não resistentes a estas drogas. Além disso, enfatiza a importância de uma rigorosa adesão às medidas de controle de infecção preconizadas a fim de reduzir o risco de transferência destes genes crípticos de resistência.

ANEXOS

ANEXO A

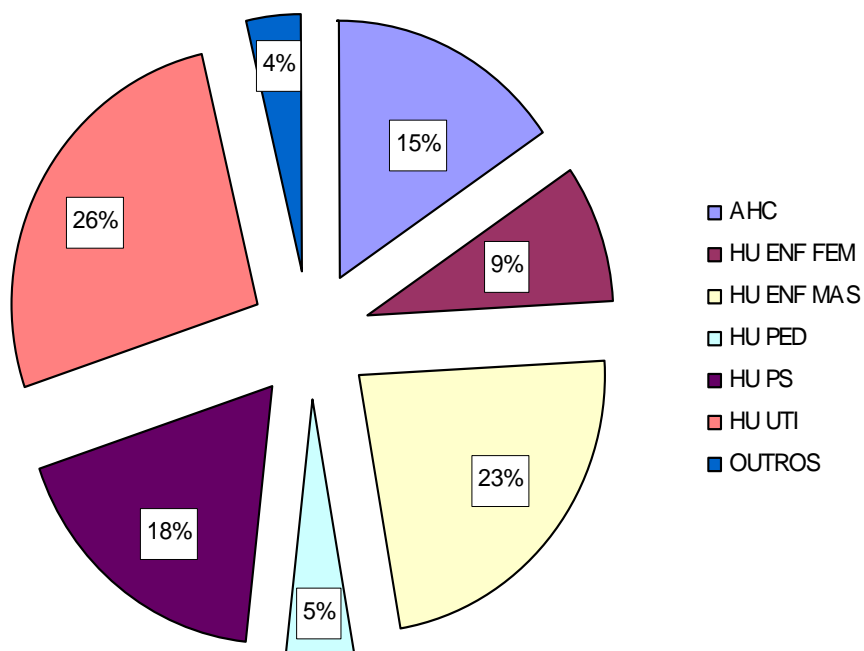


Figura 1 – Distribuição por Unidade Hospitalar dos 240 isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados no Laboratório de Microbiologia Clínica do HU, no período de março de 2003 a março de 2005.

AHC	Ambulatório do Hospital das Clínicas
HU ENF FEM	Enfermaria Feminina do HU
HU ENF MASC	Enfermaria Masculina do HU
HU PED	Pediatria do HU
HU PS	Pronto-Socorro do HU
HU UTI	UTIs do HU
OUTROS	Setores de Hemodiálise, Quimioterapia e Enfermaria de Moléstias Infecciosas.

ANEXO A (continuação)

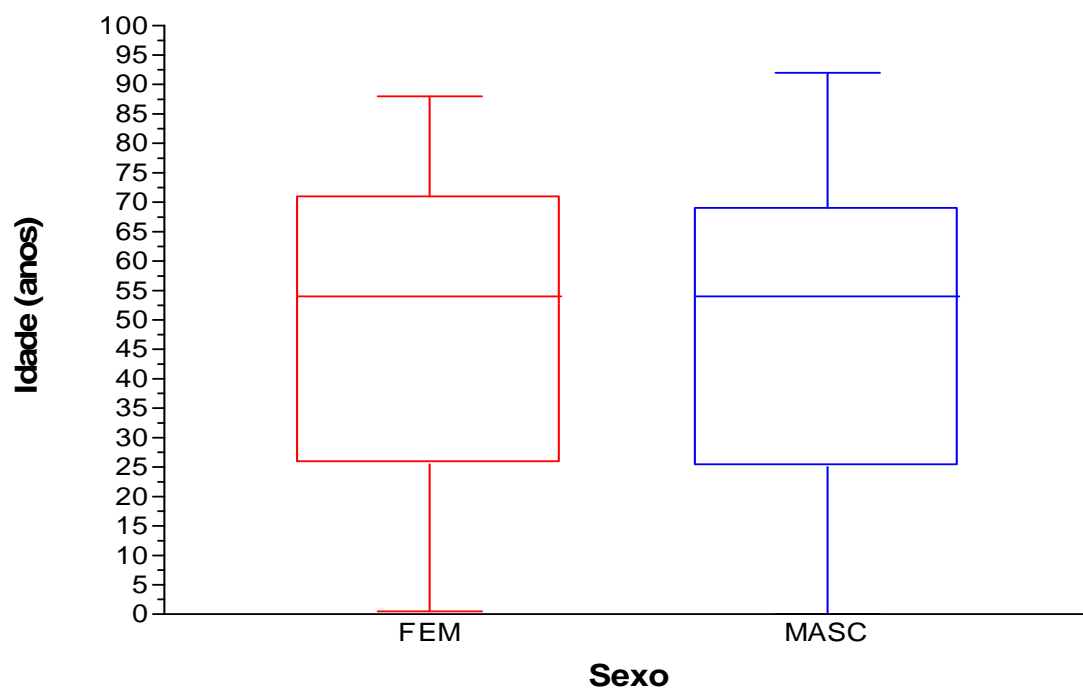


Figura 2 - Distribuição dos 240 pacientes portadores de *P. aeruginosa* por sexo e idade em anos. A idade média apresentada pelos pacientes de ambos os sexos foi de 54 anos.

ANEXO B

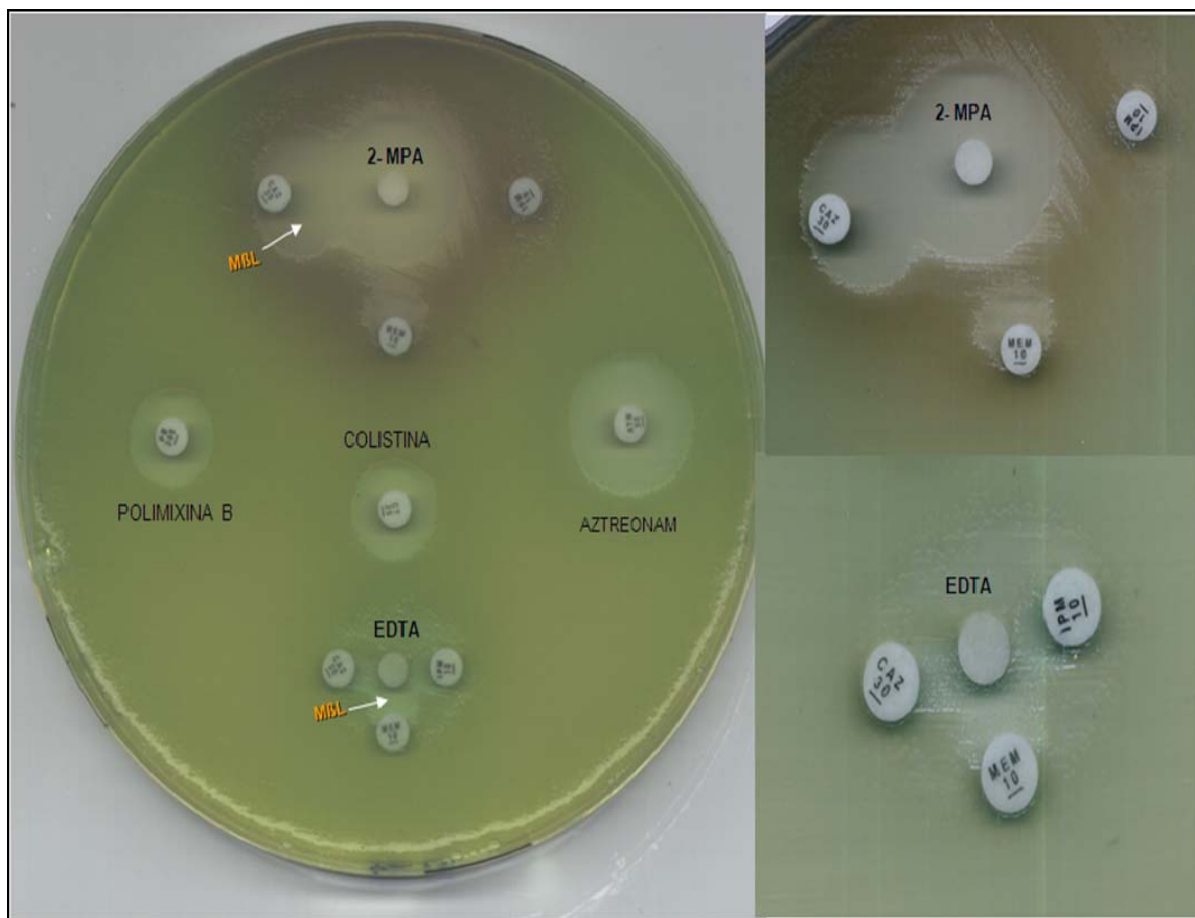


Figura 1 - Teste de Disco Aproximação utilizando três substratos (ceftazidima, imipenem, meropenem) para um isolado de *P. aeruginosa* produtor de MBL. Notar a distorção do halo de inibição dos antimicrobianos imipenem, ceftazidima e meropenem, na presença dos inibidores EDTA e ácido 2- mercapto propiônico (2-MPA).

ANEXO B (Continuação)

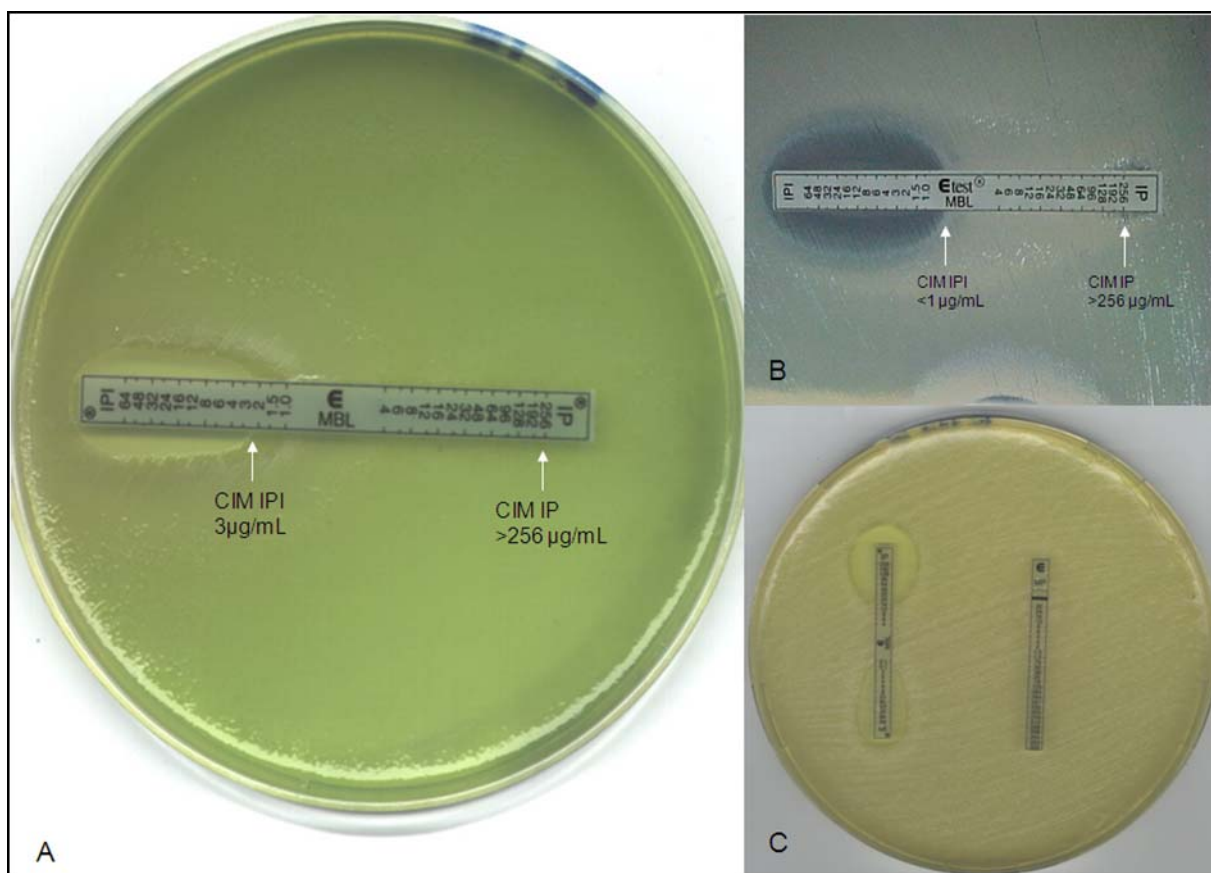


Figura 2 – E test para detecção de isolados clínicos produtores de MβL. As setas nas figuras indicam as CIM para o Imipenem (IPM) e Imipenem+ EDTA (IPI). Observar que nos isolados positivos a CIM para IP tem três ou mais diluições de diferença que a CIM para IPI.

ANEXO C

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes que codificam MBL por **PCR Multiplex** segundo Mendes et al (2007).

Genes MBL	Oligon.	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-1- gen F1 ^a IMP-1- gen F2 ^a	GAATAGRRTGGTTAAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATC	188
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-gen-F2 ^b VIM-gen-R2 ^b	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-1-F1 SPM-1-R1	CTAAATCGAGACCCTGCTTG CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798
<i>bla</i> _{GIM-1}	GIM -1-F1 GIM -1-R1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC CGGAACGACCATTGAATGG	72
<i>bla</i> _{SIM-1}	SIM-1-F1 SIM-1-R1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGAG	300
16S	16S-8F 16S1493-R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1499

^a primers genéricos para detecção de genes que codificam as MBL da família IMP

^b primers genéricos para detecção de genes codificadores as MBL da família VIM

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes que codificam GES e KPC β- lactamases.

Genes MBL	Oligon.	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto Esperado (pb)	Referência
<i>bla</i> _{GES}	GES-gen-F1 GES-gen-R1	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	846	Wang et al, 2007
<i>bla</i> _{KPC}	Kpc-1F Kpc-1R	GCTACACCTAGCTCCACCTTC GCATGGATTACCAACCACTGT	380	Yigit et al, 2001

ANEXO C (Continuação)

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação e sequenciamento do gene *bla_{SPM-1}* e do integron contendo o gene *bla_{IMP}*

Oligon.	Sequência (5' - 3')	Alvos para sequenciamento	Referência
SPM-1-F SPM-1-R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	Amplificação e sequenciamento do gene <i>bla_{SPM.1}</i>	Toleman et al, 2002
IMP-gen-F IMP-gen-R	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCT CCAAACYACTASGTTATCT	Amplificação e sequenciamento do gene <i>bla_{IMP}</i>	Ellington et al, 2007
IMP-1-F IMP-1-R	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG GAACAACCAGTTTTGCCTTACC	Amplificação e sequenciamento do gene <i>bla_{IMP}</i>	Poirel et al, 2007
5'CS IMP-gen-R	GGCATCCAAGCAGCAAG CCAAACYACTASGTTATCT	Amplificação e sequenciamento do(s) gene(s) entre 5'CS e <i>bla_{IMP}</i>	Levesque et al, 1995 Ellington et al, 2007
IMP-gen-F 3'CS	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC AAGCAGACTTGACCTGA	Amplificação e sequenciamento do(s) gene(s) entre <i>bla_{IMP}</i> e 3'CS	Ellington et al, 2007 Levesque et al, 1995
INT-F IMP-R	CGTTCATACAGAAAGCTG CCAAACYACTASGTTATCT	Amplificação e sequenciamento do(s) gene(s) entre <i>intl</i> e <i>bla_{IMP}</i>	Siarkou et al, 2009 Ellington et al, 2007
IMP-R QacR	CCAAACYACTASGTTATCT CGGACTTCAGCTTTTGAAGG	Amplificação e sequenciamento do(s) gene(s) entre <i>bla_{IMP}</i> e <i>qacEΔ1</i>	Ellington et al, 2007 Siarkou et al, 2009
IMP-R Sul-R	CCAAACYACTASGTTATCT CCGACTTCAGCTTTTGAACG	Amplificação e sequenciamento do(s) gene(s) entre <i>bla_{IMP}</i> e <i>sulI</i>	Ellington et al, 2007 Siarkou et al, 2009

ANEXO D

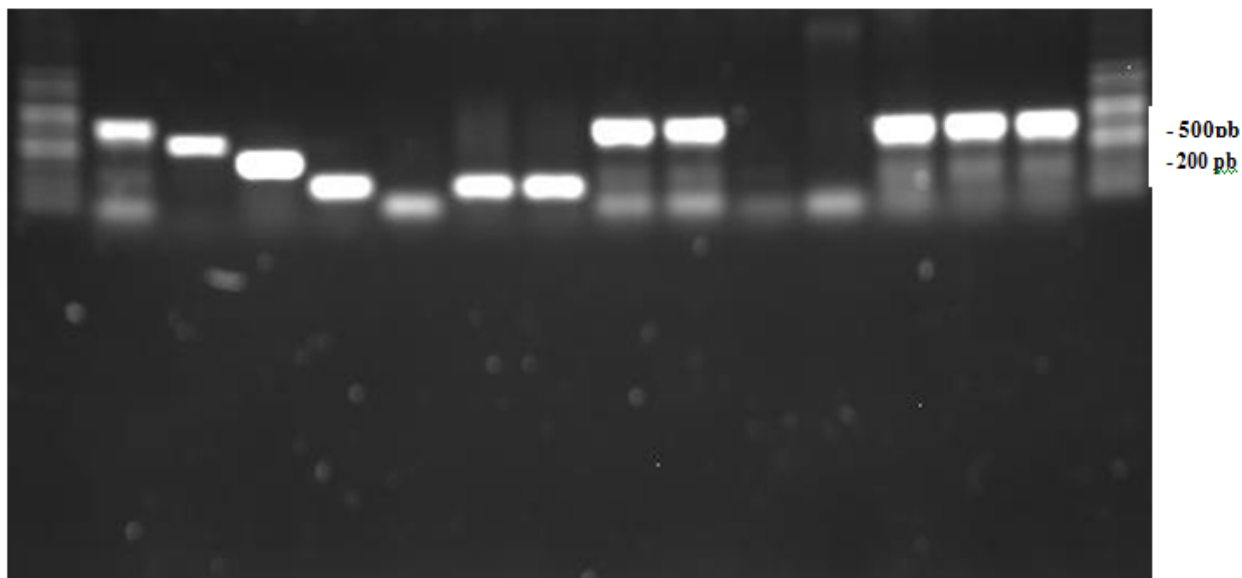


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação da reação de PCR multiplex para detecção da presença dos genes codificadores de MβL entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* C/CAZ- NS.

1- DNA *Ladder* 100pb (Invitrogen); **2**- amplicon de SPM-1 (798 pb; cepa controle- *P. aeruginosa* 48-1997a; **3**- amplicon de SIM-1 (569 pb; cepa controle – *A. baumannii* 03-9-T104); **4** - amplicon de VIM (382 pb- *P. aeruginosa* 7-406); **5**- amplicon de IMP (188 pb-controle- *P. aeruginosa* 7-406); **6** – amplicon de GIM (72 pb- controle- *P. aeruginosa* 73-5671); **7**- isolado Pa30 (produtor de IMP-16, genótipo D); **8**- isolado Pa43 (produtor de IMP-16, genótipo D); **9** isolado Pa13 (produtor de SPM-1, genótipo A); **10**- isolado Pa 41 (produtor de SPM-1, genótipo B); **11**- isolado Pa1 (não produtor de MβL); **12**- isolado Pa170 (não produtor de MβL); **13**- isolado Pa377(produtor de SPM-1, genótipo C); **14** - isolado Pa549, genótipo E); **15**, isolado Pa213 (produtor de SPM-1, genótipo H); **16** DNA *Ladder* 100pb (Invitrogen).

ANEXO E – Características dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de MβL

Isolado	Data de Isolamento	Unidade Hospitalar	Material Clínico	MβL	Clone PFGE	MIC (μg/ml)		
						IPM	MEM	POL B
Pa13	10/04/2003	Ambulatório Urologia	Urina	SPM-1	A	256	256	2
Pa30	29/04/2003	Enfermaria Masculina	Biópsia tecido	IMP-16	D	8	1	2
Pa31	29/04/2003	Pronto Socorro	Exudato Purulento	SPM-1	A	128	128	2
Pa41	16/06/2003	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	128	128	2
Pa43	16/05/2003	Ambulatório Urologia	Urina	IMP-16	D	8	1	0.5
Pa103	08/08/2003	UTI	Biópsia tecido	SPM-1	B	256	256	2
Pa129	17/09/2003	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	256	256	1
Pa131	26/08/2003	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	256	256	1
Pa139	29/09/2003	UTI	Urina	SPM-1	B	256	256	1.5
Pa164	17/11/2003	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	A	128	128	1
Pa178	12/08/2003	UTI	Urina	SPM-1	B	256	256	1
Pa185	23/12/2003	UTI	Urina	SPM-1	A	128	64	1
Pa212	10/02/2004	Enfermaria Masculina	Exudato Purulento	SPM-1	A	128	64	1
Pa213	12/11/2003	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	F	128	128	1

ANEXO E (Continuação)

Isolado	Data de Isolamento	Unidade Hospitalar	Material Clínico	M β L	Clone PFGE	MIC (μ g/ml)		
						IPM	MEM	POL B
Pa225	05/03/2004	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	512	256	1
Pa243	04/12/2004	UTI	Urina	SPM-1	B	64	128	2
Pa273	08/06/2004	UTI Pediátrica	Urina	SPM-1	A	64	64	2
Pa288	27/07/2004	UTI	Urina	SPM-1	A	128	128	2
Pa297	27/07/2004	Pronto Socorro	Urina	SPM-1	A	128	128	2
Pa314	09/07/2004	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	G	63	128	2
Pa333	28/09/2004	UTI	Liquor	SPM-1	A	256	256	2
Pa337	09/08/2004	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	128	128	1
Pa340	08/06/2004	Pronto Socorro	Exudato Purulento	SPM-1	A	128	128	2
Pa349	17/09/2004	Enfermaria Masculina	Biópsia Tecido	SPM-1	A	256	128	1
Pa363	16/08/2004	UTI	Secreção Traqueal	SPM-1	H	128	64	2
Pa377	13/10/2004	UTI	Secreção Traqueal	SPM-1	C	128	128	2
Pa412	03/05/2004	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	64	64	2

ANEXO E (Continuação)

Isolado	Data de Isolamento	Unidade Hospitalar	Material Clínico	M β L	Clone PFGE	MIC (μ g/ml)		
						IPM	MEM	POL B
Pa413	10/01/2005	Pronto Socorro	Urina	SPM-1	C	128	128	1
Pa415	14/01/2005	Pronto Socorro	Urina	SPM-1	E	64	64	2
Pa416	11/02/2005	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	I	64	64	2
Pa421	16/02/2005	UTI	Exudato Purulento	SPM-1	B	256	128	1
Pa424	29/04/2003	Pronto Socorro	Líquido Peritoneal	SPM-1	B	256	256	1
Pa428	03/07/2005	UTI	Urina	SPM-1	J	512	256	1
Pa 427	04/03/2005	UTI	Urina	SPM-1	C	256	128	1
Pa429	08/03/2005	Pronto Socorro	Urina	SPM-1	A	256	256	1
Pa438	10/02/2005	UTI	Urina	SPM-1	B	128	128	2
Pa521	23/08/2004	UTI	Ponta de Cateter	SPM-1	B	128	128	1
Pa524	15/09/2004	UTI	Urina	SPM-1	K	256	256	2
Pa525	25/10/2004	UTI	Urina	SPM-1	B	512	512	1

ANEXO E (Continuação)

Isolado	Data de Isolamento	Unidade Hospitalar	Material Clínico	M β L	Clone PFGE	MIC(μ g/ml)		
						IPM	MEM	POL B
Pa535	30/12/2004	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	L	512	512	2
Pa537	12/11/2004	Ambulatório Nefrologia	Urina	SPM-1	Não tipável	256	256	1
Pa540	23/08/2004	Enfermaria Masculina	Urina	SPM-1	B	256	256	2
Pa549	19/08/2004	Enfermaria Masculina	Ponta de Cateter	SPM-1	E	256	256	1
Pa557	07/07/2004	UTI	Urina	SPM-1	B	256	256	1
Pa572	01/07/2004	Enfermaria Masculina	Líquido Peritoneal	SPM-1	B	128	128	2
Pa573	17/01/2005	Enfermaria Masculina	Líquido Peritoneal	SPM-1	B	128	128	2
Pa577	14/03/2005	UTI	Ponta de Cateter	SPM-1	A	256	256	1