



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Fernanda Martini de Lorena Néia Prado

Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores e não produtores de metalo- β -lactamase SPM-1

Londrina
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Martini de Lorena Néia Prado

Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores e não produtores de metalo- β -lactamase SPM-1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina

2009

Fernanda Martini de Lorena Néia Prado

**Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de
Pseudomonas aeruginosa produtores e não produtores de metalo- β -
lactamase SPM-1**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de Maio de 2009.

DEDICATÓRIA

À Deus por ter aberto as portas, iluminado
os caminhos e me amparado
nos momentos mais difíceis.

À meu pai Hairton (*in memoriam*) que
certamente se orgulharia por
mais uma vitória conquistada.

AGRADECIMENTOS

À coordenação e aos professores do Programa de Mestrado/Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

À minha orientadora, Professora Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo, pela oportunidade em desenvolver este trabalho, pela paciência e dedicação na realização desta dissertação.

À Professora Dr.^a Halha Ostrensky Saridakis, pelos vários e valiosos ensinamentos dentro e fora do laboratório, pelo carinho e cuidado.

À Professora Dr.^a Eliana Carolina Vespero, pelos conselhos dispensados e por aceitar o convite para constituir a banca examinadora.

À Professora Msc. Floristher Elaine Carrara-Marroni por ceder as amostras para a realização do trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Professor Dr. Emerson José Venâncio, pelos vários esclarecimentos e ajuda neste trabalho.

À amiga Silvia Emanoele Cestari pelos vários momentos de ajuda na realização dos experimentos e pela dedicação, carinho, amizade e companheirismo.

À Michelle Siewert e Bárbara Moriel, pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

À Claci Sandra, Rafael Osti, Marcus Vinícius e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIM	<i>Australian</i> imipenemase
<i>AmpC</i>	Gene de β -lactamases da classe C de Ambler
BGNF	Bastonetes Gram negativos não-fermentadores
CAR	Carbenicilinase
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPS	Exopolissacarídeo
ESBLs	<i>Expectrum extended β-lactamases</i>
FC	Fibrose cística
GIM	<i>German</i> imipenemase
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina - 8
IMP	Imipenemase
IPM	Imipenem
KHM	<i>Kyorin health science metallo-β-lactamase</i>
LCR	Líquido cefaloraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
M β Ls	Metallo- β -lactamases
MEM	Meropenem
OXA	Oxacilinase
PER	<i>Pseudomonas extended resistant</i>

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PIA	<i>Pseudomonas Isolation Agar</i> (Agar para Isolamento de Pseudomonas)
QS	<i>Quorum sensing</i>
SENTRY	<i>Sentry Antimicrobial Surveillance Program</i>
SHV	<i>Sulphydryl reagent variable</i>
SIM	Seoul imipenemase
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
TEM	<i>Temoneira</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i> (Agar Triptona de Soja)
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Triptona de Soja)
TSBG	<i>Tryptic Soy Broth</i> suplementado com 1% de glicose
VEB	<i>Vietnam extended-expectrum β-lactamase</i>
VIM	<i>Verona imipenemase</i>
ZnCl ₂	Cloreto de zinco

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características bioquímicas de cepas de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida*.....6

Tabela 2. Resumo de fatores de virulência de *P. aeruginosa*12

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores.....	5
2.2 Características Gerais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.3 Fatores de Virulência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.4 Importância Clínica.....	12
2.5 Resistência aos Agentes Antimicrobianos.....	13
2.6 Metallo- β -lactamases.....	14
2.6.1 São Paulo metallo- β -lactamases.....	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
4 OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo Geral.....	24
4.2 Objetivos Específicos.....	24
5 ARTIGO: Comparative study of virulence factors between SPM-1 metallo-β-lactamase producers and non producers <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinical isolates	25
6 CONCLUSÕES.....	40

PRADO, Fernanda Martini de Lorena Néia **Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores e não produtores de metalo- β -lactamase SPM-1.** 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

RESUMO

As habilidades de invasão, colonização e de destruição tecidual apresentadas por *P. aeruginosa* devem-se aos múltiplos fatores de virulência produzidos pelo microrganismo durante a patogênese. Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase SPM-1 (M β L SPM-1) apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados e representam grande risco epidemiológico. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a expressão dos fatores de virulência: protease alcalina, fosfolipase C, elastases, pirocianina, pioverdina, hemolisinas, formação de biofilme em microplaca de poliestireno e a presença dos genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcN*, *plcH*, *toxA* e *algD*. Foram estudados 98 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, sendo 39 produtores de M β L SPM-1, 20 não produtores de M β L intermediários ou resistentes ao imipenem (IPM I/R) e 39 isolados não produtores de M β L sensíveis ao imipenem (IPM S). Correlacionando a frequência de detecção fenotípica dos diferentes fatores de virulência estudados entre os isolados SPM-1, IPM I/R e IPM S foi encontrado valor estatisticamente significativo na detecção de hemolisinas ($P = 0.001$). Comparando a detecção dos diversos genes de virulência analisados entre os isolados dos três grupos pesquisados, não foi observada diferença estatisticamente significativa. A expressão da maioria dos fatores de virulência foi observada em percentagens variadas em todas as cepas dos materiais clínicos analisados. De acordo com os resultados encontrados, foi constatado que a virulência dos isolados de *P. aeruginosa* independe da resistência apresentada aos antibióticos carbapenêmicos e que os fatores de virulência pesquisados são importantes em todos os materiais clínicos analisados.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; fatores de virulência; metalo- β -lactamase SPM-1.

PRADO, Fernanda Martini de Lorena Néia **Compative study of virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producing and non producing SPM-1 metallo- β -lactamase.** 2009. Dissertation (Master's Degree Dissertation in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina. 2009.

ABSTRACT

The invasion abilities, colonization and tissue damage presented by *P. aeruginosa* are due to the multiples virulence factors produced by the microorganism during the pathogenesis. Clinical isolates of SPM-1 metallo- β -lactamase *Pseudomonas aeruginosa* (SPM-1 M β L) from nosocomial infections present high rates morbidity and mortality and represent epidemic risk. The objective of this study was to research the expression of the virulence factors: alkaline protease, phospholipases C, elastases, pyocyanin, pyoverdine, hemolysins, biofilm formation in polystyrene microplate and the presence of the correlated genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcN*, *plcH*, *toxA* and *algD*. Ninety-eight isolated of *P. aeruginosa* obtained from several clinical specimens were studied, being 39 SPM-1 M β L producers, 20 imipenem intermediate or resistant SPM-1 M β L non-producers (IPM I/R) and 39 isolates imipenem susceptible SPM-1 M β L non-producers (IPM S). Correlating the phenotypic detection frequency of the different virulence factors studied among the groups SPM-1, IPM I/R and IPM S was observed statistical significance only for hemolysins production ($P = 0.001$). Comparing the detection of the analyzed virulence genes among the three groups of *P. aeruginosa* were not observed statistical relevance. The expression of most of the virulence factors was observed in varied percentages in all the isolates of the clinical materials. In agreement with the found results, it was verified that the virulence of the *P. aeruginosa* isolates not depends on the resistance presented to the carbapenems and that the virulence factors researched are important in all the analyzed clinical materials.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; SPM-1 metallo- β -lactamase; virulence factors.

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é o microrganismo oportunista humano mais frequentemente isolado de infecções nosocomiais (TRABULSI; LINCOPAN, 2008). É citado como causador de infecções no trato urinário; dermatites; infecções tegumentares e ósseas; ceratites e uma variedade de infecções sistêmicas; particularmente em pacientes imunocomprometidos, com queimaduras severas, câncer ou AIDS, sendo o microrganismo mais encontrado em infecções respiratórias agudas em pacientes submetidos à ventilação mecânica e em infecções respiratórias crônicas em pacientes com fibrose cística (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

P. aeruginosa apresenta diversos fatores de virulência e a relativa contribuição de cada um dos muitos fatores pode variar dependendo do sítio e tipo de infecção (TODAR, 2004). Entre os fatores de virulência caracterizados como adesinas, destacam-se; os flagelos, as fímbrias e o alginato (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006), e dentre os fatores extracelulares que facilitam o rompimento da integridade epitelial e interferem com o sistema imunológico podem ser citadas as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, entre outros (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995). A patogênese deste microrganismo envolve ainda inúmeros exoprodutos como a exotoxina A e os pigmentos piocianina e pioverdina.

Uma das características de *P. aeruginosa* é seu alto nível de resistência intrínseca ou adquirida a agentes antimicrobianos (HANCOCK; SPEERT, 2000). Um dos mecanismos de resistência de grande interesse consiste na produção de metalo- β -lactamases (M β LS), enzimas que possuem largo espectro de hidrólise sobre os betalactâmicos comercialmente disponíveis, como: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e inibidores de betalactamases (TORRES et al., 2006). Atualmente são conhecidas sete subclasses de M β LS adquiridas: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM e KHM codificadas pelos seus respectivos genes, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{AIM} e *bla*_{KHM} encontradas tanto em microrganismos não fermentadores como em enterobactérias e distribuídas pela América do Norte, América Latina, Ásia, Europa e Austrália (CASTANHEIRA et al., 2003, 2004; GALANI et al., 2004; GALES et al. 2003b; KOH et al., 2004; PATZER et al., 2004; POIREL; NORDMANN, 2002; RICCIO et al., 2000; TOLEMAN et al., 2005; TYSALL et al., 2002; WALSH et al., 2003, 2005; YAN et al., 2001; YONG et al., 2007, SEKIGUCHI et al., 2008).

São Paulo metalo- β -lactamase (SPM-1), até o presente momento, foi identificada somente em cepas de *P. aeruginosa* isoladas no Brasil, estando entre elas, isolados provenientes das cidades paranaenses de Londrina, Maringá e Curitiba (GALES et al., 2003a). Infecções causadas por *P. aeruginosa* produtoras de M β Ls acarretam altas taxas de mortalidade (LAUPLAND et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006) e apresentam como única opção terapêutica, até o presente momento, antimicrobianos do grupo das polimixinas, sabidamente conhecidos pelo alto grau de toxicidade (WALSH et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença e a produção de determinados fatores de virulência em isolados clínicos de *P. aeruginosa* M β L SPM-1 e correlacionar com a detecção dos genes e/ou expressão fenotípica dos mesmos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* não produtores de M β Ls intermediários ou resistentes ao imipenem e não produtores de M β Ls sensíveis ao imipenem.

Por meio de testes fenotípicos foram avaliados nos isolados de *P. aeruginosa*, a produção de protease alcalina, elastases, fosfolipase C, hemolisinas, dos pigmentos pioverdina e piocianina e a formação de biofilme em microplacas de poliestireno. A detecção de genes de virulência que codificam a produção das enzimas protease alcalina (*aprA*), elastase A (*lasA*), elastase B (*lasB*), fosfolipase C hemolítica (*plcH*), fosfolipase C não-hemolítica (*plcN*) e da exotoxina A (*toxA*) e do gene *algD* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores

Os bastonetes Gram-negativos não-fermentadores (BGNNF) são microrganismos aeróbios que se caracterizam pela incapacidade de utilizar os carboidratos como fonte de energia através da fermentação, degradando-os pela via oxidativa sendo representados pelos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Xantomonas*, *Burkholderia*, entre outros (POLLACK, 2000; SADER, 2001a).

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonaceae*, que na sua maioria são microrganismos de vida livre, alguns com relativa importância no ciclo do nitrogênio, podendo eventualmente infectar espécies vegetais e animais, inclusive o homem. O gênero apresenta espécies fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) e não fluorescentes (*P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. mendocina*) clinicamente importantes (TODAR, 2004).

2.2 Características Gerais de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é o BGNNF mais frequentemente isolado em materiais clínicos. De natureza ubiqüitária, é encontrada no solo, água, vegetais, animais e nos mais variados ambientes hospitalares (TRABULSI & LINCOPAN, 2008). Sua ampla distribuição deve-se à versatilidade metabólica em utilizar grande variedade de substratos orgânicos como fonte de carbono (TODAR, 2004).

A possibilidade de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos permite que equipamentos e utensílios hospitalares como respiradores e nebulizadores, bem como, soluções anti-sépticas de uso terapêutico e desinfetantes, lhes sirvam de reservatório (GRUNDMAN et al., 1995 ; MOOLENAR et al., 2000).

Morfologicamente, *P. aeruginosa* apresenta-se como bastonete Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, de 0,5 – 0,7 µm de espessura por 1,5 – 3,0 µm de comprimento, móvel através de flagelo polar monotríquio e fisiologicamente caracteriza-se por produção de indofenol oxidase (citocromo C oxidase presente na cadeia transportadora de elétrons),

arginina dehidrolase e respiração aeróbia, embora possa desenvolver-se em ambientes anaeróbios quando há presença de nitrato como aceptor final de elétrons (TRABULSI; LINCOPAN, 2008).

Em meio de cultivo produzem colônias grandes, irregulares com odor frutal que se desenvolvem bem em temperatura ambiente e, especialmente entre 37°C e 42°C. A maioria das cepas produz pigmentos hidrossolúveis difusíveis no meio, como piocianina, que se caracteriza por cor azul; e a pioverdina, que confere coloração esverdeada e apresenta fluorescência sob luz ultravioleta. Alguns isolados exibem aspecto mucóide e com menor frequência outros pigmentos como piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom) (SADER; SILBERT, 2000).

Cepas de *P. aeruginosa* não produtoras de piocianina são diferenciadas de espécies homólogas por características bioquímicas, como presença de flagelo polar monotríquio e crescimento a 42°C conforme descrito na Tabela 1 (GILARDI, 1991).

Tabela 1. Características bioquímicas de cepas de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida*

Características	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Piocianina	+ ou -	-	-
Pioverdina	+ ou -	+	+ ou -
Oxidase	+	+	+
Motilidade	+	-	-
Flagelo monotríquio	+	-	-
Flagelo lofotríquio	-	+	+
Oxidação de glicose (OF)	+	+	+
Arginina dehidrolase (BM)	+	+	+
Hidrólise de gelatina	- ou +	+	-
Crescimento a 42°C	+	-	-

OF: meio basal de OF; BM : meio base de Möeller

+, 90% ou mais de cepas positivas em 2 dias; - : 90% ou mais de cepas negativas; + ou -: maioria de cepas positivas; - ou +: maioria de cepas negativas

Fonte: Adaptado de Gilardi, 1991.

Stover et al. (2000) sequenciaram o genoma completo da linhagem da *P. aeruginosa* PAO1 e verificaram a presença de 6,3 milhões de pares de base, sendo um dos maiores genomas bacterianos já sequenciado. Os autores propõem que o tamanho e a complexidade do genoma de *P. aeruginosa* reflitam uma adaptação evolucionária permitindo-lhe crescer em diversos ambientes e resistir ao efeito de uma variedade de substâncias antimicrobianas.

2.3 Fatores de Virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

Como as infecções causadas por *P. aeruginosa* envolvem diferentes órgãos e tecidos, seus fatores de virulência são diversificados e em grande número (TRABULSI; LINCOPAN, 2008). A maioria dessas infecções são invasivas e toxigênicas sendo compostas por três estágios distintos: adesão bacteriana e colonização; invasão local e doença sistêmica disseminada. Cada um destes estágios é mediado por determinantes de virulência bacterianos específicos (TODAR, 2004).

Entre os componentes bacterianos caracterizados como adesinas, destacam-se os flagelos, as fimbrias ou pili, e o alginato ou exopolissacarídeo. Flagelos e fimbrias são apêndices de superfície que conferem motilidade e facilitam o contato bacteriano ligando-se aos glicolipídeos GM1 - componentes de membrana de células epiteliais (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Os flagelos são altamente imunogênicos e seu reconhecimento pelos glicolipídeos epiteliais é um potente estímulo para a produção de IL-8, uma citocina envolvida no recrutamento e ativação de células polimorfonucleares e ativação de macrófagos (FELDMAN et al., 1998). Entretanto, em infecções crônicas o microrganismo é capaz de adaptar-se selecionando mutantes aflagelares e ludibriando a resposta imune do hospedeiro (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). O lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular apresenta similar processo de adesão às células hospedeiras (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Permite a caracterização do sorogrupo da bactéria em estudo e é responsável pelas propriedades endotóxicas do microrganismo e a causa da síndrome do choque tóxico: febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada e anomalias metabólicas. *P. aeruginosa* pode também ser sorotipada de acordo com a suscetibilidade à piocianina (bacteriocina) (FERREIRA, 2005).

A superprodução do exopolissacarídeo (EPS) alginato caracteriza o curso de infecções por *P. aeruginosa* em pacientes com Fibrose Cística (FC) (HENTZER et al., 2001).

Indivíduos acometidos por FC apresentam mutações no gene do canal regulador de condutância transmembrana (CFTR), levando à falha no transporte intracelular de cloreto, o que acarreta produção anormal de um muco que obstrui os pulmões e outros órgãos (GLORIA, 2007; HENTZER et al., 2001). Durante infecções pulmonares crônicas em portadores de FC, esses microrganismos sofrem mudanças que os convertem a um fenótipo mucóide composto por bacilos altamente encapsulados devido à produção massiva de alginato; substância que favorece a adesão bacteriana, atua como fator antifagocitário, confere alta tolerância aos anticorpos e impede a difusão dos antibióticos apresentando também importante papel na formação da arquitetura de biofilmes (BRYAN, 1983; GLORIA, 2007).

Segundo Donlan e Costerton (2002), biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a um substrato biótico ou abiótico e umas as outras, embebidas em matriz ou polímero extracelular e que exibem um fenótipo alterado em relação à fatores de crescimento, expressão gênica e produção de proteínas. Biofilmes constituem um modo de proteção dos microrganismos, que permitem sua sobrevivência em ambientes hostis e estão envolvidos em diversos tipos de infecções crônicas (COSTERTON et al., 1999). Bactérias sésseis são fisiologicamente distintas das planctônicas da mesma espécie, tendo como característica marcante a capacidade de serem mais resistentes aos antibióticos (HENTZER et al., 2001).

O biofilme permite a colonização de cateteres vasculares (KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, 1991), peritoniais (DASGUPTA; COSTERTON, 1989), urinários (NICKEL; DOWNEY; COSTERTON, 1989), tubos nasogástricos (MARRIE; SUNG; COSTERTON, 1990), dispositivos ortopédicos e reservatórios de armazenamento de água em farmácia e/ou laboratório (CRISTINA; COSTERTON, 1984).

Muitas enzimas envolvidas na biossíntese do alginato têm sido caracterizadas. A maioria delas é codificada por um conjunto de genes localizados a 34 min no cromossomo de *P. aeruginosa*. Este *cluster* contém vários genes envolvidos na expressão de alginato, sendo *algD* o primeiro em ordem de transcrição e que codifica a enzima GDP manose desidrogenase, a qual cataliza o primeiro passo da biossíntese. A expressão de *algD* é frequentemente utilizada como indicador da expressão dos demais genes responsáveis pela biossíntese do alginato (STEHLING, 1999).

Dentre os fatores de virulência extracelulares que facilitam o rompimento da integridade epitelial e interferem com o sistema imunológico podem ser citados como mais importantes as elastases, protease alcalina, fosfolipase C e hemolisinas (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995)

Elastina é um componente importante de vasos sanguíneos e de grande parte dos tecidos pulmonares humanos, sendo responsável pela resiliência apresentada por estes órgãos (SALYERS; WHITT, 2002). A elastase A foi a primeira enzima desta classe caracterizada em *P. aeruginosa*, é também denominada estafilolisina por sua habilidade em lisar células estafilocócicas; entretanto, possui fraca atividade elastolítica. Sua função na elastólise é tornar o substrato insolúvel de elastina mais suscetível à clivagem pela elastase B e outras enzimas elastolíticas (SOUZA et al., 2006).

A elastase B é uma das enzimas extracelulares produzidas por *P. aeruginosa* que estão envolvidas na etapa inicial da patogênese. A habilidade desta metaloprotease em degradar elastina e colágeno e inativar IgG humana, inibidor de α 1-proteinase e componentes do sistema complemento enfatizam seu potencial como fator de virulência (BEVER; IGLEWSKI, 1988). Elastase B é uma metaloprotease que requer íon zinco (Zn^{2+}) para sua atividade enzimática (JAGGER; BAHNER; WARREN, 1983) e segundo Bever e Iglewski (1988), os mecanismos pelos quais a enzima degrada ou inativa tais substratos não estão totalmente esclarecidos.

Proteases podem aumentar a aderência de microrganismos pelo dano tecidual ou exposição de receptores, tornando os nutrientes disponíveis pela degradação das proteínas do hospedeiro contribuindo assim para o processo invasivo (TODER et al., 1994). *In vitro*, a produção de protease alcalina é observada em meio semi-sintético contendo cálcio como componente essencial, tendo sua atividade enzimática inativada pela adição de o-fenantrolina, conhecido quelante de metais (OKUDA et al., 1990). Porém, não é inativada por inibidores usuais de proteases, como diisopropil fosfofluoridato (DFP), ácido p-cloromercúrio benzóico e etilenodiaminotetracetato (EDTA) (MORIHARA; TSUZUKI, 1977). A grande maioria dos isolados clínicos e de ambientes de *P. aeruginosa* são proteolíticos e elastolíticos (JAGGER; BAHNER; WARREN, 1983; TODER et al., 1994). Estas enzimas são produzidas em resposta ao estímulo ambiental, incluindo baixas concentrações de ferro e osmolaridade e são dependentes da fase de crescimento celular (TODER et al., 1994). Pesquisas em extratos

purificados demonstram a ação de elastase B e protease alcalina pela necrose de tecidos conectivos através da degradação de elastina, laminina e colágeno (HECK et al., 1986).

As fosfolipases são lecitinases que hidrolizam fosfatidilcolina em fosforilcolina e diacilglicerol (BERKA; GRAY; VASIL, 1981). *P. aeruginosa* secreta duas fosfolipases C, uma hemolítica e outra não-hemolítica. A fosfolipase C hemolítica hidroliza preferencialmente fosfolipídeos encontrados em células eucarióticas, inclusive os de eritrócitos humanos, demonstrando pouca atividade sobre fosfolipídeos encontrados em membranas de procaríotos (OSTROFF; VASIL; VASIL, 1990). Adicionalmente, atua inativando o surfactante pulmonar e suprimindo o *burst* oxidativo dos neutrófilos (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). A degradação do surfactante pulmonar pode ser responsável pelas atelectasias associadas às infecções pulmonares crônicas e agudas por *P. aeruginosa* (SALYERS & WHITT, 2002).

Duas hemolisinas, fosfolipase C hemolítica (hemolisina termo-lábil) e ramnolipídeo (hemolisina termo-estável), produzidas por *P. aeruginosa* podem agir sinergicamente na degradação de lipídeos e lectina. Ambos os fatores contribuem para a invasão tecidual por meio de efeitos citotóxicos (DELLEN & IGLEWSKI, 1998). Ramnolipídeos são glicolipídeos tensoativos secretados por *P. aeruginosa* que contém uma ou duas moléculas de ramnose. Foram primeiramente estudados devido aos seus efeitos na biodegradação de compostos orgânicos, mas também é considerado um determinante de virulência devido às suas propriedades biocidas e seus efeitos deletérios em células eucarióticas (ESPINOSA-URGEL, 2003).

A virulência deste microrganismo envolve inúmeros exoprodutos, entre os quais se destacam os pigmentos piocianina e pioverdina e a exotoxina A.

P. aeruginosa sintetiza um pigmento azul conhecido como piocianina (1-hidroxi-5-metil-fenazina) que possui atividade bactericida contra ampla variedade de microrganismos (HASSETT et al., 1992). Piocianina induz apoptose em neutrófilos, diminui a concentração de glutatona reduzida - poderoso antioxidante - e aumenta a expressão de IL-8 e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) (ALLEN et al., 2005; FOTHERGILL et al., 2007; LOOK et al., 2005; O'MALLEY et al., 2004), apresentando toxicidade às células de mamíferos em concentrações micromolares (HASSETT et al., 1992).

Ferro é um elemento essencial para a maioria das bactérias e para adquirí-lo do ambiente, muitos microrganismos desenvolveram moléculas quelantes denominadas sideróforos (LEONI et al., 1996). Pioverdina é o principal sideróforo secretado por *P. aeruginosa* e regula a produção de, ao menos, três determinantes de virulência: exotoxina A, endoprotease e sua própria secreção, o que lhe confere papel crucial na patogênese bacteriana (LAMONT et al., 2002; MEYER et al., 1996). Em hospedeiros humanos e animais, o pigmento fluorescente pioverdina compete pelo elemento ferro ligado às proteínas transferrina e lactoferrina contidas nos fluidos extracelulares e às ferritina e hemoglobinas internalizadas em células. Embora considerado de menor relevância, a piocelina constitui outro sideróforo produzido e utilizado por *P. aeruginosa* para obtenção de ferro do meio ambiente (TAKASE et al., 2000).

A exotoxina A é uma proteína termo-lábil produzida pela maioria das cepas que causam infecções clínicas e possui mecanismo de ação similar ao da toxina diftérica, ou seja, cataliza a ADP-ribosilação e inativação do fator de alongação 2 (EF-2) de células eucarióticas, acarretando a inibição da biossíntese protéica e conseqüente morte celular (SALYERS; WHITT, 2002). Pode ser responsabilizada por invasão bacteriana, necrose tecidual e possivelmente imunossupressão. Estudos realizados *in vivo* reforçam a importância da ocorrência de exoenzima A em bacteremias e/ou mortalidade em cobaias (HIRAKATA et al., 1993). Atualmente, são conhecidas quatro toxinas secretadas por *P. aeruginosa* diretamente no citossol da célula hospedeira pelo sistema de secreção tipo III: exotoxina S, exotoxina Y, exotoxina T e exotoxina U. Maior importância na patogênese das infecções é conferida à exotoxina S (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006), enzima codificada pelo gene *exoS* que se localiza na região perinuclear em células eucarióticas e é processada a um fragmento solúvel apresentando dois domínios (PEDERSON et al., 2000). Caracteriza-se como uma citotoxina bifuncional por apresentar dois domínios ativos, um (C-terminal) com atividade ADP-ribosiltransferase e outro (N-terminal) atuando como proteína ativadora de RhoGTPase (GAP). A função patogênica de exoenzima S é atribuída principalmente à atividade de ADP-ribosiltransferase, a qual gera uma ruptura na organização normal do citoesqueleto celular (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Mutantes deficientes em *exoS* foram testados em modelo animal de infecções em queimaduras e a virulência apresentada foi ao menos 2000 vezes menor do que da cepa selvagem. Produção de exoenzima S é comum entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*, ocorrendo em cerca de 38% das cepas advindas de bacteremias e infecções em queimaduras (NICAS; IGLEWSKI, Os

principais determinantes de virulência de *P. aeruginosa* e suas respectivas funções estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo de fatores de virulência de *P. aeruginosa*

Atividades/Funções	Fatores de virulência
Adesinas	pili, cápsula polissacarídica, alginato
Invasinas	elastases, protease alcalina, hemolisinas (fosfolipases e lecitinase), leucocidina, sideróforos, piocianina
Motilidade/quimiotaxia	flagelo, pili
Toxinas	exoenzima S, exotoxina A, LPS
Propriedade antifagocítica	alginato, LPS
Defesa contra o poder bactericida do soro	alginato, LPS, proteases
Atributos genéticos	Alterações genéticas por transdução e conjugação, resistência natural a drogas, plasmídeos de resistência
Outros atributos	Adaptabilidade a requerimentos nutricionais mínimos, ubiquidade

Fonte: Adaptado de TRABULSI; LINCOPAN, 2008

2.4 Importância Clínica

O espectro de doenças causadas por este agente compreende desde infecções superficiais de pele até sepse fulminante (KISKA & GILLIAN, 2003).

P. aeruginosa é um importante agente etiológico de infecções nosocomiais sendo considerado o protótipo do microrganismo oportunista humano, isto significa que o microrganismo se utiliza de alguma falha no sistema imunológico do hospedeiro para dar início à infecção. É citado como causador de infecções do trato urinário; dermatites; infecções tegumentares e ósseas; ceratites e infecções sistêmicas; particularmente em pacientes imunocomprometidos, com queimaduras severas, câncer ou AIDS (BURNS et al., 1990), sendo o microrganismo mais encontrado em infecções respiratórias agudas em pacientes submetidos à ventilação mecânica e em infecções respiratórias crônicas em pacientes com FC (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

As infecções adquiridas na comunidade, como as foliculites e otites externas, tendem a ser localizadas e associadas ao contato com água contaminada (KISKA; GILLIAN, 2003).

No Brasil, relatos do programa de vigilância e controle de infecções SENTRY (*Sentry Antimicrobial Surveillance Program*) reportam que *P. aeruginosa* é o agente mais frequente em infecções de vias aéreas inferiores e o segundo patógeno relacionado às infecções urinárias e de tegumento em pacientes hospitalizados (SADER et al., 2001b). Sua importância clínica tem se elevado significativamente em razão da gravidade das infecções, das altas taxas de morbi-mortalidade em pacientes hospitalizados e de contínuos fracassos terapêuticos (TORRES et al., 2006), consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como de resistência intrínseca e adquirida a diversos agentes antimicrobianos (TRABULSI; LINCOPAN, 2008).

2.5 Resistência aos Agentes Antimicrobianos

P. aeruginosa apresenta altos níveis de resistência intrínseca a diversos agentes antimicrobianos como macrolídeos, tetraciclina, co-trimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim), fluoroquinolonas e β -lactâmicos; resistência esta, decorrente da integração de diferentes fatores como baixa permeabilidade de sua membrana externa, expressão constitutiva de vários sistemas de efluxo e produção de enzimas inativadoras de drogas. (HANCOCK; SPEERT, 2000). Não obstante, a exposição prévia aos antimicrobianos confere a *P. aeruginosa* uma notável capacidade de desenvolver ou adquirir mecanismos de resistência a qualquer um destes agentes. (DRISCOLL; BRODY; KOLLEF, 2007).

Devido à resistência natural ou adquirida frente a grande variedade de antimicrobianos utilizados na prática médica, as opções terapêuticas tornam-se restritas, sendo indicado o uso de associação entre um betalactâmico e outro antimicrobiano, geralmente aminoglicosídeo ou quinolona (NORDMANN, 2003).

Dentre os vários β -lactâmicos, os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são considerados as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes às cefalosporinas devido ao seu largo espectro de atividade e sua estabilidade à hidrólise causada pela maioria das betalactamases (LIVERMORE, 2001; TORRES et al., 2006). Entretanto, cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos têm

sido isoladas frequentemente e diferentes mecanismos de resistência do microrganismo em relação a esta classe de antimicrobianos são conhecidos, como: perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa (porinas) associada à hiperprodução de β -lactamases da classe C de Ambler (*AmpC*) e hiperexpressão de bombas de efluxo, ambos propiciando a redução da entrada do antibiótico na célula bacteriana (LIVERMORE, 2001; QUINN, 1998). Nestes casos a resistência aos carbapenêmicos é normalmente observada em baixos níveis (CIM de 8 a 32 μ g/mL) e a resistência ao imipenem ocorre em consequência da baixa expressão de porinas OprD, sendo este mecanismo dependente da expressão continuada de β -lactamase *AmpC* cromossomal. A resistência ao meropenem pode aumentar através da alta expressão do sistema de efluxo MexAB-OprM (POOLE et al, 1993; LIVERMORE, 1995).

Em *P. aeruginosa*, além da β -lactamase cromossômica, grande número de β -lactamases mediadas por plasmídeos ou transposons foi detectado (PITT, 1998). Nos últimos anos grande variedade de β -lactamases plasmidiais tem sido detectada em *P. aeruginosa*, incluindo β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) e enzimas que hidrolisam carbenicilina. As ESBLs, pertencem à classe A de Ambler (TEM, SHV, PER-1 e VEB-1) (NORDMAN; GUIBERT, 1998), enquanto as oxacilinasas OXA-2 a 19 e carbenicilinasas (CARB-3 e CARB-4) pertencem à classe D de Ambler (POIREL; COLLET; NORDMANN, 2000).

2.6 Metallo- β -lactamases

Atualmente, um dos mecanismos de resistência adquirida de grande interesse consiste na produção de metallo- β -lactamases (M β LS), enzimas que possuem largo espectro de ação sobre os betalactâmicos comercialmente disponíveis, como: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e inibidores de betalactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico) (TORRES et al., 2006). Estas enzimas, classificadas como β -lactamases da classe B de Ambler, não apresentam ação sobre monobactâmicos, como o aztreonam, e requerem cátions divalentes, geralmente zinco (Zn^{2+}), como cofatores tendo sua atividade inibida por agentes quelantes, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido mercaptopropiônico (BUSH, 1998).

As M β LS são produzidas intrinsicamente por determinados microrganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Legionella gormanni*, *Aeromonas spp.*, e outros (AVISON et al., 2001; SIMM et al., 2001; SPENCER et al., 2001). Contudo, desde o início da década de 90, novos genes que codificam

MβLs têm sido encontrados em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e membros da família *Enterobacteriaceae* (ROSSOLINI et al., 1998; RICCIO et al., 2005).

Até 2007 eram conhecidas seis subclasses de MβLs adquiridas: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM e AIM codificadas pelos seus respectivos genes: *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SMP}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* e *bla_{AIM}* e descritas em diversos países da América do Norte, América Latina, Ásia, Europa e Austrália, sendo as subclasses IMP e VIM as únicas a apresentar variantes (CASTANHEIRA et al., 2003, 2004; GALANI et al., 2004; GALES et al. 2003b; KOH et al., 2004; PATZER et al., 2004; POIREL; NORDMANN, 2002; RICCIO et al., 2000; TOLEMAN et al., 2005; TYSALL et al., 2002; WALSH et al., 2003, 2005; YAN et al., 2001; YONG et al., 2007). Entretanto, recentemente foi descrita no Japão em uma cepa de *Citrobacter freundii* a mais nova subclasse dentre as MβLs, a KHM-1 (SEKIGUCHI et al., 2008).

As MBLs adquiridas, com exceção da SPM-1, são usualmente codificadas por cassetes de genes inseridos em integrons de classe 1 ou classe 3 e localizados no interior de cromossomos ou de plasmídeos (MENDES et al., 2004; PATZER et al., 2004; TOLEMAN et al., 2003; WALSH et al., 2003).

2.6.1 São Paulo metalo-β-lactamase (SPM-1)

A terceira subclasse de MβL adquirida, SPM-1, foi encontrada pela primeira vez, em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado do trato urinário de uma criança hospitalizada no Complexo Hospitalar São Paulo/UNIFESP (TOLEMAN et al., 2002). Em 2003, Gales et al. avaliaram isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes recuperados de hospitais de distintas regiões brasileiras como Salvador, Fortaleza, Brasília, São Paulo, Santo André e, no Estado do Paraná, em Curitiba, Maringá e Londrina e relataram a emergência e disseminação de um clone epidêmico nos hospitais de todos os estados avaliados, que recebeu a denominação de clone SP - São Paulo (GALES et al., 2003a).

O relato de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 em isolados clonais de diversos hospitais de Recife ocorreu em 2004 (POIREL et al., 2004). Em 2005, Zavascki et al. descreveram um surto de *P. aeruginosa* multirresistente em um hospital-escola no Rio Grande do Sul. Entre os 135 isolados analisados, 21 transportavam o gene *bla_{SPM-1}*, a caracterização

molecular revelou a presença de um clone com quatro subtipos entre estas amostras (ZAVASCKI et al., 2005).

Em 2006, Marra et al. relataram a análise de amostras de *P. aeruginosa* isoladas em hemoculturas, entre os anos de 2000 e 2002, em um hospital do estado de São Paulo. Entre as 76 amostras incluídas no estudo, quatro apresentaram o gene *bla*_{SPM-1}, duas o gene *bla*_{IMP-1} e uma o gene *bla*_{IMP-16} (MARRA et al., 2006).

Quando Tolemann et al. (2002) descreveram SMP-1, sua sequência genômica foi comparada com as de outras MβLs e a maior identidade foi encontrada para a IMP-1 (35,5%). A sequência da SPM-1 difere significativamente de IMP e VIM, apresentando uma inserção de 24 aminoácidos logo após o sítio ativo. Esta inserção mostrou ser muito flexível e atua como um alça, provavelmente aumentando a ligação da enzima ao antimicrobiano β-lactâmico e sua consequente hidrólise (WALSH, 2005).

O gene *bla*_{SPM-1} não está associado a integrons, mas ao elemento CR₄ (*conserved region*), fazendo parte de uma ilha de patogenicidade genômica móvel encontrada em um plasmídeo de aproximadamente 180 kb (POIREL et al., 2004). Comparados a integrons e transposons, mas muito menores, os elementos CR facilitam a mobilização de genes (WALSH et al., 2005). O gene desta enzima, *bla*_{SPM-1}, parece estar especificamente relacionado à *P. aeruginosa*, uma vez que até o momento, não foi encontrado em outra espécie bacteriana. Além disso, cepas de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foram relatadas apenas no Brasil até o momento, com disseminação em diferentes regiões (GALES et al., 2003a).

Estudos têm mostrado que infecções por cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MβLs resultam em mortalidade maior do que as infecções causadas por isolados não produtores destas enzimas (LAUPLAND et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006). Os isolados de *P. aeruginosa* MβLs positivos são geralmente resistentes a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas; entretanto, geralmente permanecem sensíveis às polimixinas (WALSH et al., 2005). As polimixinas, representadas pela polimixina B e colistina, atuam na membrana citoplasmática de bactérias gram-negativas, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática, levando à morte celular, entretanto estes antimicrobianos deixaram de ser comercializados no Brasil no início dos anos 80 devido à sua alta toxicidade (LEVIN et al., 1999).

Atualmente, com a alta taxa de resistência aos antimicrobianos, e consequente falta de opção para tratamento de paciente infectado por uma cepa multirresistente, apresentando sensibilidade apenas à polimixina B, o uso deste antimicrobiano tornou-se mais frequente e inclusive já pode ser constatada resistência a esta substância (YOUNG et al., 1992).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, L. et al. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. **J. Immun.**, v.174, n.6, p.3643-3649, mar.2005.

AVISON, M. B. et al. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v.45, n.2, p. 413-419, feb.2001.

BERKA, R. M.; GRAY, G. L.; VASIL, M. L. Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.**, v.34, n.3, p.1071-1074, dec.1981.

BEVER, R. A.; IGLEWSKI, B. H. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. **J. Bacteriol.**, v.170, n.9, p.4309-4314, sep.1988.

BRYAN, L. E.; KUREISHI, A; RABIN, H. R. Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate extracellular polysaccharide in animals and cystic fibrosis patients by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.18, n.2, p.276-282, aug.1983.

BURNS, F. R. et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and *Pseudomonas* keratitis using a thiol-based peptide. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v.34, n.11, p.2065-2069, nov.1990.

BUSH, K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. **Clin. Inf. Dis.**, v. 27, suppl.1, p.48-53, sep.1998.

CASTANHEIRA, M. et al. Characterization of mobile elements carrying metallo-beta-lactamase (M β L) genes, *blaIMP-1*, *blaIMP-16*, *blaSPM-1*, *blaVIM-2* from Latin American Medical Centers: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Abstract Book of 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Chicago, IL, September 14-17, Abstract n $^{\circ}$. C2-2023, p.153, 2003.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Washington, v.48, n.12, p. 4654-4661, dec.2004.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n.5418, p.1318-1322, may1999.

CRISTINA, A. G.; COSTERTON, J. W. Bacteria – laden biofilms – a hazard to orthopedic prostheses. **Infect Surg.**, v.3, p.655-662, 1984.

DASGUPTA, M. K.; COSTERTON, J.W. Significance of biofilm adherent bacterial microcolonies on Tenckhoff catheters in CAPD patients. **Blood Purif.**, v.7, n.2-3, p.144-155, 1989.

DELLEN, C. V.; IGLEWSKI, B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n. 4, p.551-560, oct.-dec.1998.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microb. Rev.**, v.15, n.2, p.167-193, apr.2002.

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.

ESPINOSA-URGEL, M. Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. **J. Bacteriol.**, v.185, n.3, p.699-700, feb.2003.

FELDMAN, M. et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **Infect. Immun.**, v.66, n.1, p.43-51, jan.1998.

FERREIRA, L. L. **Estrutural Clonal e Multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. 2005. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo.

FOTHERGILL, J. L. et al. Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. **BioMed Central Microbiology**. 7 (45), 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/45>>. Acesso em : 15 abr. 2009.

GALANI, I. et al. First identification of an *Escherichia coli* clinical isolate producing both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, n. 8, p.757-760, aug.2004.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother**, v.52, n.4, p.699-702, sep.2003a.

GALES, A. C. et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagn. Microbial. Infect. Dis.**, v.45, n.1, p.77-79, jan.2003b.

GILARDI, G. L. *Pseudomonas* and Related Genera. In: Balows, A. et al. . **Manual of Clinical Microbiology**. 5th ed. ASM Press: Washington D.C. 1991, p. 429-440.

GLORIA, D. Cystic fibrosis series I. Journal of Microbiology & Biology Education – vol 8, 2007. **American Society of Microbiology**. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/>>. Acesso em: 23 dez. 2008.

GRUNDMANN, H. et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.3, p.528-534, mar.1995.

HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resist. Update**, v.3, n.4, p.247-255, aug.2000.

HASSETT, D. J. et al. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infect. Immun.**, v.60, n.2, p.328-336, feb.1992.

HECK, L. W. et al. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infect. Immun.**, v.51, n.1, p.115-118, jan.1986.

HENTZER, M. et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. **J. Bacteriol.**, v.183, n.18, p.5395-5401, sep.2001.

HIRAKATA, Y. et al. In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. **Infect. Immun.**, v.61, n.6, p.2468-2473, jun.1993.

JAFFAR-BANDJEE, M. C. et al. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infect by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.4, p.924-929, apr.1995.

JAGGER, K. S.; BAHNER, D. R.; WARREN, R. L. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.17, n.1, p.55-59, jan.1983.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med. et Maladies Infect.**, v.36, n.2, p.78-91, feb.2006.

KISKA, D. L.; GILLIAN, P. H. *Pseudomonas*. In: Murray, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. ASM Press: Washington D.C. 2003, p 1212.

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

KOWALESWSKA-GROCHOWSKA, K. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. **Chest.**, v.100, n.4, p.1090-1095, oct.1991.

LAMONT, I. L. et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS.**, v.99, n.10, p.7072-7077, may 2002.

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

LEONI, L. et al. Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. **J. Bacteriol.**, v.178, n.8, p.2299-2313, apr.1996.

- LEVIN, A. S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin.Infect. Dis.**, v.28, n.5, p.1008-1111, may1999.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol.**, v.8,n.4, p.557-584, oct.1995.
- LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v.47, n.3, p.247-250, 2001.
- LOOK, D. C. et al. Pyocyanin and its precursor phenazine-1-carboxylic acid increase IL-8 and ICAM-1 expression in human airway epithelial cells by oxidant-dependent mechanisms. **J. Immunol.**, v.175, n.6, p.4017-4023, 2005.
- MARRA, A. R. et al. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.1, p.388-390, jan.2006.
- MARRIE, T. J.; SUNG, J. Y.; COSTERTON, J. W. Bacterial biofilm formation on nasogastric tubes. **J. Gast. Hepatol.**, v.5, n.5, p.503-506, sep-oct 1990.
- MENDES, R. E. et al. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla_{IMP-16}* and fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30laac(6')-lb'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.12, p.4693-4702, dec.2004.
- MEYER, J-M. et al. Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.**, v.64, n.2, p.518-523, feb.1996.
- MOOLENAR, R. L. et al. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.21, n.2, p.80-85, feb.2000.
- MORIHARA, K.; TSUZUKI, H. Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients. **Infect. Immun.**, v.15, n.3, p.679-685, mar.1977.
- NICAS, T. I.; IGLEWSKI, B. H. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in production of exoenzyme S. **Infect. Immun.**, v.45, n.2, p.470-474, aug.1984.
- NICKEL, J. C.; DOWNEY, J. A.; COSTERTON, J. W. Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. **Urology**, v.34, n.5, p.284-291, nov.1989.
- NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v.42,n.2, p.128-131,1998.
- NORDMANN, P. Mechanism of resistance to betalactam antibiotics in *P. aeruginosa*. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, v.22, p.527-530, 2003.

OKUDA, K. et al. Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. **Infect. Immun.**, v.58, n.12, p.4083-4088, dec. 1990.

O'MALLEY, Y. Q. et al. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. **Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.**, v.287, p.L94-L103, mar.2004.

OSTROFF, R. M.; VASIL, A. I.; VASIL, M. L.. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v.172, n.10, p.5915-5923, oct.1990.

PATZER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*VIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). **J. Antimicrob. Chemother.**, v.53, n.3, p.451-456, jan.2004.

PEDERSON, K. J. et al. Intracellular localization and processing of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS in eukaryotic cells. **Mol. Microbiol.**, v.37, n.2, p.287-299, jul. 2000.

PITT, T. L. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. P1115-1138. In: Collier, L.; Balows, A., Sussman, M. (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. **Systematic bacteriology**. 1998, v.2.

POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerg Inf Dis.**, v.6, p.84-85, 2000.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v.3, n.2, p.117-127, 2002.

POIREL, L. et al. Molecular analysis of metallo- β -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, apr.2004.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G. L.; Benneths, J. E.; Dolin, R. (eds). **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5thed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2000, p.2310-2335.

POOLE, K. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J. Bacteriol.**, v.175, p.7363-7372, 1993.

QUINN, J. P. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. **Clin. Infect. Dis.**, v.27, n.1, p.S117-S124, aug.1998.

RICCIO, M. L. et al. 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, p.1229-1235, may 2000.

RICCIO, M. L. et al. Clonal relatedness and conserved integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo-

β -lactamase from different Italian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.49, n.1, p.104-110, jan.2005.

ROSSOLINI, G. M. et al. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile. **Biochem J.**, v.332(Pt 1), p.145-152, 1998.

SADER, H. S.; SILBERT, S. **Identificação de bacilos Gram-negativos não-fermentadores** – Procedimentos de Rotina. Programa de Excelência em Microbiologia (PEM) nº 8, 2000.

SADER, H. S. **Abordagem Laboratorial de *Pseudomonas aeruginosa*** . Manual de Procedimentos para o Controle de Qualidade dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Programa de Excelência em Microbiologia (PEM) nº 3, 2001a.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.5, n.4, p.200-214, aug.2001b.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D.. *Pseudomonas aeruginosa* and related species, a lesson in versatility. In:___ **Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach**. 2 ed. ASM Press. Washington, D. C. 2002, p. 247-262.

SEKIGUCHI, J. et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.52, n.11, p.4194-4197, nov.2008.

SIMM, A. M. et al. A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. **FEBS Lett.**, v.509, n.3, p.350-354, 2001.

SOUZA, L. B. S. et al. Fatores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Soc. Bra. Clin. Med.**, v.4, n.1, p.6-10, jan.-fev. 2006.

SPENCER, J. et al. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic β -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- β -lactamase. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.36, p.33638-33644, 2001.

STEHLING, E. G. **Estudo comparativo dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de fibrose cística e outras infecções**. 1999. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.406, n. 6799, p.959-964, aug. 2000.

TAKASE, H. et al. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. **Infect. Immun.**, v.68, n.4, p.1834-1839, apr.2000.

TODAR, K. *Pseudomonas aeruginosa*. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology, 2004 Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>> Acesso em: 03 abr. 2009.

TODER, D. S. et al. *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. **Infect. Immun.**, v.62, n.4, p.1320-1327, apr.1994.

TOLEMAN, M. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.50, n.5, p.673-679, nov.2002.

TOLEMAN, M. A. et al. Genetic characterization of a novel metallo-b-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.**, v.52, n.4, p.583-590, sep.2003.

TOLEMAN, M. A. et al. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.55, n.1, p.61-70, jan.2005.

TORRES, J. C. N. et al. Cepas de *Pseudomonas spp.* produtoras de metalo-betalactamases isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.5, p.313-319, out. 2006.

TRABULSI, L. R.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed., São Paulo: Atheneu. 2008, p. 369-381.

TYSALL, L. et al. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolated from the UK. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.49,n.1, p.217-218, jan.2002.

WALSH, T. R. et al. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.52, n.1, p.116-119, jul. 2003.

WALSH, T. R. et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clin. Microbiol. Rev.** v.18, n.2, p.306-325, apr.2005.

YAN, J. J. et al. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.8, p.2224-2228, aug. 2001.

YONG, D. et al. A novel sub-group metallo-b-lactamases (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. American Society for Microbiology, Washington DC. C1-59375, 2007.

YOUNG, M. L. et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.36, n.11, p.2566-2568, nov.1992.

ZAVASCKI, A. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.56, n.6, p.1148-1151, oct.2005.

ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L.; FERNANDES, J. F.; MORO, A. L. D.; GONÇALVES, A. L. S.; GOLDANI, L. Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Crit. Care**, v.10, n.4, R114, aug.2006.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença de genes e a expressão de determinados fatores de virulência em cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBL SPM-1, isoladas de diversos materiais clínicos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina (HU) – Paraná, no período de 2003 a 2005, e compará-los com isolados não produtores de MBL e que apresentaram diferentes perfis de sensibilidade aos carbapenêmicos.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Caracterizar fenotipicamente a expressão de protease alcalina, elastases, fosfolipase C, hemolisinas e dos pigmentos pioverdina e piocianina nos isolados de *P. aeruginosa*;

4.2.2 Avaliar a adesão dos isolados de *P. aeruginosa* em microplacas de poliestireno;

4.2.3 Detectar a presença de genes que codificam a produção das enzimas protease alcalina, elastase A, elastase B, fosfolipase C hemolítica, fosfolipase C não-hemolítica, exotoxina A e a presença do gene *algD*, um dos genes do cluster que codifica a síntese do exopolissacarídeo alginato, associado com a formação de biofilme;

4.2.4 Analisar a expressão dos fatores de virulência e/ou a presença dos genes de virulência em MBL SPM-1 e correlacionar com isolados não produtores de MBL intermediários ou resistentes ao imipenem (IPM I/R) e não produtores de MBL sensíveis ao imipenem (IPM S).

4.2.5 Analisar a frequência de expressão dos diversos fatores de virulência pesquisados nos diferentes materiais clínicos.

Comparative study of virulence factors between SPM-1 metallo- β -lactamase producers and non producers *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

Fernanda Martini de L. N. Prado¹, Floristher E. Carrara-Marroni² & Jacinta S. Pelayo¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; ²Departamento de Análises Clínicas e Patologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

Correspondence: Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, 86051-990 Londrina, PR, Brazil. Tel.: +55 43 33714494; fax: +55 43 33714788; e-mail: jspelayo@gmail.com

Running title: Virulence factor in SPM-1 M β L and non SPM-1 M β L *P. aeruginosa*

Abstract

The invasion, colonization and tissue damage induced by *Pseudomonas aeruginosa* are attributed to the many virulence factors produced by this microorganism during pathogenic processes. Nosocomial infections caused by clinical isolates of SPM-1 metallo- β -lactamase (SPM-1 M β L) *P. aeruginosa* present high rates of morbidity and mortality, representing an epidemic risk. The objective of this study was to evaluate the expression of the alkaline proteases, phospholipases C, elastases, pyocyanin, pyoverdine, hemolysins, biofilm formation and the presence of the related virulence genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcN*, *plcH*, *toxA* and *algD* in 98 clinical isolates of *P. aeruginosa*. Thirty-nine producing and 59 non producing SPM-1 M β L were analyzed (20 isolates intermediate or resistant to imipenem - IPM I/R and 39 isolates imipenem susceptible - IPM S). The virulence factors expression varied in percentages among three groups: SPM-1 M β L; IPM I/R and IPM S. The correlation among expression frequency of the different virulence factors studied showed statistically significant results only for hemolysins ($P = 0.001$). No statistical significance was observed between *P. aeruginosa* SPM-1 M β L and non SPM-1 M β L when virulence genes detection was analyzed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; SPM-1 metallo- β -lactamase; virulence factors.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for a wide spectrum of nosocomial infections and outbreaks that are difficult to control, particularly in hospitalized patients in Intensive Treatment Units (ITUs), immunosuppressed individuals, patients with extensive burns and individuals harboring Cystic Fibrosis (CF) (Obritsch *et al.*, 2005).

The nosocomial infections related to *P. aeruginosa* are frequently severe, presenting high rates of morbidity and mortality (Blot *et al.*, 2003). Several virulence factors contribute to the pathogenicity of these microorganisms, including biofilm formation, expression of adhesins, endotoxins and hydrolytic exotoxins causing tissue destruction and induction of

cytokines release. In general, the antimicrobial therapy of *P. aeruginosa* infections is complicated by its ability to adapt during the treatment course, developing mutations in the chromosomal genes and by its facility to acquire resistance determinants to antimicrobials by horizontal gene transference. The combination of these factors leads to the development of antimicrobial multiresistance phenotype that damages and limits the selection of effective treatments (Driscoll *et al.*, 2007; Mesaros *et al.*, 2007).

The carbapenems, mainly imipenem and meropenem, are considered the most potent β -lactamics for the treatment of multidrug-resistant *P. aeruginosa* infections. This fact is due to penetration facility of these antimicrobials through the bacterial outer membrane and the stability presented by the majority of the β -lactamases produced by these microorganisms. However, the extensive use these antimicrobials in hospital environments has resulted in the emergence and dissemination of these classes of drug resistant bacteria (Giamarellou, 2002). One of the main resistance mechanisms to carbapenems presented by *P. aeruginosa* is metallo- β -lactamases (M β LS) production; acquired carbapenemases that have hydrolytic activity for all β -lactams, including carbapenems, with the exception of only aztreonam monobactam. Clinical isolates of M β LS producing *P. aeruginosa* represent an epidemiological risk because their resistance determinants could disseminate easily through horizontal transference among different replicons and strains, intra and inter specimens (Queenan & Bush, 2007).

To date, seven subclasses of acquired M β LS have been described: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM and KHM (Walsh *et al.*, 2005; Yong *et al.*, 2007; Sekiguchi *et al.*, 2008). In Brazil, the subclass denominated São Paulo metallo- β -lactamase (SPM-1 M β L) is the most frequently acquired carbapenemase and to date it is restricted to the Brazilian territory. Studies in Brazilian hospitals have demonstrated that nosocomial infections caused by clinical isolates of *P. aeruginosa* producers of SPM-1 M β L were associated to increased rates of mortality when compared with infections associated to SPM-1 M β L non-producer isolates, a fact that is probably related to employment of inadequate empirical therapy (Marra *et al.*, 2006; Zavascki *et al.*, 2006). Starting from enzyme characterization in 2002 (Toleman *et al.*, 2002), *P. aeruginosa* clinical isolates harboring the *bla*_{SPM-1} gene have been reported in many hospitals in several Brazilian states, generally associated to multi resistance phenotype, including the Hospital Universitário (HU) of Londrina-PR (Gales *et al.*, 2003; Zavascki *et al.*, 2005).

The objective of the present study was evaluate some virulence factors associated to the infections caused by *P. aeruginosa* and verify if the isolates producing or not SPM-1 M β L harbored virulence genes and expressed important virulence factors during infections development. Thus, were analyzed strains of *P. aeruginosa* producing SPM-1 M β L, SPM-1 M β L non-producing strains and intermediate or resistant strains to imipenem (IPM I/R) and imipenem susceptible SPM-1 M β L non-producing strains (IPM S) were analyzed, recovered from several clinical specimens.

Materials and methods

Bacterial strains

P. aeruginosa strains were isolated from clinical specimens obtained from the Clinical Microbiology Laboratory at the Hospital Universitário (HU), a 317-bed teaching hospital located in Londrina, Paraná State, Brazil, from March 2003 to March 2005. A total of 98 non-duplicate clinical isolates of *P. aeruginosa* were included in this study. The first group consisted of 39 multi clone strains producing SPM-1 M β L. The second group contained 20 isolates intermediate or resistant to imipenem that did not produce SPM-1 M β L and a third group containing 39 strains susceptible to imipenem that did not produce SPM-1 M β L. The characteristics of the strains used in this study are described in Tables 1 and 2. The bacterial identification, susceptibility tests, SPM-1 M β L identification and molecular typing of SPM-1 M β L strains were determined by Carrara-Marroni as part of a doctorate thesis (unpublished data).

Enzyme assays

At the time of the experiment, the strains were incubated overnight at 37 °C on Trypticase soy broth (TBS) and suspensions were comparatively adjusted to the tube one of the MacFarland scale in sterile PBS pH 7.2. The enzyme activities of the *P. aeruginosa* clinical isolates were evaluated by spot (5 uL) inoculations. All substrate plate assays were incubated for 48 h at 37 °C unless otherwise specified. All the experiments were carried out in triplicate. The reference strains ATCC27853 and ATCC15692 (PA 01) (Stover *et al.*, 2000) were used as positive controls.

Alkaline protease and elastase production were measured according to the method by Jagger *et al.* (1983). The clearing around the inoculated spots on skim milk (2%) agar plates was measured indicating proteolytic activity. Elastolytic activity was assessed on 1% elastin agar plates and the zone of clearance measured. Plates were initially incubated at 37° C for 48

h and then transferred to room temperature for a further 5 days. The clearing of the opaque medium around the inoculum spot showed elastase production. The method described previously by Habermann & Hardt (1972) was used to estimate the phospholipase C production with some modifications. The strains were inoculated on Trypticase soy agar (TSA) plates enriched with 10% (vol/vol) egg yolk and a white precipitate around or beneath the inoculum spot indicated phospholipase C production. Hemolysis around individual colonies on TSA containing 5% sheep blood was evaluated after 24 h at 37 °C. *Pseudomonas* agar F and *Pseudomonas* agar P were used to verify pyoverdine and pyocyanin production, respectively. Pyoverdine production was observed as a green-yellow fluorescent pigment in the colonies and surrounding medium under short wavelength UV light (366 nm). The plates were initially incubated at 37 °C for 48 h and then transferred to room temperature for a further seven days and were observed daily. The pyocyanin production was detected by the formation of blue-green non fluorescent pigment surrounding the inoculum spot.

Biofilm formation assay

A modified micro titer-plate test, as described by Stepanovic *et al.* (2000), was used to determine the biofilm formation capacity of all the *P. aeruginosa* strains. The strains were incubated for 24 h at 37 °C in TSB supplemented with 1% D (+) glucose (TSBG). The cultures were diluted 1:200 in TSBG and 200 µL of the suspensions were inoculated in sterile 96-well polystyrene micro plates and incubated for 24 h at 37 °C. Negative control wells contained broth only. The content of each well was aspirated and the wells were rinsed three times with 250 µL PBS pH 7.2. The remaining attached bacteria were fixed with 200 µL methanol P.A. for 15 min and air-dried. The plates were stained for 5 min with 200 µL 2% crystal violet and excess staining was rinsed under running tap water. After the plates were air-dried, the optical density (OD_{550 nm}) of each well was measured with a Micro-ELISA Auto reader (MultiScan EX, Labsystem, Uniscience). Each experiment was performed in triplicate. The O.D. cut-off (O.Dc) was defined as three standard deviations above the mean O.D. of the negative control. The strains were classified as following: non-adherent (O.D. ≤ O.Dc), weakly adherent (O.Dc < O.D. ≤ 2 x O.Dc), moderately adherent (2 x O.Dc < O.D. ≤ 4 x O.Dc) and strongly adherent (4 x O.Dc < O.D.).

Virulence genes detection by PCR

The detection of virulence genes encoding alkaline protease (*aprA*), elastase A (*lasA*), elastase B (*lasB*), hemolytic phospholipase C (*plcH*), non-hemolytic phospholipase C (*plcN*),

exotoxin A (*toxA*) and alginate (*algD*) was determined by PCR. The primers sequences used are described in Table 3. The PCR reaction was performed as described by Lanotte *et al.* (2004), with modifications. The total DNA extraction was obtained by boiling the bacterial cells for 15 min. Amplification reactions were carried out in a 25 μ L final volume containing 2 μ L of bacterial lysates, 2.5nM of each dNTP, 20 pmol each primer, 2 mM MgCl₂ and 1.0 U *Taq* DNA polymerase in 10X reaction buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA). The DNA was amplified in a Peltier Thermal Cycler using the following protocol: 94 °C for 3 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min 30 s, and 72 °C for 5 min. Each gene was amplified separately. The PCR products were detected after electrophoresis on 1% or 2% agarose gel, stained with ethidium bromide solution (0.05 μ g/mL) at 100 V for 55 min and detected by UV transillumination (ECX-20M, France). The ATCC15692 (PA 01) strain was used as positive control.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the SAS - Statistical Analysis System (version 9.1). *P* values were calculated by the chi-square (χ^2) test and the Fisher's exact test. *P* values of < 0.05 were considered significant.

Results and discussion

Phenotypic profile and statistical analysis of virulence factors in *P. aeruginosa* clinical isolates

Currently, the only study present in the literature that evaluated the virulence of *P. aeruginosa* harboring a MBL gene was conducted by Aoki *et al.* (2004) who analyzed the capacity of *P. aeruginosa* harboring *bla*_{IMP} to cause invasive infection and verified that this gene did not decrease the strains invasion or capacity to cause *in vivo* bacteremia when compared to the non harboring gene mutant strains. Expression of virulence factors was detected in high percentages in three groups of the analyzed *P. aeruginosa*, with the exception of the elastases production that presented percentages above 50% for all groups. Biofilm formation was observed in 100% of the isolates at variable degrees of adhesion (data not shown). The frequency of virulence factors in the three groups of *P. aeruginosa* clinical isolates studied is presented in Table 4. The phenotypic expression frequency of different virulence factors correlated among the groups SPM-1 MBL, IPM I/R and IPM S, showed statistical significance only for hemolysins detection (*P* = 0.001). The results of the hemolytic assays showed that the hemolysins production was directly proportional to the carbapenems resistance levels, it

means that the hemolysins expression frequency was statistically significant in the SPM-1 MBL group compared to the IPM I/R and IPM S groups. According to Delden & Iglewski (1998), hemolytic phospholipase C and rhamnolipid are two hemolysins produced by *P. aeruginosa* that could act in a synergic manner to degrade lipids and lecithins, that both contribute to the tissue invasion because of their cytotoxic effects. In addition to erythrocyte lyses, the hemolysins can damage other eukaryotic cells such as human fibroblasts, monocytes, granulocytes and endothelial cells (Jürgens *et al.*, 2002).

Genotypic profile and statistical analysis of virulence factors in *P. aeruginosa* clinical isolates

Table 5 shows the frequency of virulence genes detection in the three different groups of *P. aeruginosa* researched. A high percentage (superior or equal to 90%) of the virulence factors genes: *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH*, *plcN*, *exoA* and *algD* was verified in the three groups analyzed: SPM-1 MBL, IPM I/R and IPM S, but there was no statistical relevance among these groups. These results were expected, considering that after the whole genome sequencing of PA01 by Stover *et al.* (2000), several studies have compared the genome of this reference strain with clinical and environmental isolates of *P. aeruginosa* and have shown that this bacteria possesses a highly conserved genome among isolates of different places and infection types, demonstrating remarkable conservation of the necessary survival genes, including those codifying the most important known virulence factors (Fonseca *et al.*, 2007).

In addition to the environmental conditions, such as iron concentration, nitrogen level, osmolarity and others, the regulation of *P. aeruginosa* virulence genes expression is quite complex and involves several regulation systems, a fact that could explain the divergent data obtained with the elastase enzyme.

The *toxA* gene was detected among all the clinical isolates, although phenotypic tests were not carried out to evaluate its frequency of expression. Sharma *et al.* (2004) suggested that exotoxin A secreted by *P. aeruginosa* is an important virulence factor during septicemia, pulmonary and corneal infections.

Phenotypic profile of *P. aeruginosa* virulence factors according to the clinical specimens

Differences in virulence factors production and in genes detection for external products such as proteases, elastases, phospholipase C and exotoxin A have been described for *P. aeruginosa* isolates from different infectious sites (Woods *et al.*, 1986; Hamood *et al.*, 1996; Lanotte *et al.*, 2004). According to the studies of Driscoll *et al.* (2007), the combination

of some virulence factors expressed by *P. aeruginosa* seems to determinate the syndromes that accompany each infection.

The expression of most virulence factors was observed among all the clinical isolates, with exception of elastase that was not expressed in corneal material. Production greater than 70% was observed for alkaline protease and phospholipase C in the isolates of all the clinical specimens, with exception of the corneal material where the expression was 50% (data not shown). Our results corroborated with the data obtained by Hamood *et al.* (1996), which suggested that elastase, phospholipase C and exotoxin A were expressed by *P. aeruginosa* isolates from different infectious sites, and the high production levels of elastase and phospholipase C were associated to all sites analyzed, while the exotoxin A expression was related to wound infections.

Values of pyocyanin expression greater than 70% occurred in body fluids, catheter tips, tissues and corneal material isolates. Pyoverdine expression was observed in more than 74% of the clinical strains recovered, with the exception of the isolates from tracheal secretions (data not shown). Hemolysins expression was verified in more than 80% of the strains from different clinical specimens, including urine isolates. These data corroborated the results obtained by Mittal *et al.* (2006), who verified an association between high levels of in vitro hemolysins expression and the colonization and multiplication capacity in rat renal tissues, that has great potential as the etiologic agent of pielonephritis presented by highly hemolytic strains.

The clinical importance of bacterial biofilm formation consists of the fact that they have been usually related to persistent infections, as in the cases of catheter and surgical implant infections (Donlan & Costerton, 2002). Our study verified biofilm formation capacity among all of the isolates analyzed.

Although some studies report that virulence determinants acquisition by bacterial strains during the infectious process could bring additional costs to the microorganisms (Sánchez *et al.*, 2002), the current knowledge about the *P. aeruginosa* genome indicates that the genes responsible for producing the virulence factors are dispersed in a genomic core and are not contained in a genomic pathogenicity island, and the genetic diversity among the isolates is attributed to frequent horizontal transference of genomic islands and accessory DNA segments (Fonseca *et al.*, 2007).

The results obtained in this study suggested that the virulence profile presented by *P. aeruginosa* clinical isolates did not correlate with the carbapenems resistance determinants. Regarding the pathogenic processes developed by the bacteria, it seems to be multifactorial because all the virulence factors analyzed were considered important and not dependent on the infection sites studied.

Reference

- Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, Gotoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kohno S & Kamihira S (2004) Virulence of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1876-1878.
- Blot S, Vandewoude K, Hoste E & Colardyn F (2003) Reappraisal of attributable mortality in critically ill patients with nosocomial bacteraemia involving *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect* **53**: 18-24.
- Delden CV & Iglewski BH (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**: 551-560.
- Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microb Rev* **15**: 167-193.
- Driscoll JA, Brody SL & Kollef, MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**: 351-368.
- Fonseca AP, Correia P, Sousa JC & Tenreiro R (2007) Association patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates as revealed by virulence traits, antibiotic resistance, serotype and genotype *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**: 505-516.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S & Sader HS (2003) Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **52**: 699-702.
- Giamarellou H (2002) Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother* **49**: 229-233.
- Habermann E & Hardt KL (1972) A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal Biochem* **50**: 163-173.
- Hamood AN, Griswold JA & Duhan CM (1996) Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. *J Surg Res* **61**: 425-432.
- Jagger KS, Bahner DR & Warren RL (1983) Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **17**: 55-59.
- Jürgens D, Özel M & Takaisi-kikuni NB (2002) Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Cell Biol Int* **26**: 175-186.

- Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-lari A, Goudeau A & Quentin R (2004) Genetic features *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol* **53**: 73-81.
- Lomholt JA, Poulsen K & Kilian M (2001) Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect Immun* **69**: 6284-6295.
- Marra AR *et al.* (2006) Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 388-390.
- Mesaros N. *et al.* (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* **13**: 560-578.
- Mittal R, Khandwaba RK, Gupta V, Mittal PK & Harjai K (2006) Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their association with mouse renal colonization. *Ind J Med Res* **123**: 67-72.
- Obritsch MD, Fish DN, Maclaren R & Jung R (2005) Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Rev Pharmacotherapy* **25**: 1353-1364.
- Queenan AM & Bush K (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**: 440-58.
- Sánchez P, Linares JF, Ruiz-díez B, Campanario E, Navas A, Baquero F & Martínez JL (2002) Fitness of *in vitro* selected *Pseudomonas aeruginosa nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* **50**: 657-664.
- Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanab N, Okazaki M, Miyoshi-akiyama T, Kanamori M & Kirikae T (2008) KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4194-4197.
- Sharma S, Kaur R, Yadav V, Harjai K & Joshi K (2004) Contribution of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in acute and chronic experimental renal infection. *Jpn J Infect Dis* **57**: 119-120.
- Stepanovic S, Vukovi'c D, Daki'c I, Savi'c B & Svabi'c-vlahovi'c M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth* **40**: 175-179.
- Stover C *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Toleman M, Simm A, Murphy T, Gales A, Biedenbach E, Jones RN & Walsh TR (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* **50**: 673-679.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L & Nordmann P (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **18**: 306-325.
- Woods DE, Schaffer MS, Rabin HR, Campbell GD & Sokol PA (1986) Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J Clin Microbiol* **24**: 260-264.
- Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA & Walsh TR (2007) A novel sub-group metallo-b-lactamases (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from

Australia. In: Abstracts of 47th *Intersc Conf Antimicrob Agents Chemother* American Society for Microbiology, Washington DC. abs C1-593 p 75.

Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro ALD, Gonçalves ALS & Goldani LZ (2006) Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care* **10**: R114.

Table 1. Characteristics of SPM-1 M β L producers *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Isolate	Date of isolation (day/month/year)	Clinical specimens	IPM MIC(ug/mL)	Genotypes
Pa 013	10/04/03	Urine	256	A
Pa 031	29/04/03	Exudate	256	A
Pa 041	16/06/03	Urine	128	B
Pa 131	26/08/03	Urine	256	B
Pa 129	17/09/03	Urine	256	B
Pa 139	29/09/03	Urine	256	B
Pa 213	12/11/03	Urine	128	H
Pa 164	17/11/03	Tissue	128	A
Pa 178	08/12/03	Urine	256	B
Pa 185	23/12/03	Urine	128	A
Pa 212	10/02/04	Exudate	128	A
Pa 225	05/03/04	Urine	512	A
Pa 243	12/04/04	Urine	64	A
Pa 314	06/07/04	Urine	64	E
Pa 557	07/07/04	Catheter tip	256	B
Pa 288	27/07/04	Urine	128	A
Pa 297	27/07/04	Urine	128	A
Pa 340	06/08/04	Exudate	256	C
Pa 337	09/08/04	Urine	128	B
Pa 549	19/08/04	Corneal material	16	A
Pa 524	15/09/04	Urine	16	A
Pa 349	17/09/04	Tissue	256	A
Pa 333	27/09/04	Cerebrospinal fluid	16	A
Pa 377	13/10/04	Tracheal secretion	128	C
Pa 525	25/10/04	Urine	512	B
Pa 540	04/11/04	Urine	256	B
Pa 537	12/11/04	Urine	64	K
Pa 521	13/12/04	Catheter tip	128	B
Pa 535	31/12/04	Urine	512	G
Pa 572	07/01/05	Ascitic fluid	128	B
Pa 413	10/01/05	Urine	128	C
Pa 573	17/01/05	Ascitic fluid	256	B
Pa 421	16/02/05	Exudate	256	B
Pa 424	02/03/05	Ascitic fluid	256	B
Pa 427	04/03/05	Urine	256	C
Pa 428	07/03/05	Urine	512	F
Pa 429	08/03/05	Urine	16	A
Pa 438	10/02/05	Urine	128	A
Pa 577	14/03/05	Catheter tip	256	B

Abbreviations: Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; IPM, imipenem

Table 2. Characteristics of SPM-1 M β L non-producers *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Isolates	Date of isolation (day/month/year)	Clinical specimens	IPM	
			MIC (μ g/mL)	S/I/R
Pa 046	12/02	Catheter tip	1	S
Pa 012	04/03	Peritoneal fluid	1	S
Pa 018	04/03	Urine	1	S
Pa 043	06/03	Urine	8	S
Pa 092	07/03	Exudate	2	S
Pa 128	09/03	Urine	4	S
Pa 130	09/03	Urine	2	S
Pa 140	10/03	Urine	4	S
Pa 145	10/03	Urine	2	S
Pa 157	11/03	Urine	2	S
Pa 189	12/03	Urine	0.25	S
Pa 181	12/03	Urine	4	S
Pa 183	12/03	Urine	2	S
Pa 199	02/04	Exudate	2	S
Pa 221	02/04	Corneal material	0.5	S
Pa 228	03/04	Urine	2	S
Pa 229	03/04	Urine	4	S
Pa 250	04/04	Tracheal secretion	1	S
Pa 298	06/04	Tracheal secretion	1	S
Pa 291	07/04	Urine	1	S
Pa 309	07/04	Exudate	2	S
Pa 311	07/04	Exudate	<1	S
Pa 289	07/04	Urine	1	S
Pa 284	07/04	Urine	1	S
Pa 307	08/04	Tissue	2	S
Pa 343	08/04	Urine	4	S
Pa 335	09/04	Urine	<4	S
Pa 357	10/04	Urine	4	S
Pa 359	10/04	Urine	4	S
Pa 518	10/04	Tissue	2	S
Pa 563	12/04	Ascitic fluid	2	S
Pa 517	12/04	Cerebrospinal fluid	4	S
Pa 522	12/04	Catheter tip	2	S
Pa 414	01/05	Pleural fluid	2	S
Pa 415	01/05	Urine	2	S
Pa 416	02/05	Urine	2	S
Pa 430	03/05	Urine	4	S
Pa 580	03/05	Exudate	1	S
Pa 417	12/05	Urine	1	S
Pa 168	01/03	Urine	128	R
Pa 030	04/03	Tissue	16	R
Pa 048	05/03	Bone	8	I
Pa 098	07/03	Urine	8	I
Pa 124	09/03	Tracheal secretion	32	R
Pa 125	09/03	Tracheal secretion	16	R
Pa 144	10/03	Urine	32	R
Pa 152	10/03	Tissue	16	R
Pa 161	11/03	Tissue	8	I
Pa 159	11/03	Urine	8	I
Pa 197	02/04	Exudate	16	R
Pa 246	04/04	Urine	32	R
Pa 275	04/04	Blood	16	R
Pa 274	06/04	Urine	32	R
Pa 278	06/04	Urine	16	R
Pa 339	07/04	Catheter tip	8	I
Pa 336	08/04	Urine	8	I
Pa 553	09/04	Blood	16	R
Pa 573	01/05	Ascitic fluid	128	R
Pa 432	04/05	Catheter tip	32	R

Abbreviations: Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; IPM, imipenem; S, susceptible; I, intermediate, R, resistant

Table 3. Oligonucleotide sequences used for virulence genes detection

Genes	Oligonucleotide sequence (5' – 3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>aprA</i>	F GTCCTATACCGTCGACCAGGC R GTCGCTACCCGAGCCGCCGAT	928	(Lomholt <i>et al.</i> , 2001)
<i>lasA</i>	F CGCCATCCAACCTGATGCAAT R AGGCCGGGGTTGTACAACGGA	514	(Lomholt <i>et al.</i> , 2001)
<i>lasB</i>	F GGAATGAACGAAGCGTTCTC R GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	300	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)
<i>plcH</i>	F GAAGCCATGGGCTACTTCAA R AGAGTGACGAGGAGCGGTAG	307	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)
<i>plcN</i>	F GTTATCGCAACCAGCCCTAC R AGGTCGAACACCTGGAACAC	466	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)
<i>toxA</i>	F GGTAACCAGCTCAGCCACAT R TGATGTCCAGGTCATGCTTC	352	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)
<i>algD</i>	F ATGCGAATCAGCATCTTTGGT R CTACCAGCAGATGCCCTCGGC	1340	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)

Abbreviations: F, forward; R, reverse

Table 4. Frequency and statistical analysis of virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

Virulence factor	Isolates number (%)				Statistic Value <i>P</i>
	Total (n=98)	SPM-1 MβL (n=39)	IPM I/R (n=20)	IPM S (n=39)	
Alkaline protease	83 (84.7%)	36 (92.3%)	14 (70.0%)	33 (84.6%)	0.079
Phospholipase C	75 (76.5%)	31 (79.5%)	14 (70.0%)	30 (76.9%)	0.716
Elastases	36 (36.7%)	12 (30.8%)	5 (25.0%)	19 (48.7%)	0.123
Pyocyanin	56 (57.1%)	24 (61.5%)	9 (45.0%)	23 (58.9%)	0.457
Pyoverdin	81 (82.6%)	34 (87.2%)	13 (65%)	34 (87.2%)	0.065
Hemolysins	80 (81.6%)	39 (100%)	14 (70%)	27 (69.2%)	0.001
Biofilm	98 (100%)	39 (100%)	20 (100%)	39 (100%)	ND

Abbreviations: SPM-1 MβL, SPM-1 metallo-β-lactamase; IPM I/R, imipenem intermediate or resistant; IPM S, imipenem susceptible; ND, data could not be determined

Table 5. Frequency and statistical analysis of virulence genes detected among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

Virulence determinant		Number of Isolates (%)				
Gene	Codified product	Total	SPM-1	IPM I/R	IPM S	Statistic Value <i>P</i>
		(n=98)	MβL (n=39)	(n= 20)	(= 39)	
<i>aprA</i>	alkaline protease	96(97.9%)	38(97.4%)	20(100%)	38(97.4%)	1.000
<i>plcH</i>	hemolytic phospholipase C	98 (100%)	39 (100%)	20(100%)	39 (100%)	ND
<i>plcN</i>	non-hemolytic phospholipase C	94(95.9%)	39 (100%)	20(100%)	35(89.7%)	0.071
<i>lasA</i>	elastase A	96(97.9%)	38(97.4%)	20(100%)	38(97.4%)	1.000
<i>lasB</i>	elastase B	97(98.9%)	38(97.4%)	20(100%)	39 (100%)	1.000
<i>toxA</i>	exotoxin A	98 (100%)	39 (100%)	20(100%)	39 (100%)	ND
<i>algD</i>	GDPmanose desidrogenase	97(98.9%)	38(97.4%)	20(100%)	39 (100%)	1.000

Abbreviations: SPM-1 MβL, SPM-1 metallo-β-lactamase; IPM I/R, intermediate or resistant imipenem; IPM S, susceptible imipenem; ND, data could not be determined

6 CONCLUSÕES

6.1 Os resultados obtidos no presente estudo, utilizando-se das metodologias acima mencionadas, sugerem que o perfil de virulência dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* analisados não apresenta correlação com determinantes de resistência aos carbapenêmicos.

6.2 Considerando o processo patogênico desenvolvido pelo microrganismo, todos os fatores de virulência analisados foram considerados importantes em todos os isolados clínicos independentemente da localização do sítio infeccioso.

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](#)