

ANA PAULA RANGEL TAKANO BALAN

Epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras
de metallo- β -Lactmases isoladas de pacientes no Hospital São
Paulo em 2004.

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção
de título de Mestre em Ciências Básicas em
Doenças Infecciosas.

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PAULA RANGEL TAKANO BALAN

Epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metallo- β -Lactmases isoladas de pacientes no Hospital São Paulo em 2004.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari
Universidade Federal de São Paulo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Gales
Universidade Federal de São Paulo

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof^a Dra Emilia Inoue Sato

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof^o Dr. Ricardo Sobie Diaz

São Paulo

2007

ANA PAULA RANGEL TAKANO BALAN

Epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras
de metallo- β -Lactmases isoladas de pacientes no Hospital São
Paulo em 2004.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^o Dr Alexandre Rodrigues Marra

Prof^a Dra Elza Mamizuka

Prof^o Dr Lauro Santos Filho

Prof^a Dra Marinês Dalla Valle Martino

TAKANO, Ana Paula Rangel Balan

Epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metallo- β -Lactamases isoladas de pacientes no Hospital São Paulo em 2004. Ana Paula Rangel Takano Balan – São Paulo, 2007.xvii, 64f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: *Pseudomonas aeruginosa* carrying Metallo- β -Lactamase: a molecular epidemiology study.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo- β -lactamase, Multi resistência e carbapenems.

*“Os homens perdem a saúde para tentar juntar
dinheiro e
depois perdem dinheiro tentando recuperar a saúde,
vivem como
se nunca fossem morrer e morrem como se nunca
tivessem vivido ”*

Dalai Lama

*“Não seria justo começar os meus agradecimentos e
você não sendo a primeira pessoa a qual eu tenho
muito a agradecer. Você para mim sempre vai ser um
exemplo de pessoa, e por toda a minha vida vou me
espelhar em você
Mãe muito obrigada!”*

*“Quero agradecer aos meus pais Roberto e Dora
(in memoriam), por me mostrarem o verdadeiro
sentido da vida, a qual muitas pessoas ainda não
tiveram o prazer de conhecer”*”

*"Quero agradecer o meu marido Antonio pelo seu
companheirismo durante esses anos que foram tão
difíceis para mim."
Obrigada!*

*“Meu filho você é tão pequenininho mas já tenho
tanto para te agradecer. Que eu consiga ser para você
só um pouquinho do que você é para mim.
Te amo meu querido.”*

*“Quero agradecer ao meu orientador Prof. Antônio
Carlos Campos Pignatari pelo seu voto de
confiança e por toda a sua dedicação.”*

Agradecimentos

À Deus pela minha existência e por sempre abrir em minha vida novas oportunidades, para que nunca eu desista de viver.

À minha co-orientadora Prof^a. Ana Cristina Gales, por sua orientação, ensinamentos e dedicação.

À Mariana Castanheira e Rodrigo Mendes, pelos ensinamentos tão bem passados ao longo deste período de ALERTA/LEMC.

A minha Tia Léa e a minha prima Daniela por todo amor que vocês tem por mim e pelo meu filho. Amo vocês!

Aos meus queridos amigos Kelly Aline, Paulo Bispo, Rodrigo Cayô e a Patrícia Oliveira muito obrigada pela calorosa hospedagem. Meninas vou sentir muitas saudades das nossas risadas noturnas.

Aos que estão sempre em ALERTA, por todas as experiências trocadas ao longo destes anos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório Especial de Microbiologia, pelas alegres conversas nos momentos de descontração, e por me mostrarem o lado bom da vida.

À secretária Rosana Capecce, por toda a sua ajuda e por suas palavras de incentivos, em horas de angústia. Valeu Rô!

À Luciana Cirilo, sem o seu trabalho jamais teria conseguido dar início e ter terminado este trabalho. Obrigada!

As três mosqueteiras Andreinha, Fernanda Marques e Jussimara, pelas deliciosas conversas descontraídas e por inúmeras risadas juntas. Andreinha é das tentativas que se vive; Fer existe vida após a morte; e Jussi ainda vou ter um casaco igual ao seu. Adoro vocês!

Aos meus amigos e amigas, Alinne Guimarães (ímpar), Andréia Penteadó (Loira), Danilo (Canadense), Fernanda Inouê (Troçinho), Renata Picão (Rave), Rodrigo Cêyo (Pombinha), Kátia Kiyota (Japa doida) e Kelly (baiana arretada) por vocês serem meus verdadeiros amigos, cada um com característica muito diferente do outro, mas todos vocês estarão marcados por toda a minha vida. Obrigada!

Aos professores e funcionários de Disciplina de Doenças Infecciosas da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP.

Este trabalho foi realizado com auxílio técnico e científico do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

S mario

1-Introdu�o	1
1.1-Bacilos gram-negativos	1
1.1.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2-Sensibilidade aos β -lactâmicos	4
1.3-Mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em <i>P. aeruginosa</i>	4
1.3.1-Alterac�o das proteínas ligadoras de Penicilinas (PBPs)	5
1.3.2-Bomba de efluxo	6
1.3.3-Alterac�o de proteínas de membrana externa	7
1.3.4-Produc�o de β -lactamases	8
1.3.4.1-Cefalosporinases cromossomais	9
1.3.4.2- β -lactamases de espectro ampliado em <i>P. aeruginosa</i>	10
1.4-Epidemiologia de β -lactamases pertencentes � classe B ou metalo- β - lactamase	11
1.5-Contexto genético das M β L adquiridas.....	14
1.6-Integrans de classe 1.....	15
2-Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3-Materiais e Métodos.....	20
3.1-Selecc�o das amostras	20
3.3-Reac�o de Cadeia Polimerase – PCR.....	21
3.4-Reac�o de seqüenciamento e interpreta�o dos resultados	22
3.5-Tipagem Molecular	23

3.5.1-Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE	23
4-Resultados.....	25
4.1-Amostras bacterianas	25
4.2-PCR e Seqüenciamento	25
4.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	27
4.4. Análise Epidemiológica.....	31
5-Discussão.....	39
6-Conclusões	46
7- Referências Bibliográficas.....	47
8-Resumo.....	63
9-Abstract.....	64

Lista de Abreviaturas

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

NNIS – *National Nosocomial Infection Surveillance System*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

ESBLs – *Extended spectrum β -lactamases*

OMP – *Outer membrane protein*

PBPs – *Penicilin binding proteins*

M β L – *Metalo- β -lactamase*

UFC – *Unidades formadoras de colônia*

EDTA – *Ácido etileno-diamino-tetracético*

CS – *Conserved sequence*

PCR – *Polimerase chain reaction*

G – *Guanosina*

PFGE – *Pulsed field gel electrophoresis*

IEF – *Isoelectric focusing*

IS – *Insertion sequence*

59-be – *59 base element*

UTI - *Unidade de terapia intensive.*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Unidade de internação, mês e sítio de isolamento, e perfil de PFGE dos 36 isolados contendo *bla*_{SPM-1} de *P. aeruginosa* em pacientes internados no Hospital São Paulo no período de Janeiro a Dezembro de 2004.....34

Tabela 2. Unidade de internação, mês e sítio de isolamento, e perfil de PFGE dos 9 isolados contendo *bla*_{IMP-1} de *P. aeruginosa* em pacientes internados no Hospital São Paulo no período de Janeiro a Dezembro de 2004.....37

Tabela 3. Tabela demonstrativa com amostras de *P. aeruginosa bla*_{IMP-1}, de seis pacientes internados no Hospital São Paulo, no período de Janeiro a Dezembro de 2004.....38

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura esquemática de integron de classe 1.....16
- Figura 2.** Representação esquemática de P_{ant} e P2 encontrados em integrons.....17
- Figura 3.** Prevalência de amostras produtoras de metallo- β -lactamase (MBL).....26
- Figura 4.** - Resultados obtidos pela técnica PFGE das 36 amostras bacterianas positivas para SPM-1.....28
- Figura 5.** Resultados obtidos pela técnica PFGE das 9 amostras bacterianas positivas para IMP-1.....30
- Figura 6.** Proporção dos diferentes isolados de *P. aeruginosa* obtidos em amostras clínicas de pacientes internados no Hospital São Paulo.....32

1-Introdução

1.1-Bacilos gram-negativos

Os bacilos Gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) são bactérias aeróbias, não esporuladas, que se caracterizam por não utilizarem carboidratos como fonte de energia. A maioria destes microorganismos é capaz de metabolizar os carboidratos pela via oxidativa e, por isso, são também denominados oxidativos ou sacarolíticos. Os microorganismos que não utilizam carboidratos pela fermentação ou oxidativamente, são referidos como bioquimicamente inertes ou não oxidativos (Cross *et al.*, 1983; Koneman *et al.*, 2001).

Os BGN-NF de importância clínica constituem um grupo extremamente diverso e podem ser divididos, de forma geral, de acordo com suas características metabólicas principais, como a reação de oxidase positiva e capacidade de oxidar a glicose (Koneman *et al.*, 2001).

Nos últimos anos tem sido observada maior incidência de bacilos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de espectro ampliado no ambiente hospitalar. Esse padrão de resistência bacteriano ocasiona um maior uso de antibióticos betalactâmicos potentes, como os carbapenens (Quinteira *et al.*, 2005). Atualmente esses agentes são importantes opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções nosocomiais.

A maior utilização de carbapenens no ambiente hospitalar acaba por ocasionar maior pressão seletiva sobre a microbiota dos pacientes hospitalizados, o que favorece a seleção de subpopulações de microorganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses

antimicrobianos. Atualmente, amostras bacterianas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* resistentes à grande maioria dos agentes antimicrobianos e sensíveis somente à polimixina B, têm sido isoladas pelos laboratórios de microbiologia clínica em diversos hospitais brasileiros. (Gales *et al* 2001)

1.1.1-*Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo (BGNNF) não fermentador da glicose que pode ser isolado do solo, da água, das plantas e mesmo dos animais, incluindo os seres humanos (Gales *et al*, 2001). Fatores tais quais a habilidade de utilizar uma grande variedade de substratos orgânicos como fontes de carbono, a excepcional habilidade de colonizar nichos ecológicos diversos, nos quais a oferta de nutrientes é limitada, e a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos contribui para as características ubiqüitárias apresentadas pelas amostras de *P. aeruginosa* (Pollack, 1984). Ocasionalmente, essa espécie bacteriana é patogênica para as plantas e animais.

Raramente a *P. aeruginosa* causa infecções comunitárias em indivíduos saudáveis, entretanto, essa espécie bacteriana assume importante papel como agente etiológico de infecções hospitalares. Na maioria dos casos, o processo infeccioso tem início com algum tipo de alteração ou destruição de barreiras físicas entre as quais se evidenciam as utilizações de cateter urinário, sonda oro-traqueal, realização de cirurgias, pacientes que sofreram queimaduras e pacientes que fazem uso de drogas imunossupressoras (Lee *et al*, 1999; Pollack *et al*, 1984).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas pela *P.aeruginosa* são limitadas e incluem penicilinas com atividade anti-*Pseudomonas*, cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam, carbapenens e fluoroquinolonas, particularmente a ciprofloxacina (Carmeli *et al.*, 1999 a). Os aminoglicosídeos são freqüentemente utilizados em regimes combinados aos β -lactâmicos na tentativa de potencializar a atividade antimicrobiana e de evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana.

Além da *P. aeruginosa* ser intrinsecamente resistente a diversos agentes antimicrobianos comumente utilizados, esse microrganismo é altamente adaptável às condições adversas, desenvolvendo resistência durante a terapia. O risco da emergência de resistência parece variar de acordo como o agente antimicrobiano utilizado, e evidências mostram que a terapia combinada pode reduzir o risco de falha terapêutica devido à seleção de mutantes resistentes (Carmeli *et al.*, 1999 a., Carmeli *et al.*, 1999b).

1.2-Sensibilidade aos β -lactâmicos

Nos últimos anos têm-se observado maior frequência quanto ao isolamento de *P. aeruginosa* resistentes a cefalosporinas de amplo espectro, ocasionando assim, maior uso de β -lactâmicos mais potentes, tais como os carbapenêmicos (Quinteira *et al*, 2005).

A maior utilização de carbapenens no ambiente hospitalar leva a maior pressão seletiva sobre a flora microbiana, e nos dias atuais recuperam-se isolados clínicos de *P. aeruginosa* demonstrando sensibilidade somente as Polimixinas (Poirel & Nordmann, 2002).

1.3-Mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa*

Em um estudo publicado em 2001, foram avaliadas amostras de *P. aeruginosa* isoladas de cinco regiões geográficas distintas (Ásia-Pacífico, Canadá, Europa, América Latina e Estados Unidos), o qual demonstrou que as taxas de resistência encontradas na América Latina são muito elevadas em relação as demais regiões. Isolados de *P. aeruginosa* da América Latina apresentaram menores taxas de sensibilidade à ceftazidima e cefepima. Segundo os Dados do Programa SENTRY (Sader *et al*, 2001) 30,2% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Brasil foram resistentes aos carbapenens; e em pacientes hospitalizados nas unidades de terapia intensiva essas taxas de resistência foram ainda maiores.

Em um estudo realizado por Carmeli e colaboradores, constatou-se que para o tratamento das infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* verificou-se um grande aumento no uso de cefalosporinas, o qual vem sendo

acompanhado por um aumento na prevalência de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado que são conhecidas como ESBLs. As amostras produtoras dessas enzimas são resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e a outros agentes da classe dos β -lactâmicos. (Carmelli *et al*; 1998 e Carmelli *et al*; 1999 a)

A perda de expressão reduzida de proteínas de membrana externa, conhecidas como porinas, a hiperexpressão de bomba de efluxo, as alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e a produção de β -lactamases são os diferentes mecanismos de resistência aos β -lactâmicos descritos em *P. aeruginosa*.

1.3.1-Alteração das proteínas ligadoras de Penicilinas (PBPs)

A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, devido as alterações a alterações nas PBPs, é mais comum em microrganismos gram-positivos que em gram-negativos. Entretanto, apesar de pouco freqüentes, as alterações nas PBPs já foram reportadas em isolados clínicos de *P.aeruginosa* (Godfrey *et al.*, 1981, Gotoh *et al.*, 1998).

As proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) são carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática que atuam em uma etapa importante da estruturação do peptideoglicano das bactérias, catalisado a transpeptidação entre duas subunidades de mureína. O peptideoglicano é um constituinte essencial da parede celular bacteriana (Spratt & Cromie, 1988). Essas proteínas são denominadas numericamente de acordo com o peso molecular que apresentam, quanto maior o peso molecular menor a numeração que

recebem. Nos bacilos gram-negativos são descritas oito PBPs com características diferentes: -1a, -1b, -2, -3, -4, -5, -6, -7 e -8 (Noguchi *et al.*, 1979, Tuomanem & Schwatz, 1987).

As PBPs são os sítios-alvo para a atividade dos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos que se ligam covalentemente a essas estruturas, impedindo a formação da parede celular e causando a lise osmótica da célula

1.3.2-Bomba de efluxo

Outro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos frequentemente reportado em espécies de *Pseudomonas* está associado a presença de bomba de efluxo (Livermore, 2001). Os genes que codificam a bomba de efluxo são constituintes normais do genoma bacteriano e, portanto, fornecem para o microrganismo o potencial intrínseco de desenvolver um fenótipo de resistência sem a aquisição de novos genes (Hasdemir *et al.*, 2004).

As proteínas que compõem o sistema de efluxo são proteínas específicas codificadas por genes cromossômicos ou plasmidiais que através da extrusão de vários antimicrobianos, como tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, eritromicina e β -lactâmicos contribui para a resistência intrínseca e adquirida da *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 1994).

Os sistemas de efluxo são normalmente formados por proteínas de membrana especializadas, que podem ser divididas de acordo com sua função: (i) bomba de efluxo da membrana externa ou citoplasmática; (ii) proteína formadora do canal extrusor na membrana externa; (iii) proteína de fusão que liga os outros dois componentes da bomba de efluxo (Nikaido, 1994).

Em *P.aeruginosa* quatro principais sistemas de efluxo já foram descritos MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM, contudo pelo menos cinco outros sistemas aguardam caracterização (Livermore, 2002).

O sistema MexAB-OprM é o sistema que tem mais expressão e contribui para a extrusão de uma grande variedade de β -lactâmicos (Li *et al.*, 2003). O sistema MexCD-OprJ é responsável mais especificamente pela extrusão das cefalosporinas de quarta geração, como cefepima e cefpiroma (Gotoh *et al.*, 1998, Pole *et al.*, 1996). Não há evidências de que os sistemas MexEF-OprN e MexXY-OprM contribuam diretamente para o efluxo de β -lactâmicos (Aires *et al.*, 1999. Masuda *et al.*, 2000).

1.3.3-Alteração de proteínas de membrana externa

As proteínas capazes de formar canais constituídos de água no seu interior permitindo a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana são conhecidas como proteínas de membrana externa (OMP) também conhecidas como porinas (Nikaido, 1994). A perda ou a diminuição da expressão dos genes que codificam as OMPs causam a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do antimicrobiano, o que pode conferir resistência aos β -lactâmicos (Quinn *et al.*, 1988). Diferentes porinas podem ser encontradas na membrana das amostras de *P. aeruginosa*, como OprF, OprC, OprD e OprE. A OprF, é a mais abundante, e provavelmente a mais utilizada pela maioria dos β -lactâmicos (Fung-Tomc *et al.*, 1995, Huang & Hancock, 1996, Livermore, 2001).

1.3.4-Produção de β -lactamases

Em amostras de *P. aeruginosa* a produção de β -lactamases é o mecanismo com maior prevalência e com maior importância. (Laraki *et al.*, 1999). As penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens podem ser hidrolisados por vários membros da família das β -lactamases, e a interação entre essas enzimas e seus substratos resultam em compostos inativos que permitem a sobrevivência da célula bacteriana (Bush, 2001).

Entre as amostras de *P.aeruginosa*, a produção aumentada de AmpC, as ESBLs e as metalo- β -lactamases desempenham papéis importantes na resistência a antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por esse agente (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

Ao longo dos anos vem se tentando estabelecer uma classificação para essas enzimas, entre elas, duas classificações têm sido consideradas como de maior importância: a de AMBLER e a de BUSH-JACOBY-MEDEIROS. (Ambler, 1980, Bush *et al.*, 1995).

A classificação de AMBLER foi proposta com base na estrutura molecular das β -lactamases, de acordo com a seqüência de aminoácidos. Somente quatro classes moleculares principais de β -lactamases foram descritas: A) β -lactamases de espectro ampliados (ESBL), penicilinases e carbenicilinases; B) metalo- β -lactamases; C) cefalosporinas cromossomais; D) oxacilinases.

Já na classificação de BUSH descrita em 1989, foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima. Em 1995, houve uma atualização na classificação que

combina características estruturais e funcionais das β -lactamases. (Bush *et al.*, 1995)

1.3.4.1-Cefalosporinases cromossomais

As β -lactamases do grupo funcional 1 ou da classe molecular C, chamadas cefalosporinases cromossomais ou AmpC, são encontradas constitutivamente em amostras de *P. aeruginosa* e nas enterobactérias. Na ausência de β -lactâmicos, a β -lactamase AmpC é normalmente produzida em baixos níveis, mas, na presença de β -lactâmicos indutores como, por exemplo, cefoxitina e imipenem, passam a ser produzidas em grande quantidade. O grau de indução depende do β -lactâmico indutor e, em alguns casos, a produção dessa enzima pode aumentar de 100 a 1000 vezes (Lodge & Piddock, 1991). Quando esses antimicrobianos indutores são retirados do meio, a produção enzimática pode voltar a níveis basais que, normalmente, são baixos. Entretanto, essa produção pode permanecer em níveis extremamente altos mesmo após a retirada do indutor.

Em amostras de *P. aeruginosa*, a expressão do gene AmpC leva à produção de β -lactamases indutivas, podendo também originar mutantes que passam a produzir essas β -lactamases constitutivamente em grandes quantidades. 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} /UFC. Os mecanismos de indução e desrepressão têm sido amplamente estudados em enterobactérias, principalmente em *Enterobacter cloacae*.

Entretanto mecanismos regulatórios similares aos encontrados em enterobactérias regulam também a expressão da β -lactamase AmpC em *P. aeruginosa* (Bagge *et al.*, 2000). O gene AmpC está sob o controle regulatório de outros genes designados como AmpR, AmpD e AmpG. Mutações ou deleções no gene AmpD resultam na hiperexpressão de ampC. Poucos casos de isolados com mutações em AmpR que apresentam a hiperexpressão de AmpC foram descritos em *P. aeruginosa* (Langae *et al.*, 2000, Normark, 1995).

1.3.4.2- β -lactamases de espectro ampliado em *P. aeruginosa*

As β -lactamases de espectro ampliado inibidas pelo ácido clavulânico pertencem majoritariamente à classe A de AMBLER e estão distribuídas no grupo 2 de BUSH-JACOBY-MEDEIROS. Conferem resistência a diversas cefalosporinas de amplo espectro. Desde o início da década de 1980 essas enzimas passaram a ser freqüentemente identificadas em membros da família das *Enterobacteriaceas*, no entanto apenas recentemente as ESBLs vêm sendo descritas em amostras de *P. aeruginosa* (Medeiros, 1997).

As ESBLs encontradas em amostras de *P. aeruginosa*, reportadas até o momento, são: TEM e SHV, que são bastante comuns em diferentes membros de enterobactérias; PER, principalmente originária de amostras da Turquia; VEB, encontrada em amostras oriundas do Sul da Ásia e, mais recentemente, os tipos IBC e GES, que têm sido descritos em isolados da França, Grécia e África do Sul entre outros países. Essas enzimas são remotamente relacionadas do ponto de vista genético, no entanto, elas compartilham o

mesmo perfil bioquímico de hidrólise e inibição pelos diferentes compostos da classe dos β -lactâmicos. Devido aos genes que codificam essas enzimas terem sido encontrados até o momento em um limitado número de regiões geográficas, acredita-se que, pelo menos na maioria dos casos, esses genes tenham um nicho ecológico específico (Weldhagen *et al.*, 2003).

Estudos recentes indicam que a disseminação desses genes podem ter um importante papel na resistência aos antimicrobianos e que isso pode limitar as escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções graves causadas por amostras de *P. aeruginosa* produtoras de ESBLs (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

1.4-Epidemiologia de β -lactamases pertencentes à classe B ou metalo- β -lactamase

As M β LS são β -lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby que hidrolisam todos β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam, aztreonam (Bush, 1998). Estas enzimas caracterizam-se por apresentarem a mesma estrutura tridimensional, necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica, e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com estes íons (Murphy *et al.*, 2003).

Adicionalmente, estas enzimas são inibidas por EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) ou compostos derivados do ácido tiolático (ex.: ácido 2-mercaptopropiônico) e não são inibidas por inibidores de serino- β -lactamases

disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Bush *et al.*, 1995). Estas enzimas são produzidas intrinsecamente por determinados patógenos, tais como *Stenotrophomonas maltophilia* (Crowder *et al.*, 1998, Avison *et al.*, 2001, Spencer *et al.*, 2001), *Bacillus cereus* (Thompson & Malamy, 1990), *Chryseobacterium meningosepticum* (Rossolini *et al.*, 1998), *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* (Simm *et al.*, 2001) e *Aeromonas spp.* (Walsh *et al.*, 1998, Massidda *et al.*, 1991, Walsh *et al.*, 1996)

Contudo, desde o início da década de 90, novos genes que codificam MβLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, tais como *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.*, e em membros da família *Enterobacteriaceae* (Riccio *et al.*, 2000, Poirel *et al.*, 2000, Yan *et al.*, 2001). Estes novos genes que codificam MβLs estão inseridos em estruturas genéticas que acabam por fornecer mobilidade ao gene, sendo então conhecidos como MβLs móveis ou também MβLs adquiridas. Atualmente são conhecidas cinco sub-classes de MβL adquirida, IMP (imipenemase) (Osano *et al.*, 1994), VIM (Verona imipenemase) (Lauretti *et al.*, 1999), SPM (São Paulo metalo-β-lactamase) (Toleman *et al.*, 2002), GIM (German imipenemase) (Castanheira *et al.*, 2004) e, mais recentemente, SIM-1 codificada pelo gene *bla_{SIM-1}* detectado em sete amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas de um hospital terciário em Seul, Coréia (Lee *et al.*, 2005)

O primeiro relato de MβL adquirida, ocorreu em 1994 (Osano *et al.*, 1994), que descreveu uma nova sub-classe denominada IMP-1. Esta enzima foi encontrada em uma cepa clínica de *Serratia marcescens* isolada no Japão, a qual apresentava fenótipo de resistência a imipenem e cefalosporinas

de amplo espectro. Desde então, novas variantes desta sub-classe foram relatadas em diferentes microrganismos isolados em diferentes regiões geográficas (Chu *et al.*, 2001, Mendes *et al.*, 2004c, Riccio *et al.*, 2000, Toleman *et al.*, 2003, Da Silva *et al.*, 2002, Docquier *et al.*, 2003, Iyobe *et al.*, 2000, Iyobe *et al.*, 2002, Yano *et al.*, 2001)

Em 1999, a segunda sub-classe de M β L descrita foi denominada VIM-1. A presença desta enzima foi observada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em Verona, Itália (Lauretti *et al.*, 1999). As enzimas pertencentes à sub-classe VIM apresentam menor número de variantes até então descritas, bem como distribuição concentrada em determinadas regiões geográficas, quando comparadas a aquelas pertencentes à sub-classe IMP.

As variantes de VIM foram encontradas tanto em microrganismos fermentadores de glicose quanto naqueles não fermentadores. Estas enzimas (VIM) são mais prevalentes na Europa, região onde foi originariamente encontrada em 1999 (Laraki *et al.*, 1999). Posteriormente, houve diversos relatos destas enzimas em microrganismos isolados em países da Comunidade Européia (Bahar *et al.*, 2004, Poirel *et al.*, 2001, Poirel *et al.*, 2000, Patzer *et al.*, 2004, Prats *et al.*, 2002, Walsh *et al.*, 2003). No entanto, as variantes de VIM também foram relatadas na Ásia (Yum *et al.*, 2002, Yan *et al.*, 2001), e mais recentemente nos EUA (Toleman *et al.*, 2004), Chile e Venezuela (Mendes *et al.*, 2004a)

A terceira sub-classe de M β L adquirida, SPM-1, foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa*, recuperada em 1997 do trato urinário de um paciente hospitalizado no Hospital São Paulo/UNIFESP (São Paulo, SP). Essa enzima parece estar especificamente relacionada à espécie de *P.*

aeruginosa, uma vez que, até então, não foi encontrada em demais patógenos nosocomiais. (Castanheira *et al.*, 2004, Poirel *et al.*, 2004, Gales *et al.*, 2003a). Mais recentemente, foi descrita uma nova sub-classe de M β L adquirida em amostras de *P. aeruginosa* provenientes de Dusseldorf, Alemanha, denominada GIM-1 (Castanheira *et al.*, 2004).

1.5-Contexto genético das M β L adquiridas

As M β L adquiridas são codificadas por genes cassetes localizados tanto no cromossomo quanto em plasmídios bacterianos. No entanto, com exceção da enzima SPM-1 (Toleman *et al.*, 2002, Poirel *et al.*, 2004), as demais M β L adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons (Walsh *et al.*, 2003, Mendes *et al.*, 2004a, Toleman *et al.*, 2003, Patzer *et al.*, 2004, Mendes *et al.*, 2004c).

Embora a grande maioria dos integrons encontrados em isolados clínicos pertence à classe 1, existe atualmente duas outras classes distintas de integrons (i.e. classe 2 e 3). Membros das três classes possuem seus respectivos *intl1*, *intl2* e *intl3*, os quais codificam integrases que compartilham similaridade entre 40 a 60%. A classe 1 tem sido extensivamente estudada e os membros desta classe foram originalmente classificados como integrons. A classe 2 constitui-se de uma estrutura genética encontrada em Tn7 (transposon) e elementos relacionados, porém esta classe é composta por uma integrase defeituosa e incapaz de promover a mobilização de genes cassetes. A classe 3 é composta de um único exemplo até hoje descritos (Collis *et al.*, 2002, Bennett, 1999).

1.6-Integrans de classe 1

Integrans de classe 1 são elementos genéticos constituídos de i) uma região conservada 5' (5'-CS), formada por um gene *intl1*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*attI1*); e ii) uma região conservada 3' (3'-CS) (Figura 1). Esta última região é geralmente composta do *qacEΔ1* conjugado ao *sul1*, sendo que estes genes codificam resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente (Collis & Hall, 1992, Collis *et al.*, 1993, Collis & Hall, 1995, Recchia & Hall, 1997, Bennett, 1999, Partridge *et al.*, 2000).

Logo à montante do *intl1*, integrans apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos genes cassetes inseridos entre as regiões conservadas 5' e 3' (Partridge *et al.*, 2002). Esta região é formada por um promotor denominado Pant, constituído por duas seqüências de seis bases nas posições -35 e -10, respectivamente, sendo estas intercaladas por 17-bp. Variações destas seqüências já foram encontradas e podem ocasionar diferenças na expressão gênica (Stokes & Hall, 1989) (Figura 2).

Alguns integrans de classe 1 podem também apresentar um segundo promotor, localizado a 119-bp à jusante de Pant. Este segundo promotor foi criado em virtude do acréscimo de três bases guanosinas (G) entre as posições -35 e -10, ocasionando o correto espaçamento de 17-bp entre as posições -35 e -10, criando assim P2 (Collis & Hall, 1995) (Figura 2).

Assim como diferentes promotores apresentam diferenças na expressão gênica, a posição onde o gene cassete encontra-se inserido entre a região conservada 5' 3' também influencia sua expressão. Experimentos evidenciaram

que a expressão dá-se de forma mais eficiente a medida que o gene cassette encontra-se mais próximo à região promotora. Sendo assim genes localizados nas primeiras posições serão efetivamente melhores expressos (Collis & Hall, 1995).

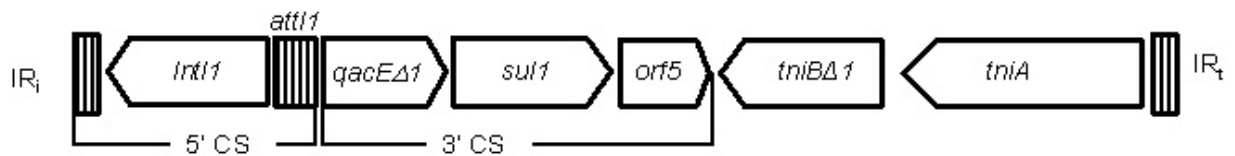


Figura 1. Estrutura esquemática de integron de classe 1. IR representam terminais de repetição invertidos. A região conservada 5' consiste de Int11 e o sítio de inserção att11. A seta dos respectivos genes indica a direção de sua transcrição. A região conservada 3' consiste dos genes qacEΔ1 e sul1, seguido de orf5 de função desconhecida e tni módulo.

Entre as regiões conservadas 5' e 3', integrons podem apresentar quantidade variável de genes cassetes que são inseridos e extraídos pela *Int1* codificada pelo *Int1*. Genes cassetes usualmente codificam para resistência bacteriana; no entanto, é importante salientar que o maior número de genes de resistência encontrado provavelmente deve estar associado ao maior interesse em pesquisar genes de resistência, uma vez que esta mobilização genética acontece de forma aleatória. (Bennett, 1999, Recchia & Hall, 1997)

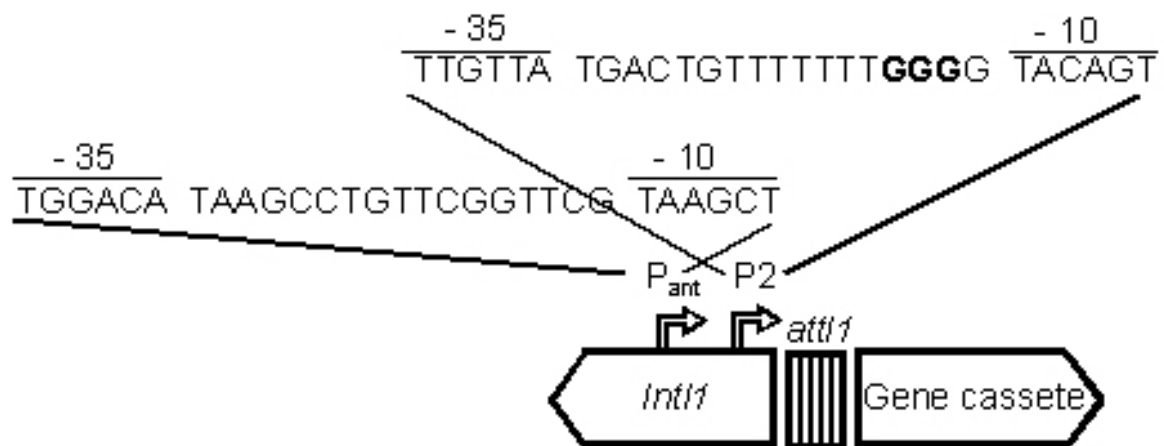


Figura 2. Representação esquemática de P_{ant} e P2 encontrados em integrons. Os Gs em negrito representam a inserção ocorrida entre as regiões -35 e -10 e acabaram por criar P2.

Genes cassetes têm normalmente entre 500–1000-bp (pares de base) e são constituídos de dois componentes funcionais, um gene, responsável pela codificação de alguma proteína, e um sítio de recombinação, sendo este último conhecido como 59-elementos de base (59-be). Estes genes não possuem promotor, sendo portanto, tanto o evento de expressão gênica quanto de

mobilização, dependentes do integron ao qual o gene cassete encontra-se inserido (Collis & Hall, 1992, Collis *et al.*, 1993).

A integrase, enzima codificada pelo *intI1*, é uma recombinase sítio-específico e possui como substrato preferencial dois sítios de ação, um na porção do 59-be, pertencente ao gene cassete, e outro no receptor do gene cassete ou *attI1* localizado no integron (Collis & Hall, 1995, Partridge *et al.*, 2000). Usualmente as reações de recombinação ocorrem entre *attI1* (localizado no integron) e 59-be (localizado no gene cassete); no entanto, também foram demonstradas, em eventos experimentais, reações entre *attI1* e *attI1*, 59-be e 59-be, mas com frequência bastante reduzida (Collis & Hall, 1992, Collis *et al.*, 1993).

2-Objetivos

2.1 Objetivo Geral

◆ Avaliar a prevalência de metallo- β -Lactamases em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo no ano de 2004.

2.2 Objetivos Específicos

- ◆ Caracterizar molecularmente os genes de metallo- β -Lactamase nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa*;
- ◆ Analisar a similaridade genética entre as amostras produtoras de metallo- β -lactamase;
- ◆ Avaliar a distribuição clonal das amostras isoladas de pacientes internados nas diversas unidades do Hospital São Paulo.

3-Materiais e Métodos

3.1-Seleção das amostras

Foram selecionadas as 10 primeiras amostras consecutivas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems isoladas de diferentes sítios, uma amostra bacteriana por paciente internado no Hospital São Paulo nos meses de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2004.

3.2-Teste de hidrólise de carbapenêmicos

O teste de hidrólise teve como objetivo principal à detecção da atividade enzimática em amostras resistentes aos carbapenems. Depois de isoladas as amostras, 10 colônias foram inoculadas em 10mL caldo de TSB com 4 µg/mL de imipenem. Os tubos ficaram incubados na estufa a 37°C por 18 horas sob agitação.

A suspensão bacteriana foi transferida para um tubo cônico e passou por uma centrifugação de 15 minutos à 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de Solução de Hidrólise (Tris-HCL 1mM e ZnSO₄ 1mM). As amostras suspensas foram ultrasonicadas com 4 ciclos de 30 segundos e o produto sonicado foi transferido para tubo de microcentrífuga e, então, centrifugado por 3 minutos à 4°C e 13.000 rpm. O sobrenadante transferido para um novo tubo e as amostras mantidas no gelo até o momento do ensaio.

Para a Solução de hidrólise foi preparada uma solução de antimicrobiano, no caso imipenem ou meropenem. Quando colocada em espectrofotômetro, esta solução teve uma absorbância de aproximadamente 1,5 a 2 unidades onde foi utilizando um comprimento de 299 nm. Para o teste, colocou-se 1000 μ l desta solução em uma cubeta de quartzo onde foram adicionados 50 a 100 μ l do extrato bruto de β -lactamase. A diferença entre a absorbância inicial e a final medida por 2 minutos indica a presença de atividade enzimática contra os carbapenems.

3.3-Reação de Cadeia Polimerase – PCR

As reações de PCR foram realizadas, inicialmente, para a detecção de *bla*_{SPM-1} em amostras de PSA resistentes aos carbapenems detectadas pela técnica de hibridização. Para detecção de *bla*_{SPM}, os primers utilizados foram: SPM1F 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' e SPM1R 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'.

As amostras bacterianas foram cultivadas em Ágar nutriente contendo de 4 a 10 μ g/mL de Imipenem, posteriormente ao crescimento bacteriano, uma suspensão de colônias de cada amostra foi preparada em um tubo de microcentrífuga contendo 200 μ L de água deionizada. Esta suspensão teve como utilização direta para reação de PCR. Em fluxo laminar, foram preparadas as misturas master para cada reação contendo: água deionizada, solução tampão com MgCl₂ 1,5mM, NH₄ 50mM e Tris-HCL 10mM [pH 9,0], 2 μ L de desoxinucleotídeo trifosfato (0,5 μ L de cada um: dATP, dTTP, dGTP e dCTP), primers e 2,5 unidades/L de Taq DNApolimerase. A mistura master esteve

mantida em aproximadamente 4° C durante seu preparo e, após uma leve agitação e transferidos 45 µL para cada tubo de amplificação, contendo 5 µL da suspensão celular. As condições de amplificação do DNA específicas para cada um dos primers utilizados. Após amplificação do DNA, para a revelação do produto amplificado, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% e visualização sob luz ultravioleta.

3.4-Reação de seqüenciamento e interpretação dos resultados

Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose com o kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O DNA obtido passou por um processo de quantificação por espectrofotometria e, então, quantidades necessárias foram submetidas à reação preparatória para o seqüenciamento, com o kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, EUA). As reações de seqüenciamento foram realizadas no aparelho ABI PRISM 310 - Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências de DNA obtidas e as seqüências protéicas derivadas foram analisadas utilizando o programa Lasergene Software Package (DNASTAR, EUA) e então submetidas à comparação com bases de dados de nucleotídeos disponíveis na Internet FASTA e BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.5-Tipagem Molecular

3.5.1-Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE

As amostras ficaram incubadas de 18- 24 horas em 10 mL de caldo TSB, após a qual foram centrifugadas por 20 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante desprezado e o precipitado, contendo as células bacterianas, diluído em 1 mL de solução salina, homogeneizado e transferido para tubo de microcentrífuga previamente pesado. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante removido. Após minuciosa homogeneização da mistura, 40 μ L destas foram transferidas para outro tubo, onde havia contidos 300 μ L de tampão TEN (Tris 100 mM, pH 7.5, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM), e nestes acrescentaram 340 μ L de agarose de baixo ponto de fusão, colocados em moldes para a formação de blocos de gel.

Depois de solidificados, os blocos foram incubados a 37o C, por 10 - 12 horas em solução EC (Tris 6 mM pH 6,5, NaCl 1 M, EDTA 0,01 M, Brij 58 0,5%, Sarcosil 0,5% e Deoxicolato de sódio 0,2%). A solução de EC havia sido removida e substituída por 2 ml de solução ES (EDTA 0,4 M pH 9,3 e Sarcosil 10%) contendo 1 mg/mL de proteinase K 20 mg/mL, com incubação de 12 horas a 50o C. Posteriormente ao tratamento com proteinase K foram realizadas as quatro lavagens com CHEF-TE (Tris 0,1 M pH 7,5, EDTA 0,1 M), de 30 a 60 minutos. Os blocos foram armazenados em CHEF-TE. O DNA bacteriano contido nos blocos de agarose foi submetido a clivagem com Spe I, a 37o C por 12-18 horas, de acordo com instruções do fabricante.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, em TBE 0,5x (Tris 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M), no sistema CHEF-DR III (Bio Rad Laboratories, EUA) à temperatura de 130 C e utilizando corrente elétrica de 200 volts e 6 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio 0,08 µL/ml e fotografado em sistema Polaroid® sob iluminação ultravioleta.

A análise dos perfis eletroforéticos foi realizada por comparação visual, e o critério para interpretação destes perfis foi de considerar como idênticas, ou seja, pertencentes a um mesmo clone ou subtipo, amostras que apresentarem todas as bandas no perfil migratório iguais. As amostras que apresentarem diferenças do perfil de até seis bandas foram consideradas semelhantes (subtipos) e pertencentes a um mesmo clone. As amostras que apresentaram sete ou mais bandas discordantes foram consideradas amostras (Tenover et al., 1995).

3.6- Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes

Os pacientes foram classificados quanto a unidade de internação no Hospital São Paulo e mês de isolamento. Para as amostras produtoras de IMP-1 foram estudados dados obtidos do prontuário médico: uso prévio de carbapenêmicos e evolução clínica.

4-Resultados

4.1-Amostras bacterianas

Das 120 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo entre o período de Janeiro a Dezembro de 2004, 75 (62.5%) apresentaram resultado negativo no teste de hidrólise para detecção da produção de metallo- β -lactamase. As 45 amostras restantes apresentaram hidrólise de ambos os carbapenens testados (imipenem e meropenem) nos testes espectrofotométricos, e para essas amostras foram realizados a caracterização molecular para detecção dos genes de M β L.

4.2-PCR e Seqüenciamento

Dentre as 45 amostras positivas fenotipicamente para a produção de M β L, 36 (80.0%) eram produtoras de SPM-1 e 9 (20.0%) eram produtoras de IMP-1, conforme mostrado na Figura 3. O seqüenciamento dos fragmentos de DNA obtidos nas reações de PCR confirmou a presença de *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1} nas amostras avaliadas. A seqüência de DNA demonstra que *bla*_{IMP-1} está localizada na primeira posição da classe 1 integron de 3.0 kb. Entretanto, como esperado, a detecção por PCR de integron foi negativa nas amostras *bla*_{SPM-1}

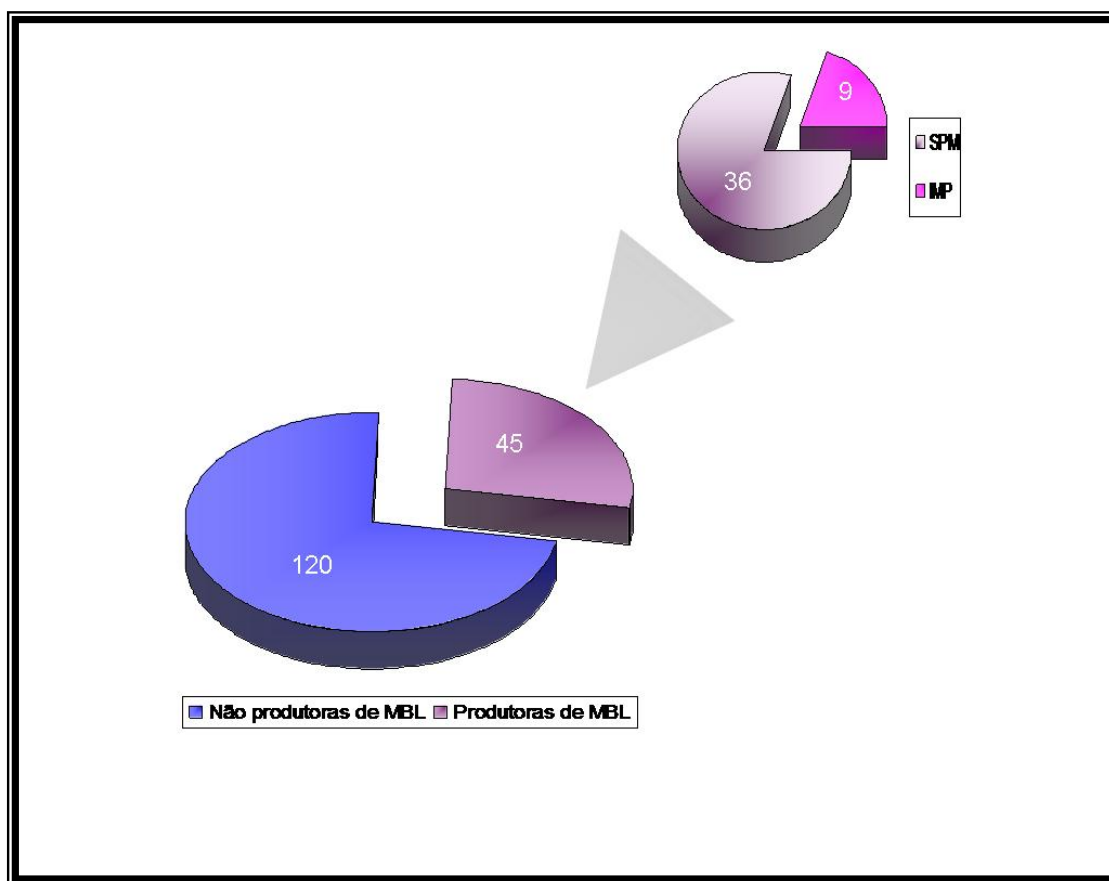


Figura 3. Prevalência de amostras produtoras de metallo- β -lactamase (MBL) entre as amostras resistentes aos carbapenens isoladas no Hospital São Paulo no ano de 2004.

4.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Para as amostras produtoras de bla_{SPM-1} e bla_{IMP-1} foi realizado o PFGE para a análise da similaridade genética. Segundo os princípios de Tenover, entre os 36 isolados de metallo- β -lactamase, a SPM-1 apresentou maior variabilidade genética. Foram encontradas três distintos padrões de maior importância: O padrão A de PFGE foi encontrado em 26 isolados, sendo eles 6 subtipos distintos, entre A2 (n=16) e A1 (n=5) os mais freqüentes, enquanto o padrão B foram encontrados em 9 isolados sendo três subtipos diferentes, B3 (n=4), B2 (n=3) e B1 (n=2) e em apenas um isolado foi encontrado padrão PFGE C.(Figura 4).

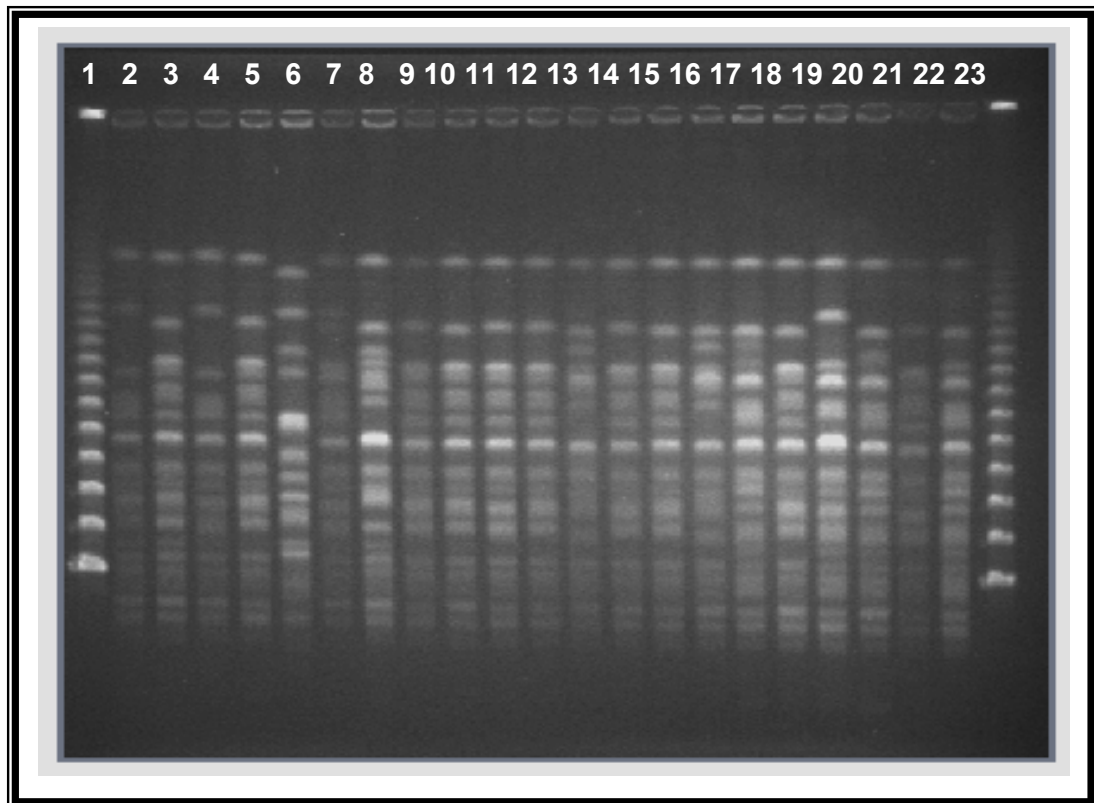


Figura 4. - Resultados obtidos pela técnica PFGE das 36 amostras bacterianas positivas para SPM-1. Linha 1 marcador de peso molecular λ (48,5 Kb); linha 2, amostra P4614 (padrão A5); linha 3, amostra P4742 (padrão A2); linha 4, P4743 (padrão A5); linha 5, P4745 (padrão A2); linha 6, P4750 (padrão C); linha 7, P4753 (padrão A6); linha 8, P4819 (padrão B3); linha 9, P4846 (padrão A2); linha 10, P4855 (padrão A2); linha 11, 4900 (padrão A2); linha 12, P4906 (padrão A2); linha 13, P4910 (padrão B3); linha 14, P4912 (padrão A2); linha 15, P4971 (padrão A2); linha 16, P4972 (padrão B3); linha 17, P4977 (padrão B2); linha 18, P5138 (padrão A2); linha 19, P5242 (padrão A3); linha 20, P5247 (padrão B2); linha 21, P5367 (padrão A2); linha 22, P5369 (padrão A1); linha 23, marcador de peso molecular λ (48,5 Kb).

Ao contrário, entre os isolados de IMP-1 foi encontrado apenas um único perfil de PFGE para as nove amostras (Figura 5). Uma das amostras de SPM-1 (P4750) apresentou o mesmo perfil de PFGE (C) que as amostras de IMP-1 (Figura 4).

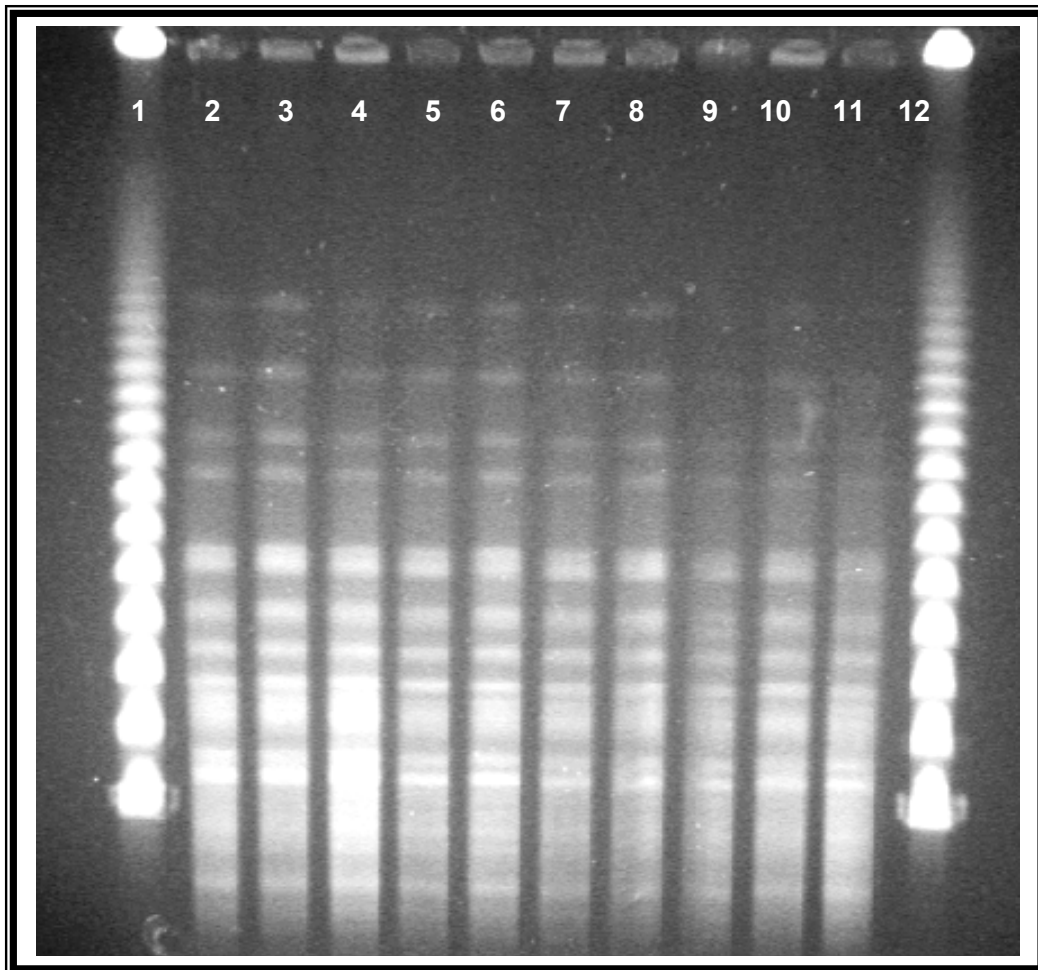


Figura 5 - Resultados obtidos pela técnica PFGE das 9 amostras bacterianas positivas para IMP-1. Linha 1, marcador de peso molecular λ (48,5Kb); linha 2, P4826 (Padrão C); linha 3, (Padrão C); linha 4, P5226 (Padrão C); linha 5, P5236 (Padrão C); linha 6, P5375 (Padrão C); linha 7, P5386 (Padrão C); linha 8, P5466 (Padrão C); linha 9 P5472 (Padrão C); linha 10, P5480 (Padrão C); linha 11, marcador de peso molecular λ (48,5Kb).

4.4. Análise Epidemiológica

As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L foram obtidas de diversos sítios corpóreos, sendo mais frequentemente isoladas em urina (46.7%), trato respiratório (20%), hemocultura (6.7%), cateter (9%), secreção uretral (7%), ferida cirúrgica (4%) e outros (7%) (Figura 6).

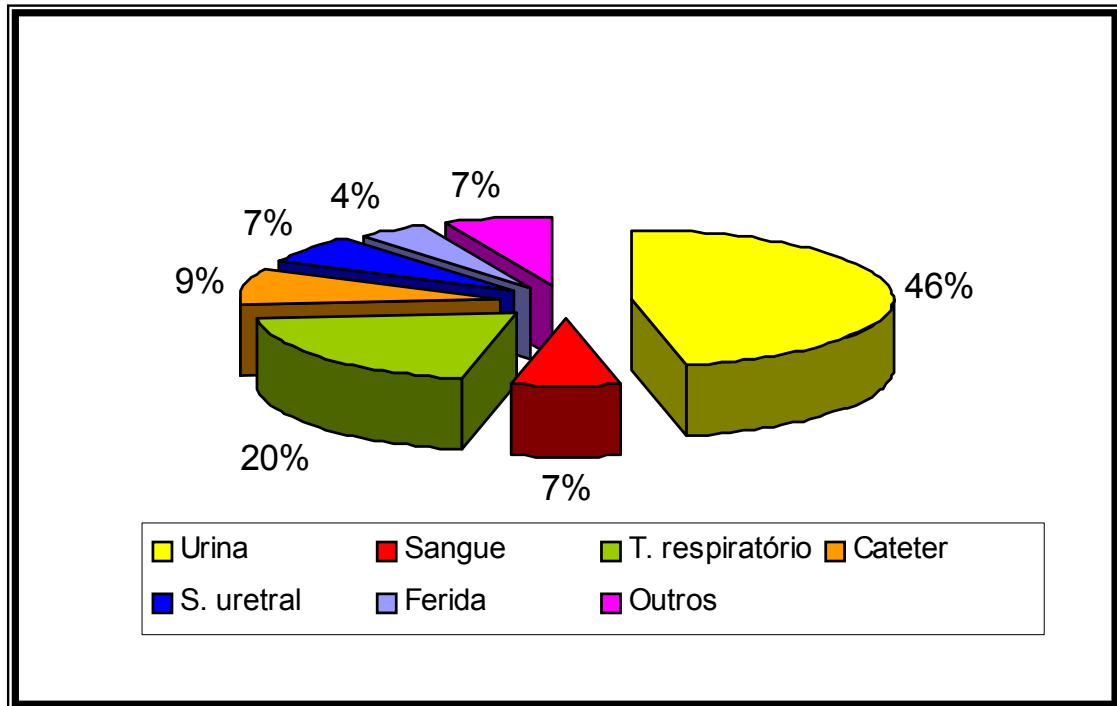


Figura 6. Proporção dos diferentes isolados de *P. aeruginosa* obtidos em amostras clínicas de pacientes internados no Hospital São Paulo, nos meses de janeiro a dezembro no ano de 2004.

A análise epidemiológica das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de *bla*_{SPM-1} (Tabela 3) demonstrou que não existe uma relação entre um determinado subtipo e uma unidade de internação. Todos os clones e subtipos foram encontrados em diferentes unidades do Hospital São Paulo. Embora se verifique uma grande diversidade clonal entre essas amostras, é possível também observar uma disseminação horizontal entre os subtipos encontrados. O subtipo A2 foi encontrado praticamente em quase todos os meses de 2004, sendo isolado de janeiro a junho e novamente em agosto e novembro. Em maio foram isoladas quatro amostras, sendo duas na UTI geral. O subtipo A1 foi isolado de janeiro a março e também em novembro.

Tabela 1. Unidade de internação, mês e sítio de isolamento, e perfil de PFGE dos 36 isolados contendo *bla*_{SPM-1} de *P. aeruginosa* em pacientes internados no Hospital São Paulo no período de Janeiro a Dezembro de 2004.

ORGANISMO	DATA	ENFERMARIAS	ISOLADOS	PFGE
P4367	JANEIRO	IOP ¹	OROFARINGE	A1
P4368	JANEIRO	UTI ² GERAL	PONTA DE CATETER	B1
P4385	JANEIRO	UI ³ ORTOPEDIA	TRAQUEAL	A2
P4390	JANEIRO	UI ³ TRANSPLANTE. RENAL	ESCARRO	A3
P4478	FEVEREIRO	UPOCC ⁴	URINA	A2
P4480	FEVEREIRO	UTI ² GERAL	SANGUE	B2
P4483	FEVEREIRO	UI ³ NEUROCLIN.	URINA	B3
P4497	FEVEREIRO	UI ³ TRANSP. RENAL	FERIDA CIRÚRGICA	A1
P4499	FEVEREIRO	UI ³ RETAGUARDA II P.S ⁵	SECREÇÃO URETRAL	A2
P4595	MARÇO	UI ³ VASCULAR	URINA	A4
P4599	MARÇO	CLÍNICA MÉDICA	URINA	A1
P4601	MARÇO	RETAGUARDA III PS ⁵	FERIDA CIRÚRGICA	A2
P4608	MARÇO	UTI ² GERAL	URINA	B1
P4610	MARÇO	UTI ² GERAL	URINA	A1
P4613	MARÇO	IOP ¹	SANGUE	A2
P4614	MARÇO	UTI ² GERAL	URINA	A5
P4742	ABRIL	RETAGUARDA III PS ⁵	URINA	A2
P4743	ABRIL	UNIDADE DE INTERNAÇÃO	URINA	A5
P4745	ABRIL	RETAGUARDA III PS ⁵	URETRAL	A2
P4750	ABRIL	RETAGUARDA III PS ⁵	URINA	C
P4753	ABRIL	CLÍNICA MÉDICA	URINA	A6
P4819	MAIO	UTI ² GERAL	URINA	B3
P4846	MAIO	UI ³ HEMATOLOGIA	LAVADO BRONQ	A2
P4855	MAIO	UTI ² GERAL	URINA	A2
P4900	MAIO	UTI ² GERAL	URINA	A2
P4906	MAIO	PS ⁵ CLÍNICA MÉDICA	URINA	A2

ORGANISMO	DATA	ENFERMARIAS	ISOLADOS	PFGE
P4910	JUNHO	RETAGUARDA. I PS ⁵	URINA	B3
P4912	JUNHO	UI ³ PEDIATRIA.	FERIDA CIRÚRGICA	A2
P4971	JUNHO	RETAGUARDA. III PS ⁵	URINA	A2
P4972	JUNHO	RETAGUARDA II P.S ⁵	ESCARRO	B3
P4977	JUNHO	P.S ⁵ CLÍNICA. MÉDICA	ESCARRO	B2
P5138	AGOSTO	IOP ¹	CATETER	A2
P5242	OUTUBRO	UTI ² GERAL	URINA	A3
P5247	OUTUBRO	UTI ² GERAL	LAVADO BRONQUICO	B2
P5367	NOVEMBRO	IOP ¹	URINA	A2
P5369	NOVEMBRO	PRONTO SOCORRO	URINA	A1

1-Instituto de oncologia pediátrica; 2-Unidade de terapia intensiva; 3-Unidade de internação; 4-UPOCC; 5-Pronto-Socorro.

Em relação às amostras de *P. aeruginosa* produtoras de *bla*_{IMP-1} (Tabela 4), houve uma disseminação clonal durante o ano de 2004 no Hospital São Paulo. Embora tenham sido isoladas em diferentes unidades de internação, das nove amostras, cinco foram encontradas na UTI geral entre os meses de setembro e dezembro, demonstrando uma disseminação nessa unidade, e duas amostras foram isoladas na Retaguarda II do pronto socorro. A análise retrospectiva dos prontuários desses pacientes mostrou que cinco fizeram uso prévio de imipenem. Para os demais pacientes não foi possível obter tal informação.

Dos seis pacientes avaliados quanto à evolução clínica, 2 evoluíram para óbito (33,3%), sendo que 1 com amostra isolada de hemocultura e outro de secreção uretral.

Tabela 2. Unidade de internação, mês e sítio de isolamento, e perfil de PFGE dos 9 isolados contendo *bla*_{IMP-1} de *P. aeruginosa* em pacientes internados no Hospital São Paulo no período de Janeiro a Dezembro de 2004.

Organismo	Mês	Enfermaria	Isolados	PFGE
P4826	MAIO	UI ² NEUROCIRUGIA	URINA	C
P4978	JUNHO	UTI ¹ PNEUMOLOGIA	LAVADO BRONQUICO	C
P5226	SETEMBRO	UTI ¹ GERAL	URETRAL	C
P5236	SETEMBRO	RETAGUARDA II PS ³	URETRAL	C
P5375	NOVEMBRO	UTI ¹ GERAL	URETRAL	C
P5386	NOVEMBRO	UTI ¹ GERAL	CATETER	C
P5466	NOVEMBRO	RETAGUARDA II PS ³	SANGUE	C
P5472	DEZEMBRO	UTI ¹ GERAL	CATETER	C
P5480	DEZEMBRO	UTI ¹ GERAL	TRAQUEAL	C

1-Unidade de terapia intensiva; 2-Unidade de internação; 3-Pronto Socorro.

Tabela 3. Tabela demonstrativa com amostras de *P. aeruginosa* bla_{IMP-1}, de seis pacientes internados no Hospital São Paulo, no período de Janeiro a Dezembro de 2004.

Mês	Uso prévio de Imipenem	Enfermaria	Isolados	Evolução óbito
SETEMBRO	SIM	PS ¹ RETAGUARD AII	SECREÇÃO. URETRAL	SIM
NOVEMBRO	SIM	UTI ²	ASPIRADO. URETRAL.	NÃO
NOVEMBRO	SIM	UTI ²	CATETER	NÃO
NOVEMBRO	SIM	PS ¹ RETAGUARD AII	SANGUE	SIM
DEZEMBRO	SIM	UTI ²	CATETER	NÃO
DEZEMBRO	SIM	UTI ²	ASPIRADO TRAQUEAL	NÃO

1-Pronto Socorro; 2-Unidade de Terapia Intensiva;

5-Discussão

A prevalência de M β L entre as 120 amostras de *P. aeruginosa* isoladas no ano de 2004 foi de 37,5% (n=45), superior ao encontrado na mesma instituição por Marra e colaboradores (2006), onde foram analisadas 76 amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenens, no período de janeiro de 2000 a maio de 2002. Neste estudo a prevalência foi de 9,2% (n=7). O aumento na prevalência de M β L entre os dois estudos pode ser justificado pelo fato de que no estudo anterior onde foram incluídos somente isolados provenientes de hemoculturas, ao passo que em nosso estudo foram consideradas todos os sítios de infecção.

Notavelmente, em nosso estudo, 62,5% (n=75) das amostras eram resistentes aos carbapenens e não eram produtoras de M β L. Esse fato também foi observado por Marra e colaboradores, sendo que em seu trabalho 81,1% das amostras foram negativas para M β L. Esse fato demonstra que outros mecanismos além da produção de M β L podem estar associados com a resistência aos carbapenens em amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Hospital São Paulo. A diminuição de permeabilidade de membrana externa (Porinas) e/ou pela hiperexpressão de bombas de efluxo podem ser os prováveis mecanismos responsáveis por tal fenótipo de resistência.

*bla*_{SPM-1} foi a mais prevalente, representando 80% dos isolados produtores de M β L, seguida por *bla*_{IMP-1} com 20%. Esse resultado podia ser esperado, visto que a *bla*_{SPM-1} foi primeiramente descrita no Hospital São Paulo e com distribuição em diferentes regiões do Brasil (Toleman *et al.*, 2002;

Gales *et al.*, 2003a). Diferente da *bla*_{SPM-1}, o gene *bla*_{IMP} tem ampla distribuição geográfica, tendo sido descrito em diversas partes do mundo.

Entre 2000 e 2001, *P. aeruginosa* isoladas de infecções da corrente sanguínea no Hospital São Paulo, foram avaliadas para a produção de MβL. Entre as 83 amostras de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, 22 isolados eram produtores de SPM-1-like, enquanto três eram produtoras de enzimas IMP-1-like (Sader *et al.*, 2004). Entretanto em estudos posteriores utilizando seqüenciamento revelou que uma das amostras produtoras de IMP-1-like carregava o gene IMP-16. Para os outros dois isolados não foi possível a identificação através do seqüenciamento.

Entre os nove isolados produtores de IMP-1, somente encontramos o padrão C de PFGE, demonstrando que a disseminação de cepas endêmicas pode ser responsável por este fenótipo de resistência em *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1, sugerindo a ocorrência de transmissão paciente-paciente na instituição. As 36 amostras produtoras de SPM-1 apresentaram três padrões de PFGE de maior prevalência, sendo que para cada padrão foram encontrados diferentes subtipos. Isso demonstra que entre as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, há uma diversidade clonal, diferente do ocorrido com as amostras produtoras de IMP-1 na mesma instituição.

As MβL adquiridas são codificadas por genes cassetes localizados tanto no cromossomo quanto no plasmídio bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1 (Toleman *et al.*, 2002, Poirel *et al.*, 2004), as demais MβL adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons (Walsh *et al.*, 2003, Mendes *et al.*, 2004a, Toleman *et al.*, 2003, Patzer *et al.*, 2004, Mendes *et al.*, 2004c)

Os plasmídios são responsáveis pela disseminação de muitas β -lactamases, no entanto os genes que codificam essas enzimas são encontrados inseridos em integrons os quais freqüentemente contêm outros genes que conferem resistência a uma variedade de antibióticos. Por essa razão, as β -lactamases são usualmente produzidas por organismos que também são resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

Marra e colaboradores (2006) encontraram taxas de mortalidade e morbidade entre pacientes com infecções da corrente sanguínea por *P. aeruginosa* produtoras de M β L superior a 85,7%. Em nosso estudo dos seis pacientes que apresentaram infecção por *P. aeruginosa* produtora de IMP-1, em que foram obtidos os dados clínicos, somente dois óbitos (33,3%) foram observados, sendo um com isolado de hemocultura e outro de secreção uretral.

Embora seja difícil estabelecer a correlação entre o uso de carbapenens e a emergência de resistência, o aumento da produção de M β L tem sido associado com o aumento do consumo de carbapenem e com a disseminação de clones multi-resistentes (Mutnick, 2004). O uso de carbapenens no Hospital São Paulo entre 1999 e 2001 variou de 1,7 a 3,8 g/1000 pacientes-dia em todo o hospital, e de 16,1 a 20,7 g/1000 pacientes dia em unidades de terapia intensiva (Sader *et al*,2004).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P.aeruginosa* são limitadas e incluem penicilinas com atividade anti-pseudomonas, cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam, carbapenens, e fluoroquinolonas, particularmente a ciprofloxacina (Carmeli *et al.*, 1999 a). Os aminoglicosídeos são freqüentemente utilizados em regimes combinados aos

β -lactâmicos na tentativa de potencializar a atividade antimicrobiana e de evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, sendo a monoterapia com esses antimicrobianos raramente utilizada. Para amostras multiresistentes a única opção terapêutica disponível tem sido a colistina e a polimixina B

Seis pacientes que apresentaram infecção por *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 receberam terapia com carbapenens antes do isolamento das amostras, corroborando com os dados encontrados por Marra e colaboradores (2006), no qual 85.7% dos pacientes receberam terapia prévia com carbapenêmicos.

Quase 50% das amostras produtoras de M β L foram isoladas da urina e/ou secreção uretral, demonstrando uma importante correlação com a aquisição de cepas de *P. aeruginosa* resistentes, seguida pelo trato respiratório, com 20% das amostras. No Brasil, segundo dados do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos (Pfaller *et al.*, 1998), a *P. aeruginosa* foi a causa mais freqüente de infecções urinárias e infecções de ferida cirúrgica e o sexto patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea no período de 1997 a 2001 (Sader *et al.*, 2004).

A avaliação de isolados provenientes de diferentes sítios, além dos isolados de hemoculturas, pode fornecer mais informações sobre a prevalência de microrganismos multiresistentes, possibilitando a compreensão dos mecanismos de disseminação em uma área geográfica (disseminação de um clone resistente) e monitorização dos elementos genéticos envolvidos (disseminação horizontal da resistência). Isto é verificado quando comparamos os resultados obtidos por Marra e

colaboradores (2006), em que somente foram avaliadas hemoculturas e o presente estudo em que foram considerados todos os sítios de infecção.

Ainda que as medidas para o controle de infecção de microrganismos produtores de M β L não estejam bem definidas, algumas evidências sugerem que as já conhecidas medidas gerais de controle de infecção, aliadas à racionalização do uso de agentes antimicrobianos de amplo espectro poderiam resultar em medidas melhores sucedidas. (Urban *et al.*, 2003, Livermore, 2002).

A diversidade clonal observada entre as amostras produtoras de SPM-1 demonstra que no Hospital São Paulo no ano de 2004 a política de racionalização de antimicrobianos foi ineficaz no controle de sua disseminação. Uma disseminação horizontal também foi observada entre essas amostras quando consideramos os subtipos encontrados. O subtipo A2, por exemplo, foi isolado durante todo o ano de 2004. Além disso, em maio foram isoladas quatro amostras, sendo duas na UTI geral. O mesmo foi observado para o subtipo A1.

A disseminação clonal verificada não somente para as amostras produtoras de IMP-1 como também para alguns subtipos encontrados nas amostras de SPM-1 comprova que as medidas de prevenção de infecção hospitalar aplicadas durante o período avaliado foram insuficientes. Esse fato fica claro quando observamos a disseminação em diversas unidades no Hospital São Paulo durante todo o ano de 2004 como também dentro de uma mesma unidade.

Portanto a implementação de metodologias fenotípicas para detecção de M β Ls em conjunto com a racionalização do uso de agentes

antimicrobianos de amplo espectro poderiam auxiliar na contenção da disseminação destes genes de resistência, uma vez que, diante da capacidade de recombinação destas estruturas genéticas estes genes continuarão a surgir caso a pressão seletiva sobre a flora nosocomial seja mantida.

As M β L podem ser detectadas por meio de testes fenotípicos, pelo fato de M β L ter como característica a necessidade de íons divalentes (i.e. Zn⁺²) atuando como co-fator para a reação de hidrólise, permitindo que utilizem um agente quelante durante o processo. A metodologia de disco-aproximação desenvolvida por Arakawa e colaboradores (Arakawa *et al.*, 2000) apresenta boa sensibilidade e especificidade, e pode facilmente ser empregada no laboratório de rotina. Adicionalmente, fitas de Etest incorporadas de imipenem de um lado e imipenem em conjunto com EDTA em seu outro lado também podem ser utilizadas, porém apresentam custo mais elevado (Walsh *et al.*, 2002).

Adicionalmente, esforços com o intuito de melhor caracterizar M β LS poderiam também auxiliar o desenvolvimento de inibidores efetivos para uso clínico durante tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras destas enzimas, da mesma forma como foram desenvolvidos inibidores para as ESBLs (ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam). Os inibidores disponíveis até o momento não tem aplicabilidade clínica, ficando restritos ao uso no laboratório para a detecção fenotípica dessas enzimas, como é o caso do EDTA e o 2-mercaptoetanol.

Programas de vigilância epidemiológica, tal qual SENTRY, podem auxiliar na monitoração da resistência bacteriana em determinados locais; no entanto, programas como estes também apresentam como desvantagem, o fato de não possibilitarem a monitoração concomitante de um grande número de centros médicos. Sendo assim, Brasil, país de proporção continental, permanece descoberto, ainda que com a atuação de alguns destes programas, o que demonstra a real necessidade da implementação de programas nacionais e mais abrangentes.

Programas nacionais e mais abrangentes possibilitariam não somente a real monitoração da resistência bacteriana, mas juntamente com estudos científicos objetivando determinar e/ou caracterizar os elementos genéticos (integrons e transposons) responsáveis pela disseminação destes genes, permitiria melhor compreensão do mecanismo, regulação, estabilidade e dos fatores que influenciam a recombinação genética. Isto certamente poderia auxiliar no controle de disseminação destes genes de resistência, bem como daqueles que surgirão em decorrência do uso de novos antibióticos.

6-Conclusões

- ◆ A prevalência de MβL nas amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo no ano de 2004 foi de 37,5%, sendo *bla*_{SPM-1} a mais prevalente;

- ◆ Entre as amostras produtoras *bla*_{SPM-1} foi verificado uma grande diversidade genética, enquanto para as amostras produtoras de *bla*_{IMP-1} verificou-se a presença de um único clone;

- ◆ Outros mecanismos além da produção de MβL parecem estar associados a resistência a carbapenems no Hospital São Paulo, sendo necessário estudos posteriores;

- ◆ A urina parece ter um papel importante na aquisição de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems em pacientes no Hospital São Paulo;

- ◆ O uso prévio de carbapenems é um fator de risco importante na aquisição de *P. aeruginosa* produtoras de MβL;

- ◆ As medidas de prevenção de disseminação de *P. aeruginosa* carreadoras de MBL no Hospital São Paulo no ano de 2004 foram ineficazes

7. Referências Bibliográficas

Aires J R, Kohler T, Nikaido H, Plesiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; (43): 2624-2628.

Ambler R P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; (289): 321-331.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; (38): 40-43.

Avison M B, Higgins C S, von Heldreich C J, Bennett P M, Walsh T R. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; (45): 413-419.

Bagge N, Ciofu O, Skovgaard L T, Hoiby N. Rapid development in vitro and in vivo of resistance to ceftazidime in biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa* due to chromosomal β -lactamase. *APMIS* 2000; (108): 589-600.

Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini G M, Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; (54): 282-283.

- Bennett P M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999.
- Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; (39): 1211-1233.
- Bush K. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; (27 Suppl 1): S48-S53.
- Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; (32): 1085-1089.
- Castanheira M, Toleman M A, Jones R N, Schimidt F J, Walsh T R. Molecular characterization of a β -lactamase gene, bla_{GIM-1} encoding a new sub-class of Metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; (48): 4654-4661.
- Carmelli Y, Eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1998; (36): 595-597.
- Carmeli Y, Troillet N, Elipoulos G M, Samore M H. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999a; (43): 1379-1382.

- Carmeli Y, Troillet N, Karchemer A W, Samore M H. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* 1999b; (159): 1127-1132.
- Chu Y W, Afzal-Shah M, Houang E T, Palepou M I, Lyon D J, Woodford N, Livermore D M. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter spp.* collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; (45): 710-714
- Collis C M, Hall R M. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992; (174): 1574-1585
- Collis C M, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes H W, Hall R M. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 1993; (9): 41-52.
- Collis C M, Hall R M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; (39): 155-162.
- Collis C M, Kim M J, Partridge S R, Stokes H W, Hall R M. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 2002; (184): 3017-3026.
- Cross A, Allen J R, Burke J, Duce G, Harris A, John J, Johnson D, Lew M, Macmillan B, Meers P. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1983, (5): 837-845..

Crowder M W, Walsh T R, Banovic L, Pettit M, Spencer J. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; (42): 921-926.

Da Silva G J, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa J C, Leitao R, Peixe L, Duarte A. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; (215): 33-39.

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* 2003; (47): 1522-1528.

Fung-Tomc J C, Huczko E, Banville J, Menard M, Kolek B, Gradelski E, Kessler R E, Bonner D P. Structure-activity relationships of carbapenems that determine their dependence on porin protein D2 for activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; (39): 394-399.

Gales A C, Jones R N, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1977-1999. *Clin Infect Dis* 2001; (32 Suppl 2): S146-S155.

- Gales A C, Menezes L C, Silbert S, Sader H S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003a; (52): 699-702.
- Godfrey A J, Bryan L E, Rabin H R. β -Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; (19): 705-711.
- Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, Nakahashi M, Nishino T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in Δ mexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; (42): 1938-1943.
- Hasdemir U O, Chevalier J, Nordmann P, Pages J M. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; (42): 2701-2706.
- Huang H, Hancock R E. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; (178): 3085-3090
- Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, Matsumura N, Minami S, Haruta S, Sawai T, O'Hara K. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; (44): 2023-2027.
- Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, O'Hara K. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two

unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an alcaligenes xylooxidans strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; (46): 2014-2016.

Jacoby G A, Munoz-Price L S. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; (352): 380-391.

Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn Jr W C. Bacilos Gram-negativos não fermentadores. *Diagnóstico Microbiológico*. 2001, 5th: 263-329.

Langaee T Y, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; (44): 583-589.

Lauretti L, Ricio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini G M. Cloning and characterization of blavim, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; (43): 1584-1590.

Laraki , Francheschini N, Rossolini G M, Santuci P, Meunier C, de Pauw E, Aicosante G, Frere J M, Galleni M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; (43): 902-906.

Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini G M. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne

- metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; (43): 1584-1590.
- Lee S C, Fung C P, Liu P Y, Wang T C, See L C, Lee N, Chen S C, Shieh W B. Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; (20): 205-207.
- Lee k, Yum J H, Yong D, Lee H M, Kim H D, Docquier J D, Rossolini G M, Chong Y. Novel Acquired Metallo- β -lactamase gene, bla_{sim-1}, a in Class 1 integron from *Acintobacter baumani* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; (49): 4485-4491.
- Li X Z, Ma D, Livermore D M, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; (38): 1742-1752.
- Li X Z, Poole K, Nikaido H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; (47): 27-33.
- Livermore D M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001; (47): 247-250.
- Livermore D M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; (34): 634-640.

- Lodge J M, Piddock L J. The control of class I β -lactamase expression in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1991; (28): 167-172.
- Marra A R, Pereira C A, Gales A C, Menezes L C, Cal R G R, Souza J M A, Edmond M B, Faro C and Wey S B. Bloodstream Infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; (50): 388-390.
- Massidda O, Rossolini G M, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J Bacteriol* 1991; (173): 4611-4617.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; (44): 2242-2246.
- Medeiros A A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; (24 Suppl 1): S19-S45.
- Mendes R E, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman M A, Walsh T R, Jones R N. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004a; (48): 1433-1434.

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}, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004c; (48): 4693-4702.

Murphy T A, Simm A M, Toleman M A, Jones R N, Walsh T R. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; (47): 582-587.

Mutnick A H, Rhomberg J, Sader H S, Jones R N. Antimicrobial usage and resistance trend relationships from the MYSTIC Programme in North América (1999-2001). *J Antimicrob Chemother* 2004; (53): 290-296.

Naas T, Benaoudia F, Massuard S, Nordmann P. Integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J Antimicrob Chemother* 2000; (46): 703-711.

Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; (43): 1281-1284.

Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* 1994; (269): 3905-3908.

Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998; (27 Suppl 1): S32-S41.

Noguchi H, Matsubishi M, Mitsubishi S. Comparative studies of penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Eur J Biochem 1979; (100): 41-49.

Normark S. β -Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. Microb Drug Resist 1995; (1): 111-114.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994; (38): 71-78.

Partridge S R, Recchia G D, Scaramuzzi C, Collis C M, Stokes H W, Hall R M. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. Microbiology 2000; (146 (Pt 11)): 2855-2864.

Partridge S R, Brown H J, Hall R M. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. Antimicrob Agents Chemother 2002; (46): 1288-1294.

Patzer J, Toleman M A, Deshpande L M, Kaminska W, Dzierzanowska D, Bennett P M, Jones R N, Walsh T R. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). J Antimicrob Chemother 2004; (53): 451-456.

Pfaller M A, Jones R N, Doern G V, Kugler K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother* 1998; (42): 1762-1770.

Poirel L, Le T.I., Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extend-spectrum β -lactamase and the class I integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; (44): 662-632.

Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; (45): 546-552.

Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; (3): 117-127.

Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; (48): 1406-1409.

Pollack M. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1984; (6 Suppl 3): S617-S626

- Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, Neshat S, Yamagishi J, Li X Z, Nishino T. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1996; (21): 713-724.
- Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; (46): 932-933.
- Quinteira S, Sousa J C, Peixe L. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- β -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; (49): 451-453.
- Recchia G D, Hall R M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 1997; (5): 389-394.
- Riccio M L, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini G M. Characterization of the metallo- β -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* 2000; (44): 1229-1235.
- Rossolini G M, Franceschini N, Riccio M L, Mercuri P S, Perilli M, Galleni M, Frere J M, Amicosante G. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum carbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile. *Biochem J* 1998; (332 (Pt 1)): 145-152.

Sader H S, Gales A C, Phaller M A, Mendes R E, Zoccoli C, Barth A, Jones R N, Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001; (5): 200-214.

Sader H S, Reis A O, Silbert S, Gales A C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamase produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian hospital. *Europ Society of Clin Microb and Infect Diseases* 2004; (11): 63-82.

Simm A M, Higgins C S, Pullan S T, Avison M B, Niumsup P, Erdozain O, Bennett P M, Walsh T R. A novel metallo-beta-lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett* 2001; (509): 350-354.

Spencer J, Clarke A R, Walsh T R. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic beta-lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- β -lactamase. *J Biol Chem* 2001; (276): 33638-33644.

Stokes H W, Hall R M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; (3): 1669-1683.

Thompson J S, Malamy M H. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* beta-lactamase II. *J Bacteriol* 1990; (172): 2584-2593.

Tenover F C, Arbeit R D, Goering P A, Mickelsen, Murray B E, Persing H, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacteria strain typing. J Clin Microbiol 1995; (33):2233-2239.

Toleman M A, Simm A M, Murphy T A, Gales A C, Biedenbach D J, Jones R N, Walsh T R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002; (50): 673-679

Toleman M A, Biedenbach D, Bennett D, Jones R N, Walsh T R. Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2003; (52): 583-590.

Toleman M A, Rolston K, Jones R N, Walsh T R. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004; (48): 329-332.

Tuomanen E, Schwartz J. Penicillin-binding protein 7 and its relationship to lysis of nongrowing *Escherichia coli*. J Bacteriol 1987; (169): 4912-4915.

Urban C, Segal-Maurer S, Rahal J J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 2003; (36): 1268-1274.

- Walsh T R, Gamblin S, Emery D C, MacGowan A P, Bennett P M. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo-beta-lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J Antimicrob Chemother* 1996; (37): 423-431.
- Walsh T R, Neville W A, Haran M H, Tolson D, Payne D J, Bateson J H, MacGowan A P, Bennett P M. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-beta-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; (42): 436-439.
- Walsh T R, Toleman M A, Hryniewicz W, Bennett P M, Jones R N. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; (52): 116-119.
- Weldhagen G F, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; (47): 2385-2392.
- Yan J J, Hsueh P R, Ko W C, Luh K T, Tsai S H, Wu H M, Wu J J. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001a; (45): 2224-2228.
- Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; (45): 1343-1348

Yum J H, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim J M, Rossolini G M, Chong Y.
Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing
Acinetobacter baumannii and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea:
identification of two new integrons carrying the bla(VIM-2) gene cassettes. J
Antimicrob Chemother 2002; (49): 837-840.

8-Resumo

No Hospital São Paulo, um hospital terciário de 600 leitos, a presença de *P. aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase tem sido encontrada desde 2000 (a primeira, SPM-1, foi isolada em 1997). Durante o período entre 2000 e 2001, 25 das 128 amostras avaliadas produziam SPM ou IMP (88% e 12% das *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, respectivamente). Durante o ano de 2004, as 10 primeiras amostras consecutivas de *P. aeruginosa* isoladas por mês foram selecionadas para a produção de M β L. Um total de 120 isolados foram submetidas ao teste de hidrólise contra imipenem, PCR para a identificação do gene de M β L seguido de seqüenciamento de DNA. Todos os isolados produtores de IMP foram avaliados para a presença de integrons de classe 1. A similaridade genética dos isolados produtores de M β L foram avaliados pelo PFGE. Entre os 120 isolados de *P. aeruginosa*, 46 (38,1%) foram capazes de hidrolizar imipenem. O seqüenciamento dos amplicons demonstrou que 20% dos 80% dos isolados de *P. aeruginosa* carregavam *bla*_{IMP-1} e *bla*_{SPM-1}, respectivamente. Todos os isolados produtores de IMP-1 pertenciam ao mesmo clone, enquanto os isolados produtores de SPM-1 apresentaram uma grande diversidade genética. A análise dos dados clínicos dos pacientes que apresentaram infecção por *P. aeruginosa* mostrou que a urina parece ter um papel importante na aquisição de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos no Hospital São Paulo e que o uso prévio de carbapenêmicos é um fator de risco importante na aquisição de amostras produtoras de M β L. Os dados sugerem que as medidas de prevenção de disseminação de *P. aeruginosa* carreadoras de M β L no Hospital São Paulo no ano de 2004 foram ineficazes.

9-Abstract

At Hospital São Paulo, a 600-bed tertiary care university hospital, the presence of metallo- β -lactamase producing *P. aeruginosa* has been detected since 2000 (the first strain, a SPM producer, was isolated in 1997). During the 2000-2001 period, 25 of 183 evaluated strains produced SPM or IMP (88% and 12% of the imipenem-resistant *P. aeruginosa*, respectively). During 2004, the 10 first consecutive imipenem resistant *P. aeruginosa* strains isolated monthly were screened for the production of M β L. A total of 120 isolates were submitted to hydrolysis test against imipenem, PCR for described M β L genes, and DNA sequencing. IMP-producing isolates were further evaluated with primers targeting class 1 integrons. The genetic relatedness of M β L-producing isolates was evaluated by PFGE. Among the 120 *P. aeruginosa* isolates, 46 (38,1%) were able to hydrolyze imipenem. Sequencing of the amplicons showed that 20% and 80% of the *P. aeruginosa* isolates carried *bla*_{IMP-1} and *bla*_{SPM-1}, respectively. All IMP-1-producing isolates belonged to the same genotype, while the SPM-1-producing isolates showed a great genetic diversity. Analysis of the clinical data of patients with *P. aeruginosa* infections reveals that the urinary site seems to be important in the acquisition of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* at Hospital São Paulo and that the previous use of carbapenems is an important risk factor for the acquisition of M β L-producing strains. These data show that the nosocomial infection control measures for prevention of dissemination of *P. aeruginosa* carrying M β L in patients hospitalized at Hospital São Paulo in 2004 were not effective.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)