
RENATA CRISTINA PICÃO

**Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às
cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de
*Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção de título de
Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RENATA CRISTINA PICÃO

**Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às
cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de
*Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção de título de
Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Gales

São Paulo

2009

Picão, Renata Cristina

Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Renata Cristina Picão. -- São Paulo/SP – Brasil, 2009.

122 f., XIV.

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

Título em Inglês: Study of the β -lactamases involved in broad-spectrum cephalosporin resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

1. β -lactamase, 2. *Pseudomonas aeruginosa*, 3. integrons

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

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Ricardo Sobhie Diaz

RENATA CRISTINA PICÃO

**Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência
às cefalosporinas de amplo espectro em isolados
clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

Presidente da banca:

Prof. Dr. Ana Cristina Gales

Banca examinadora:

Titular: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Paulo Vicente

Titular: Prof. Dr. Carlos Alberto Pires Pereira

Titular: Prof^a. Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia

Titular: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Matté

Suplente: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Suplente: Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Andrade Marques

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo
constante e incondicional apoio; e ao
meu amado Rodrigo, cujo encontro fez
com que eu pudesse “voir la vie en rose”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Ana Cristina Gales, inicialmente pela confiança, depois pela brilhante orientação e pelo convívio sempre estimulante junto ao laboratório ALERTA. É uma honra trabalhar com você!

Ao pesquisador Patrice Nordmann, pela acolhida junto à sua unidade de pesquisa em Paris; e à Laurent Poirel pela produtiva supervisão nesta etapa. Agradeço igualmente à CAPES por ter me concedido uma bolsa PDEE possibilitando, assim, o estabelecimento desta importante colaboração internacional.

Agradeço aos professores Ana Carolina Paulo Vicente, Carlos Alberto Pires Pereira, Doroti de Oliveira Garcia, Maria Helena Matté, Afonso Luís Barth e Elizabeth de Andrade Marques por terem gentilmente aceitado participar de minha banca de defesa.

À Rodrigo Turin, pelo companheirismo incondicional, apoio, paciência, atenção, e etc., que tornaram mais leves as ansiedades do início, desenrolar e encerramento dessa etapa, assim como as expectativas daquelas que virão.

Aos amigos dos Laboratório ALERTA e LEMC por todo apoio, carinho, e também pelos alegres momentos de descontração, especialmente Adriana Nicoletti, Anderson Fernandes Santos, Cecília Carvalhaes, Danilo Elias, Eloisa Campana, Jéssica Werneck, Lorena Felhberg, Paula Peraro, Paula Ignez e Raquel Girardello com quem compartilho diariamente as experiências e expectativas no mundo acadêmico e além.

Um enorme agradecimento ao Charlys pelas inúmeras ajudas diante dos labirintos burocráticos.

Às amigas Anais Potron, Fateméh Namdari e Pauline Mugnier por toda paciência, carinho e atenção, que fizeram com que minha estadia na França fosse muito prazerosa.

Aos amigos da Maison Du Brésil, que me acolheram e estiveram sempre presentes, constituindo uma verdadeira família.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa que possibilitou dedicação exclusiva para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
REVISÃO DA LITERATURA	6
1. β -lactamases.....	6
2. β -lactamases em <i>P. aeruginosa</i>	9
2.1 Grupo funcional 1/classe molecular C: AmpC ou Cefalosporinas cromossomais.....	9
2.2 Grupo funcional 2 subgrupos 2b e 2c, classe molecular A: β -lactamases de espectro limitado	10
2.3 Grupo 2be, classe molecular A: β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	11
2.4 Grupo funcional 2d, classe molecular D: as oxacilinases.....	16
2.5 Grupo funcional 2f, classe molecular A: serino-carbapenemases.....	19
2.6 Grupo funcional 3, classe molecular B: Metalo- β -lactamases.....	21
3. Elementos genéticos envolvidos na disseminação horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos.....	24
3.1 Bacteriófagos e Transdução	24
3.2 Plasmídeos e conjugação	24
3.3 Transposons e transposição.....	25
3.4 Integrons	28
ARTIGO I.....	31
ARTIGO II.....	37
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	105

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESBL – β -lactamase de espectro estendido

PBP – Proteína ligadora de penicilina

MBL – Metallo- β -lactamase

UFC – Unidades formadoras de colônia

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético

MIC – Concentração inibitória mínima

CS – Seqüência conservada

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFGE – *Pulsed field gel electrophoresis*

IS – Seqüência de inserção

IR – Seqüência repetida e invertida

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases..... 8

Tabela 2. β -lactamases identificadas em *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com a respectiva classificação funcional e molecular..... 23

Artigo II

Table 1. Clinical features of the patients, whom ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were collected, by PFGE pattern and β -lactamase identification..... 57

Anexos

Tabela Anexo 1. Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* isolados de hemocultura de pacientes hospitalizados no complexo Hospital São Paulo durante o ano de 2005. 105

Tabela Anexo 2. Resumo dos dados microbiológicos e clínicos dos eventos de infecção cujo desfecho clínico foi o óbito do paciente. 108

Tabela Anexo 3. Resumo dos dados microbiológicos e clínicos dos eventos de infecção cujos pacientes receberam alta hospitalar..... 110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um integron da classe 1 e de um gene cassete circular livre. As flechas representam os genes do integron e o sentido das flechas representa o sentido da transcrição dos genes. À esquerda, a seqüência conservada 5', contendo o gene que codifica a integrase e o sítio de ligação *attI*. À direita, a 3'-CS, contendo a estrutura truncada *qacEΔ1/sulI*..... 30

Artigo I

Figure 1. Double disk synergy test with *bla*_{CTX-M-2}-positive *P. aeruginosa* clinical isolate P6208. Arrows indicate double-disk synergy. Abbreviations are as follows: ceftazidime (CAZ), ticarcillin-clavulanic acid (TCC), cefotaxime (CTX), and cefepime (FEP). 36

Artigo II

Figure 1. Schematic representation of the genetic environment of β -lactamase-encoding genes identified in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The coding genes are represented by arrows indicating their translation orientations and 59-base-elements are indicated as white circles. 61

Anexos

Figura Anexo 4. (A) Tipagem molecular por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de GES-1 e produtores de GES-5. (B) Hibridização do DNA presente no gel de PFGE com sonda marcada específica para *bla*_{GES}. 111

Figura Anexo 5. Alinhamento e árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos dos genes *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} primeiramente descritos e *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} identificados neste estudo..... 112

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo determinar as β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em uma coleção de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em um complexo hospitalar universitário na cidade de São Paulo durante o ano de 2005.

No primeiro trabalho descrevemos a produção de CTX-M-2 em um isolado que apresentava o estranho fenótipo de sensibilidade à ceftazidima e resistência à cefepima. O gene que codificava esta enzima estava localizado no cromossomo bacteriano, em um contexto genético idêntico àquele encontrado em plasmídeos que carregam *bla*_{CTX-M-2}, que encontram-se disseminados entre enterobactérias.

No segundo trabalho, descrevemos as β -lactamases envolvidas na resistência à ceftazidima em 43 isolados de *P. aeruginosa* da referida coleção, assim como o contexto e suporte no qual estavam inseridos os genes que codificavam as enzimas identificadas. Além disso, realizamos a tipagem molecular dos isolados estudados e pesquisamos os prontuários médicos dos pacientes infectados pelas amostras estudadas. A hiperprodução de AmpC foi considerada a única β -lactamase relacionada à resistência a ceftazidima em quatro isolados (9,3%). Nove isolados (20,9%) apresentaram a produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), sendo que sete (16,3%) apresentavam a enzima GES-1 e dois isolados (4,6%) apresentavam a enzima CTX-M-2. A atividade hidrolítica contra os carbapenens foi detectada em trinta isolados (69,7%), nos quais as enzimas IMP-1, GES-5 e SPM-1 foram identificadas em 1, 2 e 27 isolados, respectivamente. Nenhum isolado apresentou produção simultânea de metalo- β -lactamase e ESBL. Os genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{CTX-M-2} estavam associados às seqüências de inserção *ISCR4* e *ISCR1*, respectivamente, enquanto que os genes *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-5} e *bla*_{IMP-1} estavam localizados em integrons da classe 1. Todos os genes codificadores de β -lactamases identificados apresentavam localização cromossomal. A tipagem molecular dos isolados estudados evidenciou a existência de sete genótipos distintos; porém, isolados produtores de uma mesma enzima freqüentemente apresentavam relação clonal. A análise dos prontuários médicos revelou que metade dos pacientes que apresentaram infecção da corrente sanguínea pelos isolados de *P. aeruginosa* estudados receberam terapia inadequada.

Este estudo permitiu identificar a diversidade de genes codificadores de β -lactamases de amplo espectro hidrolítico que foram adquiridos por isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Estes genes foram inseridos no DNA cromossomal destes isolados e, posteriormente, disseminados por transmissão cruzada.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the β -lactamases involved in broad-spectrum cephalosporin resistance in *P. aeruginosa* isolates recovered from blood culture of patients hospitalized at a Brazilian teaching hospital located in São Paulo, between January and December 2005.

In the first manuscript we have described the production of CTX-M-2 causing ceftazidime susceptibility and cefepime resistance in a *P. aeruginosa* clinical isolate. The CTX-M-2-encoding gene was located at the bacterial chromosome, and its vicinities were identical to those observed in *bla*_{CTX-M-2}-carrying plasmids from enterobacterial isolates.

In the second manuscript we have evaluated 43 ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates from the referred collection. We have described the β -lactamases involved in ceftazidime resistance, as well as the genetic context and support of β -lactamase-encoding genes and we have performed molecular typing of isolates. The medical records of patients infected with isolates studied were also analyzed.

AmpC overproduction was found to be the only β -lactamase-mediated mechanism responsible for ceftazidime resistance in four isolates (9.3%). Nine isolates (20.9%) produced an extended-spectrum β -lactamase (ESBL), either GES-1 ($n = 7$, 16.3%) or CTX-M-2 ($n = 2$, 4.6%). Carbapenemase activity was detected in 30 (69.7%) isolates, in which two (4.6%) produced the ESBL GES-5, a single isolate (2.3%) produced the metallo- β -lactamase (MBL) IMP-1; and 27 isolates produced the MBL SPM-1 (62.8%). None of the isolates coproduced both ESBL and MBL. Insertion sequence elements *ISCR4* and *ISCR1* were associated with *bla*_{SPM-1} and *bla*_{CTX-M-2} genes, respectively, whereas the *bla*_{GES} and *bla*_{IMP-1} genes were part of class 1 integron structures. All β -lactamase-encoding genes identified were chromosomally located. Molecular typing showed the existence of seven distinct genotypes, in which producers of the same β -lactamase often belonged to a single clone. Clinical data revealed that half of the patients infected with isolates studied have received inadequate therapy, suggesting that empirical treatment protocols should be updated in the hospital studied.

In this study we have identified a variety of broad-spectrum β -lactamase-encoding genes that have been initially acquired by *P. aeruginosa* clinical isolates, inserted on its chromosomal DNA and then spread between patients by cross-transmission.

APRESENTAÇÃO

Nesta tese de doutorado são apresentados dois trabalhos recentemente publicados no periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, que relatam a presença de β -lactamases em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em um grande centro de saúde brasileiro.

A realização destes trabalhos selou uma parceria entre o Laboratório ALERTA da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo e a unidade de pesquisa INSRM U914, dirigida pelo professor Patrice Nordmann, especializada no estudo da resistência bacteriana aos antimicrobianos, localizada no Hospital Le Kremlin Bicêtre em Paris, França. Esta rica parceria foi patrocinada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE, número do processo 3682/07-2).

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa são bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose ligeiramente curvados, não esporulados, que medem aproximadamente 0,5 a 1 µm de largura por 1,5 a 5 µm de comprimento. Esta espécie é usualmente móvel, possuindo um ou vários flagelos polares. Utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo oxidase positivas. *P. aeruginosa* possui um metabolismo respiratório estritamente aeróbio, utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons (Koneman et al., 2001; Blondel-Hill et al., 2007).

Normalmente, *P. aeruginosa* é facilmente reconhecida com base nas características morfológicas da sua colônia e pelo seu característico odor de uva. As colônias são geralmente planas e difusas e possuem bordas serrilhadas com um brilho metálico. No entanto, existem outras morfologias, incluindo colônias lisas e mucóides. *P. aeruginosa* se distingue das outras espécies do gênero *Pseudomonas* pela sua capacidade de crescer a 42°C. Além disso, bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. produzem um pigmento hidrossolúvel, a pioverdina, que confere coloração amarelada às colônias. Porém, somente a espécie *P. aeruginosa* produz piocianina, um pigmento hidrossolúvel que confere às colônias uma coloração azulada (Koneman et al., 2001; Blondel-Hill et al., 2007). Quando a pioverdina se combina com a piocianina, se origina a cor verde brilhante, característico de *P. aeruginosa*. Esta bactéria pode adicionalmente produzir

outros pigmentos hidrossolúveis, tais como piorrubina (vermelho) e a piomelanina (marrom).

Esta espécie bacteriana é capaz de utilizar uma grande variedade de substratos orgânicos como fontes de carbono; apresenta grande habilidade em colonizar nichos ecológicos diversos, ainda que a oferta de nutrientes seja limitada; e sobrevive por longos períodos em ambientes úmidos. Embora *P. aeruginosa* seja patogênica para plantas e animais, raramente, esta espécie ocasiona infecções em indivíduos saudáveis. Contudo, sua baixa necessidade de nutrientes para o crescimento, sua tolerância a uma série de condições físicas adversas e sua resistência intrínseca e adquirida a diversas classes de agentes antimicrobianos fez desta espécie um importante patógeno relacionado à etiologia de infecções relacionadas à assistência à saúde (Blondel-Hill et al., 2007; Pappas et al., 2009; Strateva & Yordanov, 2009).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem aminoglicosídeos tais quais gentamicina, tobramicina, netilmicina e amicacina; as fluoroquinolonas, ciprofloxacina e levofloxacina, e as polimixinas (Pappas et al., 2009). Entre os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, apresentam atividade contra *P. aeruginosa* e podem ser utilizados clinicamente as penicilinas ticarcilina e piperacilina, incluindo suas respectivas associações com inibidores de β -lactamase o ácido clavulânico e piperacillina/tazobactam; as cefalosporinas de amplo espectro

ceftazidima, cefepima e cefoperazona; o monobactam aztreonam; e os carbapenens imipenem, meropenem e doripenem (Pappas et al., 2009).

Durante a terapia antimicrobiana, no entanto, *P. aeruginosa* pode desenvolver resistência aos β -lactâmicos (Lister et al., 2009; Livermore & Woodford, 2006). De fato, um estudo publicado por Gales e colaboradores, no qual foram avaliadas amostras de *P. aeruginosa* isoladas de cinco regiões geográficas (Ásia-Pacífico, Canadá, Europa, América Latina e Estados Unidos), mostrou que as taxas de resistência aos β -lactâmicos dos isolados de *P. aeruginosa* provenientes da América Latina eram mais elevadas que aquelas apresentadas por isolados provenientes das outras regiões (Gales et al., 2001). Além disso, dados do Programa SENTRY de vigilância de resistência a antimicrobianos revelaram que 30,2% das amostras de *P. aeruginosa* coletadas em centros brasileiros, entre 1997 e 2001, eram resistentes aos carbapenens, sendo que esta taxa aumentava para 40% quando as amostras haviam sido isoladas de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (Sader et al., 2001).

Três principais mecanismos estão envolvidos na resistência adquirida aos β -lactâmicos: (i) a redução da acumulação intracelular destas drogas, pela perda e/ou expressão reduzida das proteínas de membrana externa ou hiperexpressão dos sistemas de efluxo; (ii) a modificações no sítio-alvo destes agentes, as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs); (iii) e a alteração enzimática dos antimicrobianos, pela produção de β -lactamases (Strateva & Yordanov, 2009).

Entre estes mecanismos, a produção de β -lactamases representa a maior ameaça à utilização terapêutica dos β -lactâmicos, pois estas enzimas apresentam crescente diversidade tanto em termos de estrutura, como de espectro de atividade. Além disso, as estruturas genéticas que abrigam os genes que as codificam apresentam grande plasticidade, ou seja, tais genes comumente estão localizados em elementos genéticos móveis, capazes de conferir resistência a bactérias antes sensíveis através de trocas de material genético, inclusive entre bactérias de gêneros distintos (Livermore & Woodford, 2006).

O desenvolvimento de novos antimicrobianos, por sua vez, não ocorre com a mesma velocidade com que a resistência bacteriana se desenvolve e se dissemina pelos hospitais. O conhecimento da epidemiologia da produção de β -lactamases entre isolados clínicos, assim como o entendimento de seu mecanismo de disseminação, tornam-se, portanto, imprescindíveis para fundamentar a discussão dos protocolos vigentes e, posteriormente, implantar medidas de controle que visem diminuir a velocidade de dispersão da resistência bacteriana.

OBJETIVOS

- Identificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* isolados de hemoculturas no Hospital São Paulo durante o ano de 2005;
 - Caracterizar o mecanismo de resistência envolvido no fenótipo de resistência a cefepima e sensibilidade a ceftazidima em uma amostra de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de hemocultura no Hospital São Paulo, em 2005;
 - Identificar as β -lactamases presentes em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima;
 - Realizar a tipagem molecular dos isolados produtores de β -lactamases de amplo espectro;
 - Identificar o contexto e suporte genético dos genes codificadores de β -lactamases identificados em *P. aeruginosa*;
-

REVISÃO DA LITERATURA

1. β -lactamases

A resistência mediada pela produção de β -lactamases resulta da quebra da ligação amida no anel β -lactâmico. Primeiramente, a enzima associa-se de forma não covalente ao anel β -lactâmico e, então, o radical hidroxila livre do resíduo de serina, presente no sítio ativo da enzima, ataca o anel β -lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima, que ainda possui atividade hidrolítica e o antimicrobiano hidrolisados e, conseqüentemente, inativos (Livermore, 1995).

No caso das metalo- β -lactamases, o mecanismo hidrolítico exato é desconhecido. Entretanto, é consenso entre os estudiosos de metalo- β -lactamases que o zinco presente no sítio ativo da enzima se associa a uma molécula de água e interage com o oxigênio do grupamento carboxila do anel β -lactâmico. Esta interação polariza este grupamento carboxila e deixa o respectivo átomo de carbono suscetível ao ataque nucleofílico realizado pelo radical hidroxila da molécula de água (Crowder et al., 2006, Tamilselvi & Mugesh, 2008).

As β -lactamases são particularmente eficazes entre as bactérias Gram negativas. Isto porque nestes organismos, estas enzimas se concentram no espaço periplasmático, inativando, assim, os antimicrobianos antes que eles atinjam seus alvos na membrana citoplasmática – as PBPs (Livermore & Woodford, 2006).

Devido ao crescente número de β -lactamases identificadas e a diversidade de características bioquímicas e moleculares, diferentes esquemas de classificação das β -lactamases foram propostos ao longo dos anos.

Em 1980, AMBLER propôs classificar β -lactamases com base em sua seqüência de aminoácidos em quatro classes moleculares principais: A) serino β -lactamases, incluindo as β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), penicilinas e carbenicilinas; B) metalo- β -lactamases; C) cefalosporinas cromossomais; e D) oxacilinas (Ambler, 1980). BUSH, em 1989, propôs uma classificação na qual correlacionava o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima (Bush, 1989a; Bush, 1989b). Em 1995, BUSH, JACOBY E MEDEIROS propuseram uma atualização da classificação inicial de BUSH que combinava características estruturais e funcionais das β -lactamases (Bush et al., 1995).

A Tabela 1 apresenta de modo simplificado a correlação entre a classificação molecular de AMBLER e a de BUSH-JACOBY-MEDEIROS.

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

Classificação de BUSH-JACOBY-MEDEIROS, 1995	Subgrupos	Classificação de AMBLER, 1980	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais dos Gram negativos. Isoladamente, conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A, D	Grande maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos graus de resistência às penicilinas.
	2b	A	β -lactamases de espectro limitado de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-77 e SHV-85.
	2be	A	β -lactamases de espectro ampliado conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
	2br	A	β -lactamases derivadas de TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases (IRT).
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina com maior eficiência
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); fracamente inibidas pelo ácido clavulânico
	2e	A	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico
4		ND	Enzimas não sequenciadas que não são classificadas nos outros grupos

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado de Bush et al., 1995).

2. β -lactamases em *P. aeruginosa*

As β -lactamases identificadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* descritas abaixo, foram organizadas segundo suas respectivas classificações por grupo funcional e classe molecular. Os dados apresentados a seguir estão resumidos na Tabela 2.

2.1 Grupo funcional 1/classe molecular C: AmpC ou Cefalosporinases cromossomais

As β -lactamases do grupo funcional 1 ou da classe molecular C, chamadas cefalosporinases cromossomais ou AmpC, são codificadas por genes localizados no cromossomo de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e em algumas espécies de enterobactérias. Estas enzimas hidrolisam penicilinas e cefamicinas com grande eficiência, enquanto que hidrolisam o aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração com menor eficiência. Normalmente, as cefalosporinas de quarta geração e os carbapenens são fracamente hidrolisados por AmpC (Jacoby, 2009; Ni et al., 2005).

Na ausência de β -lactâmicos, a β -lactamase AmpC é normalmente produzida em baixos níveis, mas, na presença de β -lactâmicos indutores como, por exemplo, cefoxitina e imipenem, passam a ser produzidas em grande quantidade. O mecanismo de indução de AmpC é controlado pela atividade de três proteínas AmpG, AmpD e AmpR. O grau de indução depende do β -lactâmico indutor e, em alguns casos, a produção dessa enzima pode aumentar de 100 a 1000 vezes. Quando esses antimicrobianos indutores são retirados do meio, a produção volta a níveis basais (Jacobs et al., 1997; Jacoby, 2009; Lodgee & Piddock, 1991).

Entretanto, mutações nos genes *ampR* e *ampD* podem causar hiperexpressão constitutiva de *ampC*, ou seja, a produção destas β -lactamases não diminui com a retirada do agente indutor. Estes mutantes apresentam o fenótipo desreprimido, e mostram-se também resistentes às cefalosporinas de quarta geração cefepima e cefpiroma. A frequência de mutações que leva à produção de β -lactamases AmpC desreprimidas em uma população de *P. aeruginosa* é de 10^{-7} a 10^{-9} por unidade formadora de colônia (UFC) (Jacobs et al., 1997; Jacoby, 2009; Schmidtke & Hanson, 2006).

Recentemente, pesquisadores franceses descreveram mutações no gene que codifica a enzima AmpC que, por ocasionar substituições de aminoácidos específicos no sítio ativo da enzima, resultavam no aumento do espectro hidrolítico destas enzimas. Estas variantes enzimáticas, conhecidas como cefalosporinases de espectro estendido (ESAC, por *Extended-Spectrum AmpC*), também são capazes de hidrolisar o imipenem. Neste trabalho, os autores propõem nomear variantes de AmpC como PDE, por *Pseudomonas-derived cephalosporinases* (Rodriguez-Martinez et al., 2009).

2.2 Grupo funcional 2 subgrupos 2b e 2c, classe molecular A: β -lactamases de espectro limitado

As enzimas classificadas nos subgrupos 2b e 2c incluem β -lactamases cuja atividade hidrolítica é perdida frente à ação de inibidores de serino β -lactamase, como o ácido clavulânico, o subactam e o tazobactam. Estas enzimas apresentam potente atividade contra as penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, com a particularidade que as enzimas do grupo 2c hidrolisam carbenicilina com igual eficiência

com a qual hidrolisam benzilpenicilina. Entre as enzimas pertencentes ao subgrupo 2b, TEM-1, TEM-2, TEM-90 (anteriormente denominada TLE-2), TEM-110, SHV-1 já foram identificadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, enquanto entre as β -lactamases pertencentes ao grupo 2c, as variantes PSE-1 (anteriormente denominada CARB-2), PSE-4 (anteriormente denominada CARB-1), CARB-3, CARB-4, CARB-like e AER-1 foram identificadas nesta espécie (Pai & Jacoby, 2001; Sanschagrin et al., 1998; Strateva & Yordanov, 2009).

2.3 Grupo 2be, classe molecular A: β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

O termo ESBL foi inicialmente utilizado para se referir àquelas enzimas derivadas de TEM-1/TEM-2 e SHV-1 que apresentavam atividade hidrolítica contra as cefalosporinas de amplo espectro, além de hidrolisarem as penicilinas e as cefalosporinas de primeira e segunda geração. Atualmente, este termo é utilizado de maneira mais abrangente, incluindo outras enzimas da classe A ou D de Ambler que apresentam atividade hidrolítica contra as penicilinas, as cefalosporinas e o aztreonam. A maioria das enzimas do tipo ESBL é sensível à ação de inibidores de serino β -lactamase (Livermore, 2008).

Em meados de 1980, as ESBL surgiram e rapidamente se disseminaram entre isolados clínicos de membros da família Enterobacteriaceae. Porém, a partir do início da década de 90, a produção de enzimas do tipo ESBL passou a ser observada também entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Weldhagen et al., 2003).

Até o momento em *P. aeruginosa*, foram reportadas ESBLs dos tipos TEM, SHV, PER, VEB, GES, BEL e CTX-M. Essas enzimas são remotamente relacionadas do ponto de vista genético, no entanto, elas compartilham o mesmo perfil bioquímico de hidrólise e inibição pelos diferentes compostos da classe dos β -lactâmicos.

As enzimas do tipo SHV foram identificadas em poucos isolados de *P. aeruginosa*: SHV-2 foi reportada na França e Tunísia, SHV-5 na Grécia e Tailândia, enquanto que SHV-12 foi, até o momento, identificada unicamente na Tailândia. (Naas et al., 1999; Poirel et al., 2004a; Neonakis et al., 2003; Mansour et al., 2009). A análise das seqüências de DNA adjacentes ao gene que codifica a SHV-2a encontrado em amostras de *P. aeruginosa* revelou seqüências idênticas àquelas encontradas em um plasmídeo de *Klebsiella pneumoniae*, que também continha o gene *bla*_{SHV-2} (Yan et al., 2001). Essa evidência sugere que os genes que codificam essas enzimas podem ser transferidos geneticamente de membros da família Enterobacteriaceae para isolados de *P. aeruginosa*; entretanto, esse evento ocorre com baixa freqüência devido a possíveis incompatibilidades para a conjugação e replicação plasmidial entre os diferentes gêneros (Naas et al., 1999).

Cinco variantes de enzimas do tipo TEM foram descritas em amostras de *P. aeruginosa*: TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42 e TEM-116 (David et al., 2008; Dubois et al., 2005; Marchandin et al., 2000; Mugnier et al., 1996; Poirel et al., 1999). Um estudo de vigilância realizado na França relatou que apenas 1,9% do total de isolados de *P. aeruginosa* eram produtores de ESBL do tipo TEM, contudo outras β -lactamases de

espectro limitado, como algumas oxacilinas e carbenicilinas, são encontradas com maior frequência em espécies de *Pseudomonas* (Weldhagen et al., 2003).

A β -lactamase PER-1, reportada em 1993, foi a primeira ESBL a ser caracterizada a partir de uma amostra de *P. aeruginosa* isolada de um paciente proveniente da Turquia que havia sido internado em um hospital parisiense, na França (Nordmann & Naas, 1994). Um estudo subsequente revelou que o gene *bla*_{PER-1} encontrava-se amplamente disseminado na Turquia, e foi identificado em mais de 46% dos isolados de *Acinetobacter* spp. e em 11% dos isolados de *P. aeruginosa* recuperados durante um período de três meses no ano de 1999 (Vahaboglu et al., 1997). Desde então, PER-1 foi descrita em *P. aeruginosa* de diferentes e distantes países, tais como Bélgica, Espanha, França, Irã, Iraque, Itália, Japão, Leste Europeu e Síria (Claeys et al., 2000; Docquier et al., 2001; Empel et al., 2007; Erac e Gulay, 2007; Llanes et al., 2006; Luzzaro et al., 2001; Pagani et al., 2004; Szabo et al., 2008; Tato et al., 2006; Yamano et al., 2006). A variante PER-2, por sua vez, foi descrita em 1996 a partir de um isolado de *Salmonella* Typhimurium recuperado na Argentina (Bauernfeind et al., 1996). Posteriormente, esta enzima foi identificada em isolados de enterobactérias, *Acinetobacter* spp. e em *P. aeruginosa*, de diferentes países latino-americanos, porém não no Brasil (Celenza et al., 2006; Pasteran et al., 2006; Vignoli et al., 2005).

A ESBL VEB-1 foi primeiramente caracterizada em um isolado de *Escherichia coli* de uma criança transferida do Vietnã para um hospital na França. Posteriormente, esta enzima foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* provenientes da Tailândia (Girlich et al., 2002). No Kuwait, amostras de *P. aeruginosa* produtoras de

VEB-1 foram identificadas. Entre estas amostras, variantes de *bla*_{VEB-1} que possuíam alterações de um único nucleotídeo, que não levavam à alteração da proteína final, foram identificadas. Essas variantes foram denominadas *bla*_{VEB-1a} e *bla*_{VEB-1b} (Poirel et al., 2001a). Posteriormente, isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de VEB-1 foram isolados na Índia, Bulgária, Reino Unido e Irã, enquanto que uma nova variante, VEB-3, foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* na China, em 2006 (Aubert et al., 2004; Jiang et al., 2006; Mirsalehian et al., 2009; Strateva et al., 2007; Woodford et al., 2008).

A enzima GES-1 foi inicialmente identificada de uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* isolada no ano de 1998 (Poirel et al., 2000). Essa β -lactamase foi caracterizada de uma amostra coletada de um paciente internado em um hospital da França, no primeiro dia de admissão de um paciente que havia sido transferido da cidade de Cayenne, Guiana Francesa. Posteriormente ao primeiro relato, variantes de GES foram identificadas por todos os continentes, tanto em isolados clínicos de enterobactérias como em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Até o momento, 12 variantes de enzimas do tipo GES foram identificadas (Moubareck et al., 2009; Walsh, 2008; Weldhagen, 2006). No Brasil, enzimas do tipo GES foram até o momento identificadas em *P. aeruginosa* (GES-1 e GES-5) e *K. pneumoniae* (GES-7) (Castanheira et al., 2004a; da Fonseca et al., 2007; Dropa et al., 2009).

Em 2001, uma variante de GES-1 foi reportada de uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na África do Sul (Poirel et al., 2001b). GES-2 apresentava uma única alteração de aminoácido quando comparada à GES-1, um resíduo de asparagina ao invés de glicina na posição 170 de Ambler que, curiosamente, era responsável por ampliar o

espectro de atividade da enzima, que passou a ser capaz de hidrolisar imipenem. A análise da cinética de GES-2 mostrou uma eficiência catalítica contra imipenem 100 vezes maior do que GES-1. A partir de então, outras variantes de enzimas do tipo GES com atividade imipenemase foram descritas: GES-4, GES-5, GES-6 e GES-11 (Moubareck et al., 2009; Weldhagen, 2006).

A variante GES-5, por sua vez, foi inicialmente caracterizada a partir de um isolado de *E. coli*, na Grécia, em 2004 (Vourli et al., 2004). Esta nova variante apresentava, em comparação com a enzima GES-1, a substituição de um resíduo glicina por serina, também na posição 170 de Ambler. Esta substituição rendeu a GES-5 a capacidade de hidrolisar imipenem; porém, com eficiência ainda maior que aquela apresentada pela variante GES-2 (Bae et al., 2007). Entre as enzimas do tipo GES com atividade imipenemase, somente a variante GES-5 foi identificada em *P. aeruginosa*, em isolados provenientes dos países China, Brasil e Espanha (da Fonseca et al., 2007; Viedma et al., 2009; Wang et al., 2006).

Em 2005, uma nova ESBL denominada BEL-1 foi caracterizada a partir de um isolado de *P. aeruginosa* recuperado de um paciente internado em um hospital belga. Este foi o único relato da referida enzima até o momento (Poirel et al., 2005b).

O primeiro relato da produção de cefotaximase (CTX-M), enzima assim designadas por apresentar a cefotaxima como substrato preferencial, ocorreu em 1990, a partir de um isolado clínico de *E. coli* recuperado na Alemanha (Bauernfeind et al., 1990). Posteriormente, estas enzimas se disseminaram por todos os continentes; porém, a identificação de CTX-M durante muitos anos esteve restrita aos membros da família

Enterobacteriaceae. Em 2006, todavia, as enzimas CTX-M-1 e CTX-M-43 foram identificadas em isolados clínicos *P. aeruginosa* provenientes da Holanda e da Bolívia, respectivamente (al Naiemi et al., 2006; Celenza et al., 2006).

2.4 Grupo funcional 2d, classe molecular D: as oxacilinases

As oxacilinases (OXA) receberam esta designação por apresentarem atividade hidrolítica potente contra a oxacilina, a cloxacilina e a meticilina, ou seja, contra penicilinas resistentes às penicilinases. Uma característica marcante deste grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas pelo cloreto de sódio. Embora a maioria dos genes que codificam enzimas do tipo OXA seja localizada em plasmídeos, alguns podem ocorrer naturalmente no genoma de certas bactérias Gram negativas (Poirel et al., 2009b).

Até a realização deste trabalho, 172 enzimas do tipo OXA haviam sido descritas (<http://www.lahey.org/Studies>), as quais apresentam grande divergência em termos de propriedades bioquímicas. Enquanto algumas enzimas do tipo OXA possuem espectro hidrolítico restrito às penicilinas e às cefalosporinas de primeira e segunda geração (oxacilinases de espectro limitado), outras são capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações (ESBL do tipo OXA), e certas variantes ainda apresentam atividade hidrolítica contra o imipenem (carbapenemases do tipo OXA).

2.4.1 Oxacilinases de espectro limitado e ESBLs do tipo OXA.

A evolução das ESBLs do tipo OXA a partir de enzimas estruturalmente semelhantes, porém de espectro mais limitado, se assemelha à evolução observada pelas

enzimas do tipo TEM e SHV. De acordo com a seqüência de aminoácidos, as oxacilinasas de espectro limitado e seus mutantes de espectro ampliado podem ser divididos em quatro subgrupos: OXA-1, OXA-2, OXA-10 e outros (Poirel et al., 2009b).

No primeiro subgrupo, além de OXA-1 e OXA-30 (cujas seqüências de aminoácidos são idênticas), estão incluídas as enzimas OXA-31 e OXA-47. Estas oxacilinasas ocorrem com freqüência entre amostras de enterobactérias embora OXA-1 e OXA-31 tenham sido também identificadas em *P. aeruginosa*. Enquanto OXA-47 apresenta espectro hidrolítico limitado, OXA-31 é capaz de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração e, portanto, é considerada uma ESBL do tipo OXA. Posteriormente à caracterização inicial de OXA-1, pesquisadores evidenciaram que, assim como OXA-31, esta enzima apresentava atividade hidrolítica contra cefepima; porém, curiosamente, OXA-1 não é considerada uma ESBL do tipo OXA (Aubert et al., 2001).

Pertencentes ao subgrupo OXA-2, as enzimas OXA-2, OXA-3, OXA-15, OXA-21 e OXA-32 já foram identificadas em *P. aeruginosa*, sendo OXA-2, OXA-3 e OXA-21 oxacilinasas de espectro limitado. As enzimas OXA-15, OXA-32 e OXA-161, por sua vez, apresentam substituição de um único aminoácido comparado à OXA-2, o que ocasionou ampliação de seu espectro hidrolítico contra ceftazidima, sendo, portanto, consideradas ESBL do tipo OXA (Danel et al., 1997; Juan et al., 2009; Poirel et al., 2002a).

OXA-10 constitui a enzima do tipo OXA mais prevalente entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Enzimas pertencentes ao subgrupo OXA 10 incluem OXA-7, OXA-11, OXA-13, OXA-16, OXA-14, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-35, OXA-56

e OXA-74, das quais somente OXA-7, OXA-10 e OXA-56 apresentam espectro hidrolítico limitado (Poirel et al., 2009b).

Dentre as oxacilinas de espectro limitado que não são relacionadas às enzimas OXA-1, OXA-2 e OXA-10, os exemplares LCR-1, NPS-1, OXA-5, OXA-20, OXA-46 foram identificados em isolados de *P. aeruginosa* de diferentes regiões geográficas. As ESBL do tipo OXA classificadas neste subgrupo e que já foram identificadas nesta espécie bacteriana incluem as variantes OXA-18 e OXA-45 (Poirel et al., 2009b).

2.4.2 Carbapenemases do tipo OXA

As carbapenemases do tipo OXA podem ocorrer naturalmente em alguns organismos Gram negativos, assim como podem ser adquiridas pela aquisição de material genético alheio. Neste último caso, as carbapenemases do tipo OXA são designadas com a sigla CHDLs, por *Carbapenem-Hydrolysing class D β -Lactamases* (Poirel et al., 2009b).

P. aeruginosa carrega em seu DNA cromossomal o gene *bla*_{OXA-50}, que codifica uma oxacilinase com atividade hidrolítica contra os carbapenens. Embora *bla*_{OXA-50} seja expresso constitutivamente, e a produção da respectiva enzima confira sensibilidade reduzida à ampicilina, à ticarcilina, ao moxalactam e ao meropenem, OXA-50 parece não influenciar substancialmente o perfil de sensibilidade geral de *P. aeruginosa* (Girlich et al., 2004).

As CHDLs apresentam capacidade de hidrolisar carbapenens enquanto que não apresentam atividade sobre aztreonam e cefalosporinas de terceira e quarta

geração. Baseado na identidade de suas seqüências de aminoácidos, estas enzimas podem ser divididas em quatro subgrupos: OXA-23; OXA-24, cuja seqüência é idêntica à OXA-40; OXA-58 e OXA-143 (Poirel et al., 2009b; Higgins et al., 2009). Até recentemente, a produção de CHDL era restrita a amostras de *Acinetobacter* spp. Entretanto em 2008, a produção de OXA-40 foi identificada em um isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperado na Espanha. No referido estudo, plasmídeos idênticos carregavam o gene *bla*_{OXA-40} em *P. aeruginosa* e em *A. baumannii*, evidenciando o potencial de disseminação inter-espécies deste determinante de resistência (Sevillano et al., 2009).

2.5 Grupo funcional 2f, classe molecular A: serino-carbapenemases

As β -lactamases classificadas no grupo funcional 2f apresentam resíduos serina em seus sítios ativos, são sensíveis à ação dos inibidores de serino- β -lactamases e são capazes de hidrolisar os carbapenens. As enzimas SME, IMI e NMC classificadas neste grupo foram, até o momento, descritas unicamente entre membros da família Enterobacteriaceae. A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) por sua vez, foi descrita em 2001 nos Estados Unidos e, após sua descoberta, enterobactérias produtoras de enzimas do tipo KPC foram descritas em diversas regiões dos continentes americano, europeu e asiático. Até a realização do presente estudo, dez variantes de KPC-1 haviam sido descritas, sendo que KPC-1 e KPC-2 correspondem à mesma enzima (Nordmann et al., 2009).

Até recentemente, acreditava-se que a disseminação de enzimas do tipo KPC estivesse restrita aos membros da família Enterobacteriaceae. Entretanto, isolados de *P. aeruginosa* produtores de enzimas do tipo KPC já foram identificados em alguns

países da América Latina, como Colômbia, Trinidad e Tobago e Porto Rico (Villegas et al., 2007; Akpaka et al., 2009; Wolter et al., 2009).

Ao contrário do observado em relatos que descrevem a presença do gene *bla_{KPC}* em isolados de enterobactérias, nas amostras de *P. aeruginosa* produtoras de KPC-2 isoladas na Colômbia, o respectivo gene apresentava localização cromossomal. Este achado sugere que, possivelmente, um plasmídeo contendo *bla_{KPC-2}* que apresentava incompatibilidade para replicação em *P. aeruginosa* foi perdido após este gene e a estrutura que o mobilizava terem se inserido no DNA cromossomal desta última bactéria (Villegas et al., 2007).

Em outro estudo, onde foram avaliados 37 isolados clínicos de *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenems recuperados de diferentes hospitais de Porto Rico, os autores identificaram a produção de enzimas do tipo KPC em vinte e cinco isolados, dos quais vinte e quatro apresentavam a enzima KPC-2 e um produzia KPC-5. Embora os autores não tenham determinado a localização dos genes *bla_{KPC}*, a tipagem molecular destes vinte e cinco isolados revelou a presença de sete genótipos diferentes, sugerindo uma possível disseminação horizontal destes determinantes de resistência (Wolter et al., 2009). Mais recentemente, um isolado de *P. putida* produtor de KPC-2 foi encontrado no estado do Texas, nos Estados Unidos (Bennett et al., 2009).

A crescente quantidade de relatos da produção de KPC em amostras de *Pseudomonas* spp. em distantes países do continente Americano é um forte indício de que estes organismos já tenham se disseminado nesta região (Villegas et al., 2007; Akpaka et al., 2009; Wolter et al., 2009; Bennett et al., 2009).

2.6 Grupo funcional 3, classe molecular B: Metallo-β-lactamases

As metalo-β-lactamases (MBL) classificadas no grupo funcional 3 e classe molecular B são enzimas que apresentam potente atividade contra carbapenems, mas diferem de outras carbapenemases em três principais aspectos: (i) requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes como cofator no sítio ativo; (ii) são resistentes à ação dos inibidores das serino β-lactamases, embora sofram inibição por agentes quelantes como o EDTA, derivados do tiol e ácido dipicolínico; e (iii) não hidrolisam o monobactam aztreonam (Walsh et al., 2005).

Algumas MBLs são produzidas constitutivamente por espécies bacterianas tais quais *Bacillus cereus*, *Bacteriodes fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. and *Chryseobacterium meningosepticum* (Nordmann & Poirel, 2002). Contudo, desde o início da década de 90, aquisição de MBLs vem sendo descrita em patógenos clinicamente mais importantes, como espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e enterobactérias. Entre as classes de MBLs adquiridas, IMP, VIM, SPM, GIM, AIM e foram identificadas em amostras de *P. aeruginosa* (Livermore & Woodford, 2006).

A primeira MBL adquirida (IMP-1) foi caracterizada em um isolado de *Serratia marsecens* no Japão. A partir de então, a produção de enzimas do tipo IMP foi observada em *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e diversas espécies de enterobactérias provenientes de praticamente todos os continentes. Até a realização deste trabalho, vinte e seis variantes de IMP haviam sido identificadas (Walsh et al., 2005;

Walsh, 2008), entre as quais foram identificadas em isolados brasileiros de *P. aeruginosa* IMP-1, IMP-16 e IMP-18 (Mendes et al., 2007; Mendes et al., 2004; Xavier et al., 2006).

Em 1999, a segunda MBL, denominada VIM-1, foi caracterizada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em Verona, Itália. Desde então foram descritas vinte e três variantes desta enzima. Embora a maior parte destas descrições tenha ocorrido a partir de isolados recuperados na Europa, algumas variantes foram também identificadas nos continentes americano e asiático (Queenan e Bush, 2007; Walsh et al., 2005; Walsh, 2008).

Em 2002 uma nova MBL adquirida foi descrita. SPM-1, sigla para São Paulo metalo- β -lactamase, foi caracterizada a partir de um isolado de *P. aeruginosa* recuperado do trato urinário de uma paciente hospitalizada no complexo Hospital São Paulo (Toleman et al., 2002). Estudos posteriores relataram a produção de SPM-1 em isolados de *P. aeruginosa* hospitalares originários de diferentes regiões brasileiras, sendo que a produção desta enzima parece ocorrer de forma endêmica no Brasil, relacionada à disseminação de um clone (Carvalho et al., 2006; Cipriano et al., 2007; Gales et al., 2003; Pellegrino et al., 2006a; Zavascki et al., 2005).

Mais recentemente, foram descritas duas novas sub-classes de MBLs adquiridas: GIM-1, caracterizada, em 2005, e proveniente da Alemanha; e AIM-1, descrita em 2007 na Austrália. Assim como observado para SPM-1, a produção das enzimas GIM-1 e AIM-1 parece estar, até o momento, restrita a isolados de *P. aeruginosa* e originários da Alemanha e Austrália, respectivamente (Castanheira et al., 2004b; Yong et al., 2007).

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

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

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

^b: Variantes que apresentam atividade hidrolítica contra imipenem.

3. Elementos genéticos envolvidos na disseminação horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos

A eficiência com a qual a resistência aos antimicrobianos se dissemina entre as bactérias da mesma espécie e/ou entre espécies e gêneros distintos está relacionada a dois mecanismos de transmissão dos genes de resistência, vertical e horizontal. No primeiro caso, a transmissão acontece da célula-mãe para as células filhas como resultado da divisão celular. A transferência horizontal por sua vez, requer outros elementos genéticos, tais como bacteriófagos, plasmídeos e transposons; cujos respectivos mecanismos de transmissão são designados transdução, conjugação, transposição e transformação (Siefert, 2009; Frost et al., 2005).

3.1 Bacteriófagos e Transdução

Resumidamente, transdução é o mecanismo pelo qual moléculas de DNA bacteriano são transferidas entre linhagens distintas através da ação de bacteriófagos – vírus de DNA ou de RNA que infectam somente organismos procariotos. O DNA de uma bactéria doadora é incorporado pelo fago e, quando da infecção de uma nova linhagem, é liberado e incorporado ao genoma da célula receptora, após recombinação homóloga (Siefert, 2009).

3.2 Plasmídeos e conjugação

Os plasmídeos constituem moléculas extra-cromossômicas de DNA dupla fita que apresentam capacidade autônoma de replicação e podem ser encontradas em praticamente todos os tipos de bactérias. Estes elementos genéticos desempenham papéis fundamentais para a adaptação e evolução bacteriana, embora normalmente não

codifiquem estruturas essenciais para o crescimento bacteriano. Dependendo de seu tamanho, os plasmídeos podem codificar poucas ou centenas de proteínas que, por sua vez, podem proporcionar à bactéria características funcionais tais quais: resistência a substâncias tóxicas como antimicrobianos e metais pesados; fatores de virulência; capacidade de síntese de antibióticos; enzimas para a utilização de fontes de carbono não usuais; entre outras (Snyder & Champness, 2003a).

A característica mais notável de muitos plasmídeos é, no entanto, a habilidade de transferir a si mesmos e outras moléculas de DNA a outras bactérias, seja da mesma espécie ou não, por um mecanismo denominado conjugação. Em síntese, durante este evento, uma bactéria doadora projeta um pilus que a conecta e aproxima da linhagem receptora. O plasmídeo a ser transferido é, então, replicado e transmitido pelo canal formado entre as duas bactérias. Este é um mecanismo complexo e que envolve diversas proteínas, que são normalmente codificadas pelo próprio plasmídeo que é passível de realizar a conjugação, também designado plasmídeo conjugativo (Snyder & Champness, 2003a). Alguns plasmídeos são incapazes de iniciar a conjugação, mas podem ser transmitidos a outras bactérias se associados a outros plasmídeos conjugativos. Nestes casos, tais plasmídeos são denominados mobilizáveis (Siefert, 2009).

3.3 Transposons e transposição

Os transposons são elementos genéticos capazes de se movimentar de um lugar para outro no DNA, por um mecanismo denominado transposição. Uma vez que o transposon codifica sua(s) própria(s) enzima(s) envolvida(s) no evento de transposição, este elemento não perde sua capacidade de movimentação ao se deslocar. Tais estruturas

existem em praticamente todos os organismos, porém, a ação dos transposons é melhor compreendida em bactérias, organismos cuja evolução se deve, em grande parte, a estes elementos (Snyder & Champness, 2003b; Lewin, 2009; Siefert, 2009).

Comumente, transposons relacionados são identificados em bactérias de gêneros diferentes, o que sugere que essa troca de material genético entre bactérias distintas ocorra com certa regularidade. Esta circulação inter-espécies de DNA é favorecida pela transferência de plasmídeos ou pela ação de bacteriófagos que contêm tais transposons (Snyder & Champness, 2003b).

Existem diversos tipos de transposons bacterianos, dos mais variados tamanhos. Porém, duas principais características os distinguem de outros elementos genéticos móveis: a presença de seqüências repetidas e invertidas (IR) em suas extremidades; e a presença de repetições diretas que flanqueiam o transposon no DNA receptor (Snyder & Champness, 2003b; Craig, 2002).

O evento de transposição requer primordialmente três segmentos específicos de DNA, duas IRs – nas extremidades do transposon – e o alvo receptor. A enzima transposase realiza a quebra do DNA nestes sítios, sendo que as fitas-alvo são cortadas de maneira assimétrica. Assim, o elemento recém inserido apresenta falhas nas suas adjacências, que são preenchidas posteriormente pela ação de sistemas de reparo. Assim, as repetições diretas que flanqueiam os transposons correspondem à seqüência alvo que foi duplicada durante o evento de transposição. Este mecanismo de transposição normalmente resulta na completa remoção do transposon do doador, razão pela qual este

mecanismo é alternativamente denominado transposição não-replicativa ou “corta e cola” (Craig, 2002).

Algumas transposases, no entanto, realizam o corte em uma única fita nas extremidades dos transposons. A porção final 3'-OH exposta deste elemento ataca o DNA alvo, resultando em um produto intermediário no qual o transposon encontra-se ligado covalentemente tanto ao DNA doador, quanto ao do receptor. A subsequente replicação deste transposon e o reparo dos segmentos de fita simples geram uma estrutura denominada cointegrado, que contém duas cópias do transposon e uma cópia dos segmentos de DNA doador e receptor. Alguns transposons apresentam recombinases sítio-específicas – as resolvases – e um sítio de recombinação cognato que promove a conversão do cointegrado, regenerando o doador e o receptor, de maneira a manter uma cópia do transposon em cada um deles. Este mecanismo de transposição é, por esta razão, denominado transposição replicativa ou “copia e cola” (Craig, 2002).

As seqüências de inserção (IS) correspondem aos menores transposons bacterianos. Estes elementos apresentam poucos pares de base além da seqüência de nucleotídeos que codifica a transposase, responsável pela transposição destes elementos a partir do reconhecimento das seqüências IR nas extremidades da IS. Transposons compostos, por sua vez, são formados por moléculas de DNA flanqueadas em ambas as extremidades por cópias de uma mesma IS que, conseqüentemente, apresentam seqüências IR idênticas. Nesta configuração, cada IS pode se transpor de maneira independente ou conjunta, caso a transposase reconheça as seqüências repetidas invertidas de ambas as cópias. Se for este o caso, a molécula de DNA localizada entre as

IS será carregada juntamente com estes elementos no evento de transposição (Snyder & Champness, 2003b; Craig, 2002).

3.4 Integrons

Os integrons são unidades genéticas que, por um sistema de recombinação sítio-específica, são capazes de capturar e mobilizar genes contidos em elementos móveis denominados cassetes gênicos. Embora os integrons não apresentem autonomia de movimentação, estas estruturas são responsáveis pela disseminação horizontal da resistência bacteriana por acumularem determinantes de resistência a diversas classes de antimicrobianos e, adicionalmente, por estarem frequentemente associados a elementos genéticos móveis tais como transposons e/ou plasmídeos (Stokes & Hall, 1989; Partridge et al., 2009).

Os componentes essenciais do integron são um gene *int* que codifica uma recombinase sítio-específica, pertencente à família das integrases e um sítio de reconhecimento e ligação, chamado *attI* (*attachment site*). O gene que codifica a integrase, incluindo o sítio de ligação *attI* é conhecido como seqüência conservada 5' (5'-CS). O *attI* é reconhecido pela integrase e funciona como um sítio receptor para os genes cassetes. Um promotor denominado Pc é encontrado à montante de *attI*, fazendo do integron um elemento de aquisição e expressão dos genes cassetes, como ilustra a Figura 1 (Hall & Collis, 1995; Collis & Hall, 1995).

Os genes cassetes são elementos não-replicantes e incluem um gene que pode codificar resistência aos antimicrobianos e um sítio de recombinação integrase-específico, membro da família de sítios conhecida como elementos de 59 bases (59-be),

ou *attC*. Genes cassetes podem existir tanto em sua forma livre circular ou podem estar integrados a um sítio *attI*. Somente quando integrados os genes cassetes são considerados formalmente parte de um integron (Recchia et al., 1994; Recchia & Hall, 1997; Partridge et al., 2009).

Um único evento de recombinação genética, envolvendo o sítio associado à integrase *attI* e um cassete associado ao *attC* levam à inserção de genes cassetes em um integron receptor. A integrase pode catalisar eventos de recombinação do *attI* e *attC* do gene cassete e também eventos de recombinação entre duas unidades de *attC* (uma no cassete a ser integrado e outra num gene cassete que já faz parte do integron). No entanto, existem evidências que a integrase realize preferencialmente a recombinação entre *attI* e o *attC*, sugerindo que o gene localizado na primeira posição do integron é o determinante mais recentemente adquirido pelo integron em questão. A integrase também catalisa eventos de recombinação que levam à excisão de genes cassetes, ocasionando a perda dos mesmos e gerando um cassete circular livre (Recchia et al., 1994; Recchia & Hall, 1997; Collis & Hall; 1992).

Os integrons podem ser agrupados em diferentes classes, de acordo com a estrutura da integrase, contudo, a maioria dos integrons que contém genes de resistência aos antimicrobianos e, portanto, também aqueles que codificam as β -lactamases, pertencem à classe 1 (Partridge et al., 2009).

Os integrons da classe 1 possuem a 5'-CS, característica desses elementos, e adicionalmente, na extremidade 3', está acomodado um gene o qual codifica resistência a compostos de amônio quaternário denominado *qacE Δ I*, truncado ao gene que codifica

resistência à sulfonamida *sulI*. Essa extremidade, que também é conservada nos integrons da classe 1, é conhecida como 3'-CS (Figura 1). A inserção de genes cassetes entre as seqüências conservadas 5'CS e 3'CS origina a região variável dos integrons. Devido à habilidade de adquirir novos genes em sua região variável, os integrons têm um importante papel na evolução de genomas de plasmídios e transposons que os contêm (Stokes & Hall, 1989; Hall & Collis, 1995; Partridge et al., 2009).

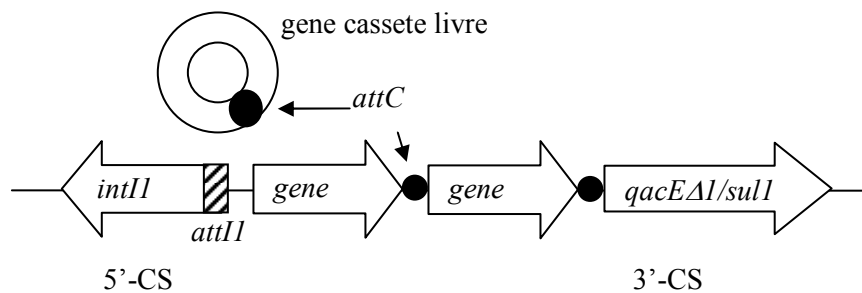


Figura 1. Representação esquemática de um integron da classe 1 e de um gene cassete circular livre. As flechas representam os genes do integron e o sentido das flechas representa o sentido da transcrição dos genes. À esquerda, a seqüência conservada 5', contendo o gene que codifica a integrase e o sítio de ligação *attI*. À direita, a 3'-CS, contendo a estrutura truncada *qacEΔI/sulI*.

ARTIGO I

Publicado em maio de 2009 no periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
Volume 53, número 5, páginas 2225–2226
(Versão no formato da revista em anexo)

**Further Identification of CTX-M-2 extended-spectrum β
lactamase in *Pseudomonas aeruginosa***

Renata Cristina Picão

Laurent Poirel

*INSERM U914 “Emerging Resistance to Antibiotics”, Hôpital de Bicêtre,
Assistance Publique/Hôpitaux de Paris*

Ana C. Gales

Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Patrice Nordmann *

*Service de Bactériologie-Virologie, and INSERM U914 “Emerging Resistance to
Antibiotics”, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et
Université Paris Sud, K.-Bicêtre, France*

*Phone: 33-1-45-21-36-32. Fax: 33-1-45-21-63-40.

E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr

β -Lactamase production is the main mechanism for β -lactam resistance in gram-negative rods. The more threatening β -lactamases that have successfully emerged and are believed to spread only in *Enterobacteriaceae* are CTX-M-type extended spectrum β -lactamases (ESBLs) (5). The acquired β -lactamases with wide activity spectra that are important in *Pseudomonas aeruginosa* include class B metallo- β -lactamases (mostly IMP and VIM types and especially SPM-1 in Brazil) and class A ESBLs, particularly VEB-, PER-, and GES-type enzymes (3, 8, 9). However, a single CTX-M-1-producing *P. aeruginosa* isolate has been reported from The Netherlands (1), as well as CTX-M-2- and CTX-M-43-positive *P. aeruginosa* isolates in Bolivia (2). This study reports the identification of a CTX-M-2-producing *P. aeruginosa* strain isolated from a Brazilian teaching hospital.

During June 2005, a 63-year-old male patient with a recent hospitalization history was admitted to the intensive care unit for suspicion of pneumonia. He received ceftriaxone and clindamycin as first-line therapy. Four days later, he presented with septic shock and died. A blood culture grew *P. aeruginosa* (isolate P6208).

Isolate P6208 was resistant to all β -lactams tested, except imipenem and ceftazidime. A double-disk synergy test was performed with ticarcillin-clavulanic acid-

and cefotaxime- cefepime-containing disks. The production of an ESBL was evidenced only under unusual conditions (with a distance between the disks of 1.5 cm center to center) (Fig. 1). Isolate P6208 was also resistant to fluoroquinolones, amikacin, gentamicin, and tobramycin and was susceptible to colistin. The MICs of imipenem, ceftazidime, cefepime, and cefotaxime determined by using Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) were 1 µg/ml, 2 µg/ml, >256 µg/ml, and >32 µg/ml, respectively.

HindIII-restricted total DNA from isolate P6208 as described previously (6) was used for cloning in pBK-CMV and was then transformed into *Escherichia coli* TOP10 and selected on agar plates containing ticarcillin (50 µg/ml) and kanamycin (30 µg/ml). The *E. coli* TOP10 (p6208) recombinant strain displaying an ESBL phenotype was obtained. The sequencing of the 2,340-bp cloned DNA insert of recombinant plasmid p6208 identified a *bla*_{CTX-M-2} gene. It was preceded by an *ISCR1* element located 498-bp upstream and followed by the *qacEΔ1* gene cassette. This *ISCR1*-*bla*_{CTX-M-2} structure has already been identified in several enterobacterial species (7).

Plasmid extraction performed by the Kieser method (4) did not evidence any plasmid. In addition, repetitive attempts to transfer the *bla*_{CTX-M-2} gene by

electroporation failed, using both *E. coli* TOP10 and *P. aeruginosa* PAO1 as recipient strains. Thus, the *bla*_{CTX-M-2} gene might be likely chromosomally located in isolate P6208.

This study identified a CTX-M-2-producing *P. aeruginosa* in Brazil. This finding is important since clinical laboratories may misidentify CTX-type enzymes in those nonfermenters, jeopardizing the choice of antimicrobial chemotherapy and the implementation of infection control measures. This report underlines that *P. aeruginosa* may become a hidden location for *bla*_{CTX-M} genes.

This work was partially funded by grants from the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539) and Université Paris XI, France, and mostly by a grant from the European Community (LSHM-CT-2005-018705) and the INSERM. We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) that conceded a PDEE grant to R.C.P. (protocol 3682/07-2), and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing a researcher grant to A.C.G. (process number 307714/2006-3).

REFERENCES

1. **al Naiemi N., B. Duim and A. Bart.** 2006. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J. Med. Microbiol. **55**:1607-1608
 2. **Celenza G., C. Pellegrini, M. Caccamo, B. Segatore, G. Amicosante and M. Perilli.** 2006. Spread of *bla*_{CTX-M}-type and *bla*_{PER-2} beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J. Antimicrob. Chemother. **57**:975-978.
 3. **Gales A.C., L. C. Menezes, S. Silbert and H. S. Sader.** 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. **52**:699-702.
 4. **Kieser, T.** 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid **12**:19–36.
 5. **Pitout J.D. and K. B. Laupland.** 2008 Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect. Dis. **8**:159-166.
 6. **Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann.** 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:622–632.
 7. **Poirel L., T. Naas and P. Nordmann.** 2008. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. Clin. Microbiol. Infect. **14**:75-81
 8. **Walsh TR.** 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. Curr. Opin. Infect. Dis. **21**:367-3671.
 9. **Weldhagen GF, L. Poirel and P. Nordmann.** 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:2385-2392.
-

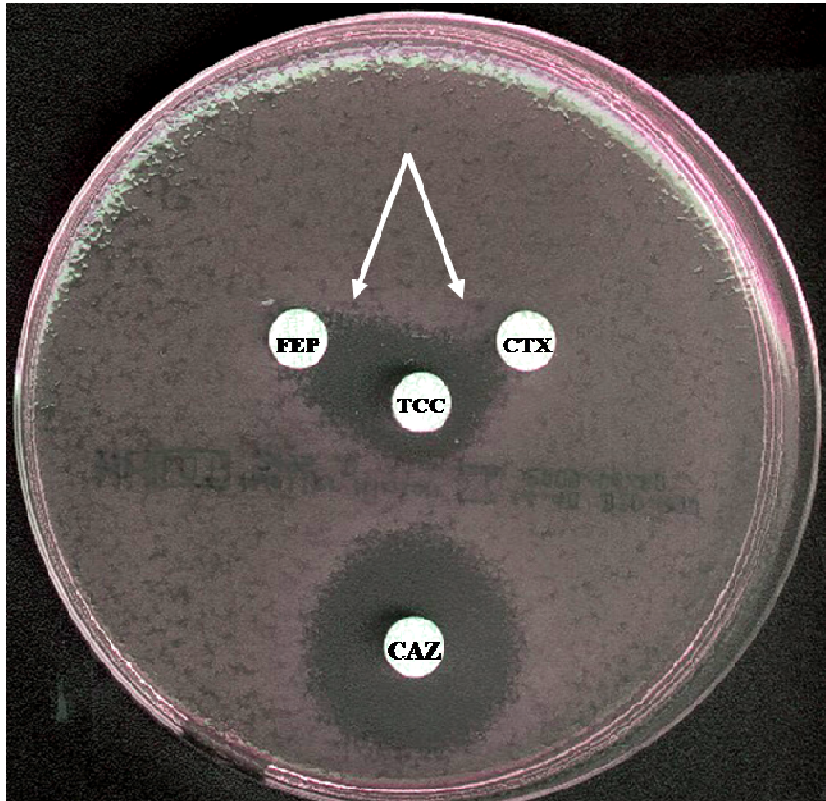


Figure 1. Double disk synergy test with *bla*_{CTX-M-2}-positive *P. aeruginosa* clinical isolate P6208. Arrows indicate double-disk synergy. Abbreviations are as follows: ceftazidime (CAZ), ticarcillin-clavulanic acid (TCC), cefotaxime (CTX), and cefepime (FEP).

ARTIGO II

Publicado em setembro de 2009 no periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
Volume 53, número 9, páginas 3908–3913
(versão no formato da revista em anexo)

**Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant
Pseudomonas aeruginosa causing bloodstream infections in
Brazil**

Renata C. Picão,^{1,2} Laurent Poirel,¹ Ana C. Gales,² and Patrice Nordmann^{1*}

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 “Emerging Resistance to Antibiotics”, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Paris Sud, K.-Bicêtre, France¹ and Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil²

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Brazil, ESBL, MBL.

Running title: MBL and ESBL-producing *P. aeruginosa* in Brazil

*Corresponding author. Mailing address: Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France. Phone: 33-1-45-21-36-32. Fax: 33-1-45-21-63-40.

E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr

ABSTRACT

A retrospective survey was conducted to characterize β -lactamases in a collection of 43 ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with bloodstream infections hospitalized at a Brazilian teaching hospital between January and December 2005. Resistance rates for carbapenems, aminoglycosides, and quinolones were over 80%, with only colistin remaining active against all isolates. Pulsed-field gel electrophoresis analysis identified seven different genotypes. AmpC overproduction was found to be the sole β -lactamase-mediated mechanism responsible for ceftazidime resistance in four isolates (9.3%). Nine isolates (20.9%) produced an extended-spectrum β -lactamase (ESBL), either GES-1 ($n = 7$, 16.3%) or CTX-M-2 ($n = 2$, 4.6%). Carbapenemase activity was detected in 30 (70%) additional isolates. Among those isolates, two isolates (4.6%) produced the ESBL GES-5, possessing the ability to hydrolyze imipenem; a single isolate (2.3%) produced the metallo- β -lactamase (MBL) IMP-1; and 27 isolates produced the MBL SPM-1 (62.8%). None of the isolates coproduced both ESBL and MBL. Insertion sequence elements *ISCR4* and *ISCR1* were associated with *bla*_{SPM-1} and *bla*_{CTX-M-2} genes, respectively, whereas the *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes were part of class 1 integron structures. This study underlines the spread of MBL- and ESBL-producing *P. aeruginosa* isolates as an important source of ceftazidime resistance in Brazil.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of hospital-acquired infections. Acquisition of β -lactamases by *P. aeruginosa* nosocomial isolates, such as class A extended-spectrum- β -lactamases (ESBL), and class B metallo- β -lactamases (MBL) is detrimental for antimicrobial therapy in hospitalized patients (19).

The ESBLs reported for *P. aeruginosa* are SHV, TEM, PER, VEB, BEL, GES, and, more recently, CTX-M types (1, 7, 8, 16, 20, 23, 29). The GES-type enzymes are unusual since point amino acid changes in their active sites may extend their hydrolytic activity to carbapenems (31, 39, 40). ESBL production in *P. aeruginosa* has been documented in Brazil (2, 5, 21), but its prevalence remains unknown.

Five types of acquired MBLs have been identified in *P. aeruginosa*: IMP, VIM, SPM, GIM, and AIM (41, 42). In Brazil, IMP-, VIM-, and SPM-producing *P. aeruginosa* clinical isolates have been identified (35). In addition, SPM producers have been reported as endemic in Brazilian territory due to dissemination of a single clone (10).

The aim of this study was to investigate the diversity and frequency of both ESBL and MBL production and to characterize the genetic support of those acquired β -lactamase genes in a collection of ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates from Brazil, taken as a model of a developing country.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains. A total of 154 consecutive *P. aeruginosa* isolates were recovered from patients with bloodstream infections hospitalized at Hospital São Paulo between January and December 2005. A single isolate per patient was retained for this study. Among those isolates, 43 (28%) were ceftazidime resistant by the CLSI disk diffusion method (inhibition zone of ≤ 14 mm and MIC of ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$) and thus were further characterized. *Escherichia coli* TOP10 was used as a recipient strain in cloning experiments (23). Transformation experiments were performed using both *E. coli* TOP10 and *P. aeruginosa* PAO1 as the recipients.

Clinical data. Clinical data including age, comorbidities, unit of the hospital, site of infection, therapeutic regimen, and final disposition (death or discharge) have been collected for each patient.

Susceptibility testing and screening for AmpC overproducers and/or ESBL production. Antibiotic susceptibility profiles of the 43 *P. aeruginosa* isolates were determined by the agar dilution method according to the CLSI guidelines (3). AmpC overproducers were identified by testing susceptibility to ceftazidime on Mueller-Hinton plates supplemented with 250 $\mu\text{g/ml}$ cloxacillin (18, 33). Detection of ESBL production was carried out by a double disk synergy method testing ceftazidime, aztreonam, and cefepime at a distance of 15 mm from ticarcillin-clavulanic acid disks, on Mueller-Hinton plates supplemented or not with cloxacillin-containing plates (28).

Screening for carbapenemase activity. Hydrolysis of imipenem was assessed by UV spectrophotometry assays, as described previously (10, 11, 25). Briefly,

10 ml of an overnight broth culture was harvested and then disrupted by sonication. Whole-protein extracts were obtained after centrifugation. Hydrolytic activity of 20 μ l of the crude extract was determined against 100 μ M imipenem in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), and measurements were carried out at a wavelength of 297 nm.

PCR amplification for detection of ESBL and MBL genes; analysis of the genetic environment and sequencing. Specific primers were used under standard PCR conditions to detect ESBL- and MBL-encoding genes, namely, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{BEL}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, and *bla*_{AIM} (7, 12, 15, 16, 17, 20, 23, 26, 29, 30, 38, 42). The genetic environment of *bla*_{IMP} was determined by PCR using the previously published specific primers to anneal at the 5' and 3' conserved sequences (CSs) of class 1 integrons, followed by sequencing (24). The genetic environment of *bla*_{CTX-M-2} was determined by PCR and further sequencing using specific primers for the insertion sequence *ISCR1* located upstream and for the *qacE Δ I* and *sull* tandem gene (17). The genetic context of *bla*_{SPM-1} was determined by using primers hybridizing with *ISCR4*, as described previously (27). For direct DNA sequencing, PCR products were purified using PCR purification columns (Qiagen, Courtaboeuf, France). Sequencing reactions were performed using specific primers and an automated ABI 337 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with software available over the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

PFGE analysis. Genetic relatedness among the ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using restriction enzyme SpeI (GE Healthcare, Orsay, France) as described previously (27). Analysis of PFGE patterns was performed by visual inspection of photographs of ethidium bromide-stained gels. The isolates were classified according to the criteria described by Tenover et al. (36). The *P. aeruginosa* isolate 48-1997 (38), corresponding to the SPM-producing national clone, was included in PFGE experiments for direct comparison of genotypes.

Genetic support of β -lactamase-encoding genes. Plasmid extraction was performed by the Kieser technique (13). *E. coli* NCTC50192, harboring four plasmids of 154, 66, 38, and 7 kb, was used as a size marker for plasmids. Transformation assays were performed by electroporation with plasmid extracts from the identified positive isolates, and both *E. coli* TOP10 and *P. aeruginosa* PAO1 were used as recipient strains. Selection was performed on agar plates supplemented with 50 μ g/ml amoxicillin and 50 μ g/ml ticarcillin for *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively. DNA-DNA hybridization of plasmid extracts was performed with a Southern transfer onto a Hybond N⁺ nylon membrane (GE Healthcare) as previously described. Labeling of the probe and signal detection were carried out using an enhanced chemiluminescence nonradioactive labeling and detection kit according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). The genetic localization of the β -lactamase-encoding genes was also attempted by using the endonuclease I-CeuI technique, as described previously (14).

Cloning experiments. Total DNA from *P. aeruginosa* 35 was HindIII restricted, ligated into the corresponding site of plasmid pBK-CMV, and then transformed in the *E. coli* TOP10 reference strain by electroporation as described previously (25). Recombinant plasmids were selected on Trypticase soy agar plates containing 1 µg/ml imipenem and 30 µg/ml kanamycin. The cloned DNA fragment of recombinant plasmid p35 was sequenced on both strands.

RESULTS

Clinical data, susceptibility testing, and screening for AmpC overproducers and ESBL producers. Forty-three out of the 154 *P. aeruginosa* isolates (28%) displayed ceftazidime resistance. Table 1 summarizes the clinical data, antimicrobial susceptibility profiles, and molecular typing of those 43 isolates. They were collected mainly from patients hospitalized in intensive care units (25 isolates), the emergency room (10 isolates), and the pediatric oncology unit (four isolates) (Table 1). In summary, the retrospective analysis of medical records showed that 24 patients (55.8%) had received adequate antimicrobial therapy, while empirical treatment was not optimal for 14 patients (32.5%). Additionally, the medical records of five patients (11.6%) were not available. Among the 24 patients who had received adequate empirical treatment or for whom antimicrobial therapy was correctly modified according to the results of susceptibility testing, 10 were discharged after 7 or more days of antimicrobial therapy, nine died after 7 or more days of treatment, and five died before 7 days of treatment. Among the 14 patients who had received inadequate empirical therapy, 10 died before results of antimicrobial susceptibility testing, whereas four patients were discharged. Notably, in quite a high number of cases, antibiotics such as carbapenems and the last-resort antibiotic polymyxin B had been used, although unsuccessfully for 20 out of 38 patients. Corresponding clinical data are presented in Table 1.

The 43 ceftazidime-resistant isolates were also resistant to ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, cefpirome, and cefepime. The highest susceptibility rates were obtained for colistin (100%), followed by aztreonam (44.1%), piperacillin-tazobactam

(39.5%), piperacillin (34.9%), imipenem (18.6%), and amikacin (18.6%). Only for piperacillin and piperacillin/tazobactam were susceptibility rates obtained following the breakpoints recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (an isolate is deemed susceptible when the MIC is ≤ 16 mg/liter). Overproduction of AmpC was identified to be likely the sole enzymatic mechanism responsible for ceftazidime resistance in four isolates (9.3%). Nine isolates were classified as ESBL producers. Imipenem hydrolysis was observed for 30 isolates, all of them resistant to imipenem. A high imipenem hydrolysis rate was obtained for 28 isolates (average specific activity of $0.2 \text{ U} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$), and a lower but significant rate was obtained for two isolates (average specific activity of $0.007 \text{ U} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$).

Identification of acquired β -lactamase genes. The *bla*_{GES-1} ($n = 7$) and *bla*_{CTX-M-2} ($n = 2$) genes were identified in nine isolates exhibiting an ESBL phenotype. In addition, the *bla*_{GES-5} gene, which encodes an unusual ESBL with carbapenemase activity, was identified in two isolates which did not display any ESBL phenotype but corresponded to the two isolates for which weak carbapenem hydrolysis was detected. The MBL-encoding genes *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} were identified in 27 isolates (62.8%) and one isolate (2.3%), respectively, corresponding to those isolates for which a high imipenem hydrolysis rate had been noted.

Clonal relationship. PFGE analysis performed with the 43 *P. aeruginosa* clinical isolates showed seven main genotypes. The 27 SPM-1-producing isolates belonged to a single genotype, A (corresponding to the genotype of the Brazilian epidemic clone), which can be divided into two subtypes, A1 and A2. GES-1-producing

isolates belonged to either genotype B (six isolates) or genotype C1 (one isolate). The two GES-5-producing isolates belonged to genotype C2, which was closely related to genotype C1 (two-band difference). The four AmpC overproducers belonged to genotypes G (one isolate) and D (three isolates), the latter being subclassified into two subtypes, D1 (one isolate) and D2 (two isolates). Genotypes E and F corresponded to the two CTX-M-2-producing isolates and the single IMP-1-producing isolate, respectively (Table 1).

Genetics of β -lactamase-encoding genes. PCR mapping and sequencing revealed that the *bla*_{CTX-M-2} gene was preceded by *ISCR1* and followed by the *qacE Δ I* and *sulI* tandem genes (Fig. 1), as previously reported for Enterobacteriaceae (34). *ISCR* elements are insertion sequences transposing in a particular way since they can mobilize adjacent sequences by rolling-circle transposition (37). Analysis of the SPM-1-producing strains showed that the *bla*_{SPM-1} gene was preceded by *ISCR4* and followed by *groEL* and *ISCR4* (Fig. 1) with a perfect identity compared to the sequences previously reported from *bla*_{SPM-1}-producing *P. aeruginosa* isolates (27). Sequencing of the 5' CS-3' CS amplicon obtained from isolate 42 showed that the *bla*_{IMP-1} gene was located at the first position of a class 1 integron possessing the strong promoter configuration with *Pant* and *P2*. Class 1 integrons are DNA structures that may integrate or excise antibiotic resistance genes as a form of gene cassettes (4). The *bla*_{IMP-1} gene was associated with the *aadA1* gene cassette encoding resistance to aminoglycosides in that class 1 integron (Fig. 1).

Using the I-CeuI technique, no conclusive results regarding the genetic location of *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SPM-1}, and *bla*_{IMP-1} genes were obtained. No plasmid was identified in the two *bla*_{CTX-M-2}-positive isolates as well as in all *bla*_{SPM-1}-positive isolates, whereas a single plasmid of 100 kb was identified in the *bla*_{IMP-1}-positive isolate. Southern blot hybridization of plasmid DNA extracted from *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SPM-1}, and *bla*_{IMP-1}-positive isolates using the corresponding probes did not give a positive signal. In addition, the transfer of these resistance determinants to both *E. coli* and *P. aeruginosa* PAO1 recipient strains remained unsuccessful.

Detailed analysis of bla_{GES}-positive isolates. In order to detail the environment of the *bla*_{GES} genes in *P. aeruginosa* isolates, a cloning step was necessary. Cloning of HindIII-digested total DNA from isolate 35 resulted in a *bla*_{GES-5}-positive recombinant plasmid containing an insert of approximately 10 kb. Sequencing of the insert revealed that the *bla*_{GES-5} gene was located at the first position of a class 1 integron, followed by the *aac(6')-Ib* and *aacA7* gene cassettes. The 59-base element (59-be) of the *aacA7* gene cassette was interrupted by a new insertion sequence element named IS*Pa29* belonging to the IS1111 family, members of which have been shown to insert themselves into the recombination sites of gene cassettes by site-specific recombination (32). IS*Pa29* was 1,534 bp long, possessed 12-bp-long imperfect subterminal inverted repeats, and was not bracketed by any target site duplication as commonly observed for IS1111 family members (Fig. 1) (32). Its transposase shared 63% identity with that of IS1492 identified from *Pseudomonas putida*. The IS*Pa29* sequence has been deposited on the IS Biotoul website (<http://www-is.biotoul.fr>). This class 1 integron was bracketed by two copies of

IS26, located in opposite orientations as drawn in Fig. 1, thus constituting a composite transposon structure, as already found for another β -lactamase gene (*bla*VEB-1)-positive integron, In53 (22).

Further PCR mapping used to target IS26 elements and the gene cassettes for the *bla*_{GES-5}- and *bla*_{GES-1}-positive isolates showed that they possessed the same class 1 integron structure. That integron possessed the promoter P_{ant}, whereas promoter P2 was under an inactive form. Again, the I-CeuI technique did not allow us to clarify whether those *bla*_{GES}-like genes were chromosomally or plasmid located. In addition, plasmid analysis followed by Southern blotting and hybridization with a *bla*_{GES} specific probe performed with all *bla*_{GES}-positive isolates failed to identify any plasmid. In accordance with those latter negative results, repeated attempts to transfer the *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes by transformation into *E. coli* or *P. aeruginosa* recipient strains failed. Those results strongly suggested the chromosomal location of the *bla*_{GES}-like genes.

DISCUSSION

The rate of ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* strains (28%) isolated from blood cultures was quite high in this study. A similar high rate of resistance has been reported for many developing countries worldwide (42). Here we showed that this high rate is mainly due to ESBL- and MBL-encoding genes, together with clonal spread of several specific clones. Interestingly, AmpC overproduction as a single enzymatic mechanism for ceftazidime resistance was rarely observed; it seemed to be replaced by acquisition of β -lactamases with an expanded spectrum of activity. Worryingly, a very high proportion of those isolates were also resistant to imipenem (82%) and meropenem (95%), suggesting the presence of non-enzymatic mechanisms of carbapenem resistance, such as porin loss and/or hiperexpression of efflux pumps.

Our study showed that the *bla*_{GES}-type ESBL genes were identified in 13.9% of the ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates, and were divided into two distinct clones. Since *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes were identified in the same *P. aeruginosa* clone, it may correspond to a local evolution of this clone. Considering that GES-5 possesses a wider spectrum of hydrolysis as compared to that of GES-1, it might be speculated that this evolution could be due to a carbapenem-related selective pressure. Noteworthy, the *bla*_{GES-1} gene cassette was first described in a *K. pneumoniae* from French Guiana (33). Since French Guiana and Brazil are neighboring countries, those findings may suggest a spread of *bla*_{GES}-related structures in that part of the world.

The present study underlines the idea that the current spread of CTX-M enzymes may occur not only in Enterobacteriaceae, but also in *P. aeruginosa*.

Interestingly, one recent study carried out in the same Brazilian hospital, identified that 44.8% of *K. pneumoniae* clinical isolates were CTX-M-2 producers (6). In addition, a CTX-M-2-producing *P. aeruginosa* that was susceptible to ceftazidime was recently identified in this hospital (21). Such spread of CTX-Ms may be difficult to detect since many CTX-M variants confer a higher degree of resistance to cefotaxime than to ceftazidime (33). Therefore, since our selection criterion was based on ceftazidime resistance, the rate of CTX-M production among *P. aeruginosa* identified here might be underestimated.

The genetic environments surrounding the *bla*_{CTX-M} and *bla*_{GES}-type β -lactamase genes in *P. aeruginosa* were identical to those identified in Enterobacteriaceae, underlining their common origin. It is likely that the location of the β -lactamase genes in *P. aeruginosa* results from their transfer from Enterobacteriaceae.

Overall, the production of SPM-1 carbapenemase was the main source of resistance to ceftazidime, accounting for 62.8% of the isolates studied. SPM-1-producing *P. aeruginosa* isolates are widely disseminated in Brazil, with a single clone identified in different cities (10). This clone been also recently identified in *P. aeruginosa* isolates recovered from Switzerland (9). We showed here that this SPM-1-producing clone had been responsible for a large outbreak causing septicemia to 27 hospitalized patients leading to the death of at least 15 of them.

This study underlines the possibility that a variety of β -lactamases with wide spectrum of activity may circulate in *P. aeruginosa* in Brazil, contributing to their

multidrug resistant phenotype. Lack of their identification and consequently lack of isolation of carriers may lead to their further dissemination.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, France, mostly by a grant from the European Community (DRESP2 contract, LSHM-CT-2005-018705) and INSERM. We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) that conceded a PDEE Grant to Renata Cristina Picão (Protocol #3682/07-2), and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing a researcher grant to Ana Cristina Gales (process number 307714/2006-3).

REFERENCES

1. **al Naiemi, N., B. Duim, and A. Bart.** 2006. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J.Med.Microbiol.* **55**:1607-1608.
 2. **Castanheira, M., R. E. Mendes, T. R. Walsh, A. C. Gales, and R. N. Jones.** 2004. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:2344-2345.
 3. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2009.
 4. **Collis, C. M. and R. M. Hall.** 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:155-162.
 5. **da Fonseca, E. L., V. V. Vieira, R. Cipriano, and A. C. Vicente.** 2007. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J.Antimicrob.Chemother.* **59**:576-577.
 6. **Do, C. F., Jr., R. M. Silva, M. Castanheira, M. C. Tognim, A. C. Gales, and H. S. Sader.** 2008. Prevalence and genetic characterization of blaCTX-M among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. *J.Chemother.* **20**:600-603.
 7. **Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, C. Andre, L. Coulange, and C. Quentin.** 2005. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home. *J.Clin.Microbiol.* **43**:4129-4138.
 8. **Dubois, V., L. Poirel, C. Marie, C. Arpin, P. Nordmann, and C. Quentin.** 2002. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:638-645.
 9. **El Salabi, A., M. A. Toleman, T. R. Walsh, R. Frei, and T. Bruderer.** 2008. The metallo-beta-lactamase (MBL) SPM-1 arrives in Europe. *Abstr.48th*
-

Intersci.Conf.Antimicrob.Agents Chemother.and 46th Infect.Dis.Soc.of America.Washington DC.

10. **Gales, A. C., L. C. Menezes, S. Silbert, and H. S. Sader.** 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:699-702.
 11. **Heritier, C., L. Poirel, D. Aubert, and P. Nordmann.** 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:268-273.
 12. **Hirakata, Y., T. Yamaguchi, M. Nakano, K. Izumikawa, M. Mine, S. Aoki, A. Kondoh, J. Matsuda, M. Hirayama, K. Yanagihara, Y. Miyazaki, K. Tomono, Y. Yamada, S. Kamihira, and S. Kohno.** 2003. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Infect.Dis.* **37**:26-32.
 13. **Kieser, T.** 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**:19-36.
 14. **Liu, S. L., A. Hessel, and K. E. Sanderson.** 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:6874-6878.
 15. **Moland, E. S., N. D. Hanson, V. L. Herrera, J. A. Black, T. J. Lockhart, A. Hossain, J. A. Johnson, R. V. Goering, and K. S. Thomson.** 2003. Plasmid mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumonia* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:711-714.
 16. **Naas, T., L. Philippon, L. Poirel, E. Ronco, and P. Nordmann.** 1999. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1281-1284.
 17. **Nagano, N., Y. Nagano, C. Cordevant, N. Shibata, and Y. Arakawa.** 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J.Clin.Microbiol.* **42**:3978-3984.
-

18. **Nordmann, P. and H. Mammeri.** 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* **2**:297-307.
 19. **Nordmann, P., T. Naas, N. Fortineau, and L. Poirel.** 2007. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol.* **10**:436-440.
 20. **Nordmann, P., E. Ronco, T. Naas, C. Duport, Y. Michel-Briand, and R. Labia.** 1993. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:962-969.
 21. **Pellegrino, F. L., K. R. Netto-dos Santos, L. W. Riley, and B. M. Moreira.** 2006. BlaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz.J.Infect.Dis.* **10**:251-253.
 22. **Picao, R. C., L. Poirel, A. C. Gales, and P. Nordmann.** 2009. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum (Bauernfeind et al., 1996)-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*
 23. **Poirel, L., L. Brinas, A. Verlinde, L. Ide, and P. Nordmann.** 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3743-3748.
 24. **Poirel, L., L. Cabanne, H. Vahaboglu, and P. Nordmann.** 2005. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1708-1713.
 25. **Poirel, L., M. Guibert, D. Girlich, T. Naas, and P. Nordmann.** 1999. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:769-776.
 26. **Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann.** 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:622-632.
 27. **Poirel, L., M. Magalhaes, M. Lopes, and P. Nordmann.** 2004. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from
-

- disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1406-1409.
28. **Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann.** 2003. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J.Clin.Microbiol.* **41**:3542-3547.
 29. **Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E. B. Chaibi, R. Labia, and P. Nordmann.** 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:573-581.
 30. **Poirel, L., T. Naas, D. Nicolas, L. Collet, S. Bellais, J. D. Cavallo, and P. Nordmann.** 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:891-897.
 31. **Poirel, L., G. F. Weldhagen, T. Naas, C. De Champs, M. G. Dove, and P. Nordmann.** 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:2598-2603.
 32. **Post, V. and R. M. Hall.** 2009. Insertion sequences in the IS1111 family that target the attC recombination sites of integron-associated gene cassettes. *FEMS Microbiol.Lett.* **290**:182-187.
 33. **Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2009. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.*
 34. **Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, and C. Mugnaioli.** 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**:33-41.
 35. **Sader, H. S., A. O. Reis, S. Silbert, and A. C. Gales.** 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin.Microbiol.Infect.* **11**:73-76.
 36. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA
-

- restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J.Clin.Microbiol.* **33**:2233-2239.
37. **Toleman, M. A., P. M. Bennett, and T. R. Walsh.** 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **70**:296-316.
 38. **Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh.** 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J.Antimicrob.Chemother.* **50**:673-679.
 39. **Vourli, S., P. Giakkoupi, V. Miriagou, E. Tzelepi, A. C. Vatopoulos, and L. S. Tzouvelekis.** 2004. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol.Lett.* **234**:209-213.
 40. **Wachino, J., Y. Doi, K. Yamane, N. Shibata, T. Yagi, T. Kubota, and Y. Arakawa.** 2004. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:2905-2910.
 41. **Walsh, T. R.** 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr.Opin.Infect.Dis.* **21**:367-371.
 42. **Yong, D., R. Ritchie, B. Bell, R. Pratt, M. A. Toleman, and T. R. Walsh.** 2007. 2007. A Novel Sub-Group Metallo- β -Lactamase (MBL), AIM-1 Emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. Abstr.47th Intersci.Conf.Antimicrob.Agents Chemother., Chicago, IL.
-

Table 1. Clinical features of the patients, whom ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were collected, by PFGE pattern and β -lactamase identification.

Infecting Organism and Patient	Date of isolation (DD/MM/YYYY)	Clone	Hospitalization Unit	Antimicrobial susceptibility	β -lactamases Identified	Age (years)	Patient's information			
							Underlying Diseases	Primary Infection	Treatment	Clinical Outcome
1	07/01/2005	A1	ICU	CS	SPM-1	21	Acute lymphoblastic leukemia	Bloodstream	FEP, IMP, PMB	Death
2	19/01/2005	A1	ER	CS, PIP, TZP, ATM	SPM-1	61	None	Bloodstream	RIF, IMP, GM	Death
3	19/01/2005	A1	ICU	CS	SPM-1	17	Acute myeloid leukemia	Bloodstream	FEP	Death
4	27/01/2005	A1	ER	CS, ATM	SPM-1	62	Epilepsy	Pneumonia	FEP, IMP	Discharge
5	27/01/2005	A1	ER	CS, PIP, TZP	SPM-1	91	None	Urinary Tract	FEP, IMP, TZP, PMB	Death
6	10/02/2005	A1	Pediatric oncology	CS, ATM	SPM-1	3	NA	NA	NA	NA
7	01/03/2005	A1	Bone marrow transplant	CS	SPM-1	53	Multiple myeloma	Bloodstream	IMP, PMB	Discharge
8	12/04/2005	A1	ICU	CS, PIP, TZP	SPM-1	48	Chronic pancreatitis	Bloodstream	IMP, PMB	Death
9	03/05/2005	A1	Pediatric oncology	CS, ATM	SPM-1	14	NA	NA	NA	NA
10	22/05/2005	A1	ICU	CS	SPM-1	60	Chronic pancreatitis	Bloodstream	CIP, IMP, PMB	Death
11	31/05/2005	A1	Hemodialysis	CS, ATM	SPM-1	1	NA	NA	NA	NA

Table 1. cont

Infecting Organism and Patient	Date of isolation (DD/MM/YYYY)	Clone	Hospitalization Unit	Antimicrobial susceptibility	β -lactamases Identified	Age (years)	Patient's information			Clinical Outcome
							Underlying Diseases	Primary Infection	Treatment	
12	31/05/2005	A1	Hemodialysis	CS, PIP, TZP, ATM	SPM-1	1	Chronic renal failure	Bloodstream	CIP, MEM, PMB	Discharge
13	28/06/2005	A1	ICU	CS	SPM-1	31	Acute myeloid leukemia	Bloodstream	FEP, IMP	Death
14	07/07/2005	A1	ICU	CS, ATM	SPM-1	37	HIV, HCV	Bloodstream	PMB	Discharge
15	23/08/2005	A1	Pediatric oncology	CS, PIP, TZP	SPM-1	10	NA	NA	NA	NA
16	06/09/2005	A1	ICU	CS, PIP, TZP	SPM-1	74	None	Intra-Abdominal	IMP	Death
17	20/09/2005	A1	ICU	CS, ATM	SPM-1	70	Multiple myeloma	Pneumonia and urinary tract	FEP, IMP, PMB	Death
18	27/10/2005	A1	ICU	CS, PIP, TZP, ATM	SPM-1	70	Lymphoma	Pneumonia	PMB	Death
19	10/11/2005	A1	ICU	CS, PIP, TZP, ATM	SPM-1	38	Aortic paraganglioma	Pneumonia	IMP, TZP, PMB	Discharge
20	15/12/2005	A1	ICU	CS	SPM-1	76	None	Pneumonia	FEP, IMP, PMB	Death
21	15/12/2005	A1	ICU	CS, PIP, TZP, ATM	SPM-1	70	Chronic renal failure	Pneumonia	FEP, IMP, PMB	Discharge
22	17/12/2005	A1	ICU	CS, PIP, TZP, ATM	SPM-1	70	None	Pneumonia	PMB	Death
23	20/12/2005	A1	Pediatric oncology	CS	SPM-1	18	NA	NA	NA	NA
24	27/01/2005	A2	ICU	CS, PIP	SPM-1	29	Lymphoma	Intra-abdominal	IMP, PMB	Death
25	15/07/2005	A2	ICU	CS, PIP	SPM-1	78	Hepatitis C	Pneumonia	IMP	Death

Table 1. cont

Infecting Organism and Patient	Date of isolation (DD/MM/YYYY)	Clone	Hospitalization Unit	Antimicrobial susceptibility	β -lactamases Identified	Patient's information			Clinical Outcome	
						Age (years)	Underlying Diseases	Primary Infection		Treatment
26	22/11/2005	A2	ICU	CS, ATM, AMK	SPM-1	64	COPD	Intra-Abdominal	FEP, IMP, PMB	Death
27	29/11/2005	A2	ER	CS, PIP, TZP, ATM, AMK	SPM-1	74	None	Bloodstream	CRO, NIT	Discharge
28	13/01/2005	B	ER	CS, TZP, IMP	GES-1	79	Wallenberg syndrome	Pneumonia	FEP	Death
29	19/01/2005	B	ER	CS, ATM, IMP, MEM, CIP, TM, AMK, GM, NET	GES-1	62	Chronic renal failure	Pneumonia	FEP, IMP, PMB, GM	Death
30	28/01/2005	B	ER	CS, TZP	GES-1	79	Chronic myeloid leukemia	Pneumonia	FEP, IMP	Discharge
31	02/08/2005	B	ER	CS, TZP, IPM	GES-1	49	Esophageal cancer	Pneumonia	PMB	Discharge
32	17/08/2005	B	ER	CS	GES-1	27	Mediastinal teratoma	Bloodstream	CIP, FEP	Death
33	20/09/2005	B	ICU	CS, IPM	GES-1	54	Bladder cancer	Pneumonia	FEP, IMP, PMB, TZP	Discharge
34	01/02/2005	C1	Surgery	CS	GES-5	60	Chronic obstructive pyelonephritis	Intra-abdominal	IMP	Death
35	05/07/2005	C1	ICU	CS, ATM	GES-5	44	None	Pneumonia	IMP, PMB	Discharge
36	22/05/2005	C2	ER	CS, PIP, TZP, IPM, MEM	GES-1	47	Bladder cancer	Urinary tract	FEP	Discharge

Table 1. cont.

Infecting Organism and Patient	Date of isolation (DD/MM/YYYY)	Clone	Hospitalization Unit	Antimicrobial susceptibility	β -lactamases Identified	Patient's information				
						Age (years)	Underlying Diseases	Primary Infection	Treatment	Clinical Outcome
37	19/01/2005	D1	ICU	CS, CIP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	66	None	Bloodstream	IMP, TZP	Death
38	15/02/2005	D2	ICU	CS, CIP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	9 months	Autoimmune endocrine disease	Pneumonia	CIP, MEM	Death
39	12/04/2005	D2	ICU	CS, IMP, CIP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	79	None	Pneumonia	FEP, IMP, PMB	Death
40	22/03/2005	E	ICU	CS, ATM	CTX-M-2	46	HIV, HBV, HCV, pulmonary tuberculosis	Bloodstream	FEP, CIP	Discharge
41	30/03/2005	E	ICU	CS, ATM, IMP, TZP	CTX-M-2	36	HIV	Urinary tract	PMB	Discharge
42	12/08/2005	F	ICU	CS, PIP, TZP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	39	Severe asthma	Bloodstream	CEZ, GM	Death
43	31/05/2005	G	ICU	CS, ATM	IMP-1	63	Pancreatic cancer	Pneumonia	IMP, PMB	Death

NOTE. AMK, amikacin; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacin; CRO, ceftriaxone; CS, colistin; FEP, cefepime; GM, gentamicin; IMP, imipenem; MEM, meropenem; NET, netilmicin; NIT, nitrofurantoin; PIP, piperacillin; PMB, Polymyxin B; TM, tobramycin; TZP, piperacillin/tazobactam; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ER, emergency room; HBV, hepatitis B virus infection; HCV, hepatitis C virus infection; HIV, human immunodeficiency virus infection; ICU, intensive care unit; NA, not available.

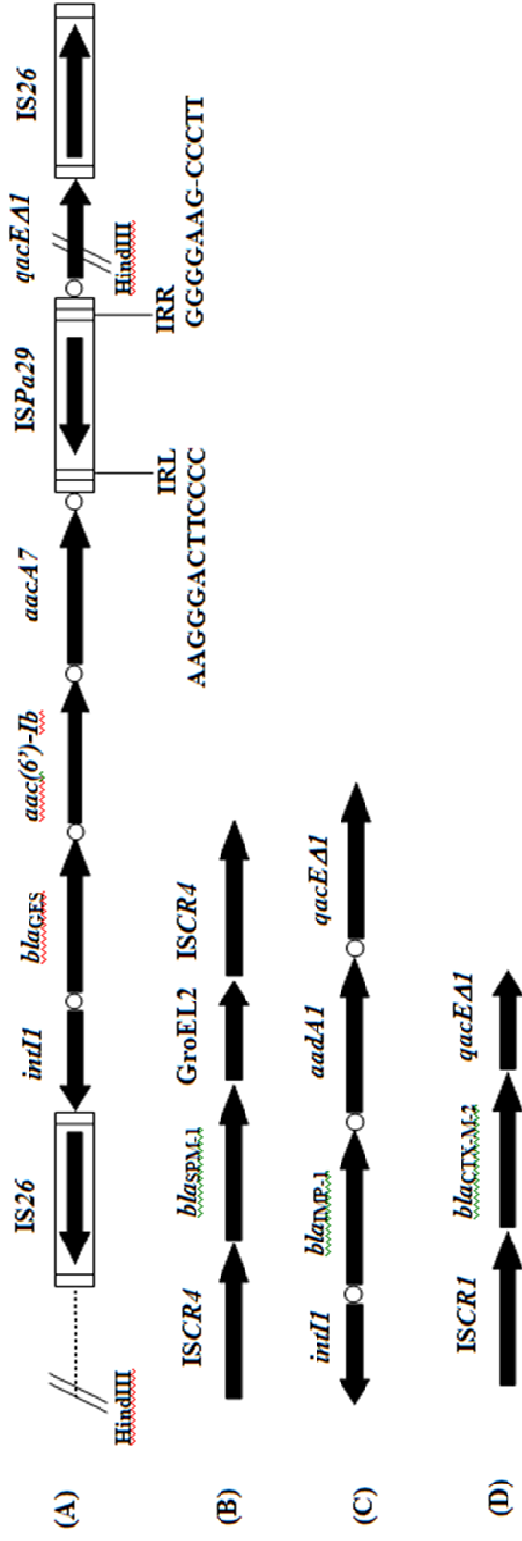


Figure 1. Schematic representation of the genetic environment of β -lactamase-encoding genes identified in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The coding genes are represented by arrows indicating their translation orientations and 59-base-elements are indicated as white circles. (A) Genetic environment of *bla_{GES-1}* and *bla_{GES-5}*. (B) Genetic environment of *bla_{IMP-1}*. (C) Genetic environment of *bla_{CTX-M-2}*.

DISCUSSÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno humano de caráter oportunista e que apresenta alta capacidade de adaptação ao meio hospitalar, fruto da mínima exigência nutricional, da resistência intrínseca e da habilidade de desenvolver resistência à maioria dos antimicrobianos. Certamente, esses fatores contribuíram para que *P. aeruginosa* se tornasse um dos principais agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde desde o último século (Strateva & Yordanov, 2009).

Para esta tese, foram estudados os isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de hemoculturas de pacientes internados no Hospital São Paulo durante o ano de 2005. Foram recuperados 150 isolados e, para os demais estudos, foram selecionados aqueles que apresentavam resistência à ceftazidima. Entre a coleção de isolados sensíveis à ceftazidima, uma amostra nos chamou a atenção por apresentar resistência à cefepima e, por isso, também foi selecionada para avaliação posterior. A realização deste projeto nos proporcionou duas publicações em um importante periódico da área, as quais foram apresentadas nesta tese.

O primeiro artigo trata da investigação do mecanismo responsável por resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima em uma amostra de *P. aeruginosa*

isolada de hemocultura no Hospital São Paulo, durante o ano de 2005. Trata-se de um fenótipo de resistência peculiar e pouco freqüente, visto que a maior parte das enzimas capazes de hidrolisar as cefalosporinas de 4ª geração hidrolisa as cefalosporinas de 3ª geração com igual eficiência.

Em 2001, pesquisadores franceses evidenciaram que a expressão de OXA-31 estava relacionada ao fenótipo de resistência à cefepime e sensibilidade à ceftazidima em um isolado clínico de *P. aeruginosa*. A enzima OXA-31, classificada como uma ESBL do tipo OXA, apresentava 98% de identidade com a seqüência de aminoácidos de OXA-1. Naquele trabalho, os pesquisadores realizaram o estudo da cinética de OXA-1 e de OXA-31, e evidenciaram que ambas eram capazes de hidrolisar eficientemente a cefepima, enquanto que não apresentavam atividade contra ceftazidima. Apesar destes achados, a enzima OXA-1 não é considerada uma ESBL do tipo OXA, como a OXA-31 (Aubert et al., 2001).

O sistema de efluxo MexXY-OprM é responsável pela resistência intrínseca a aminoglicosídeos, eritromicina e tetraciclina em cepas selvagens de *P. aeruginosa*, mediante a indução ocasionada pela exposição a estes agentes. Este sistema também é capaz de ejetar fluoroquinolonas e vários antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo a

cefepima; o que não ocorre, todavia, com a ceftazidima. Assim, mutantes que hiperexpressam o sistema MexXY-OprM podem ser selecionados pela exposição à cefepima e quinolonas, apresentando o fenótipo de resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima. Até o momento, pouco se sabe sobre a prevalência da hiperexpressão deste sistema em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Em 2006, pesquisadores franceses atribuíram o fenótipo de resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima à hiperexpressão do sistema de efluxo MexXY-OprM (Hocquet et al., 2006). Mais recentemente, durante uma epidemia de isolados de *P. aeruginosa* resistentes à cefepima e sensíveis à ceftazidima na UTI de um hospital espanhol, pesquisadores identificaram a disseminação de um mesmo clone no qual o sistema MexXY-OprM apresentava-se hiperexpresso (Pena et al., 2009).

Ainda não existem na literatura científica publicações que tratem da prevalência da hiperexpressão de sistemas de efluxo em isolados clínicos no Brasil. Porém, nos últimos anos, dois grupos de pesquisa dedicaram-se a ao estudo dos níveis de transcrição dos principais sistemas de efluxo em isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa*. Em 2008, ao avaliar uma coleção de 60 isolados de *P. aeruginosa* recuperados de hemoculturas de pacientes hospitalizados no complexo Hospital São

Paulo, Xavier evidenciou que MexXY-OprM foi o sistema de efluxo que encontrava-se hiperexpresso com maior frequência, em 60% das amostras, seguido pelos sistemas MexAB-OprM (31,7%) e MexCD-OprJ (18,3%) (Xavier, 2008). da Fonseca, por sua vez, observou em 2009, que os sistemas MexAB-OprM e MexXY-OprM estavam hiperexpressos em 16 de 17 isolados de *P. aeruginosa* avaliados, que haviam sido recuperados de pacientes hospitalizados em cinco hospitais na cidade de São Luís do Maranhão (da Fonseca, 2009). Estes achados sugerem que no Brasil, os isolados clínicos de *P. aeruginosa* comumente hiperexpressam o sistema de efluxo MexXY-OprM. Não existem, todavia, estudos clínicos que nos permitam concluir se ceftazidima seria uma boa opção para o tratamento de infecções causadas por estas bactérias.

No presente estudo, embora não tenhamos avaliado os níveis de transcrição dos sistemas de efluxo de *P. aeruginosa*, o fenótipo de resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima apresentado pela amostra clínica P6208 estava relacionado à produção de CTX-M-2, ESBL caracterizada pela grande capacidade de hidrolisar penicilinas, cefotaxima, ceftriaxona, cefepima e aztreonam, enquanto que praticamente não hidrolisa a ceftazidima.

Até a realização deste trabalho haviam sido descritas 91 enzimas do tipo CTX-M (<http://www.lahey.org/studies/webt.stm>). Baseado em suas seqüências de aminoácidos, estas enzimas podem ser classificadas em cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Canton & Coque, 2006; Rossolini et al., 2008).

O gene que codifica as enzimas do tipo CTX-M, particularmente aquelas pertencentes aos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9, foi capturado do cromossomo de bactérias ambientais do gênero *Kluyvera* spp. e incorporado a elementos genéticos móveis, o que possibilitou a sua disseminação entre bactérias patogênicas (Humeniuk et al., 2002; Poirel et al., 2002b). Inicialmente, estas enzimas se disseminaram de forma extremamente eficaz entre membros da família Enterobacteriaceae. De fato, atualmente, as enzimas do tipo CTX-M ocorrem de maneira endêmica em enterobactérias de todos os continentes (Canton & Coque, 2006). Posteriormente, enzimas do tipo CTX-M também foram descritas em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* no Japão e entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes da Holanda, Bolívia e, agora, no Brasil (al Naiemi et al., 2006; Celenza et al., 2006; Nagano et al., 2004; Picao et al., 2009b).

Duas metodologias são comumente utilizadas para a detecção fenotípica da produção de enzimas do tipo ESBL: a disco-adição e a disco-aproximação. A técnica de

disco adição, também conhecida como disco-combinado, utiliza os agentes antimicrobianos cefotaxima e ceftazidima individualmente e em combinação com ácido clavulânico. O aumento de pelo menos cinco milímetros no diâmetro do halo para quaisquer dos dois agentes antimicrobianos testados em combinação com ácido clavulânico contra o seu halo testado individualmente, indica a produção de ESBL (Ho et al., 1998). A técnica de disco aproximação, por sua vez, consiste em posicionar os discos de diferentes substratos beta-lactâmicos, como ceftazidima, cefepima, cefotaxima e ceftriaxona a três centímetros de distância de um disco de amoxicilina com ácido clavulânico. A deformação do halo de inibição ou o aparecimento de uma zona fantasma entre o substrato e o inibidor caracteriza fenotipicamente a amostra como produtora de ESBL (Jarlier et al., 1988; Jacoby & Han, 1996).

Os testes acima mencionados foram desenvolvidos para a detecção de ESBL em amostras de enterobactérias, não apresentando, contudo, valores satisfatórios de sensibilidade e especificidade quando aplicados à *P. aeruginosa*; razão pela qual o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) não recomenda a realização destes testes para a detecção de ESBL nesta espécie (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009).

Essa dificuldade é consequência da associação de diferentes mecanismos de resistência aos β -lactâmicos nesta espécie. A presença de cefalosporinases cromossomais do tipo AmpC, por exemplo, inativam as cefalosporinas de amplo espectro, sem que sofram a ação dos inibidores de β -lactamases. Estas enzimas podem degradar o substrato β -lactâmico e, conseqüentemente, mascarar a presença de ESBL, favorecendo, assim, a ocorrência de resultados falso-negativos. Tal interferência poderia ser anulada com a adição de um inibidor de AmpC como, por exemplo, a cloxacilina ao meio de cultura (Jiang et al., 2006). Entretanto, isolados de *P. aeruginosa* freqüentemente produzem enzimas do tipo OXA, as quais possuem atividade hidrolítica potente sobre cloxacilina dificultando a interpretação dos testes que utilizam este agente antimicrobiano (Poirel et al., 2009b). Amostras clínicas de *P. aeruginosa* podem possuir, ainda, diferentes mecanismos de resistência combinados, como a produção de metalo- β -lactamases, a hiperexpressão de bombas de efluxo ou a perda de porinas, os quais podem prejudicar a interpretação do teste para a detecção fenotípica da produção de ESBL.

De fato, a detecção fenotípica da enzima CTX-M-2, neste estudo, só foi possível com a realização do teste de disco aproximação em condições especiais: discos de cefotaxima e de cefepima dispostos a 1,5 cm de distância (centro a centro) do disco de

ticarcilina com ácido clavulânico. Este achado é de extrema importância clínica visto que muitos médicos, ao se depararem com um antibiograma de uma bactéria que é resistente à cefepima e sensível à ceftazidima e, sem a informação de que esta bactéria é produtora de uma ESBL, podem prescrever a ceftazidima para o tratamento da respectiva infecção, podendo resultar em falha terapêutica.

Na amostra estudada, o gene *bla*_{CTX-M-2} estava localizado à jusante da seqüência de inserção *ISCR1* e à montante do cassete gênico *qacEΔ1/sul1*. À montante de *ISCR1* havia outra cópia de *qacEΔ1/sul1*, que correspondia à porção 3'CS de um integron, cuja região variável não pôde ser determinada. Este arranjo é comumente observado entre os genes que codificam enzimas do tipo CTX-M em enterobactérias, especialmente aquelas enzimas pertencentes aos grupos CTX-M-2 e CTX-M-9 (Poirel et al., 2008).

O gene *ISCR1* codifica uma transposase responsável por ambas as etapas de iniciação e terminação da replicação, anteriores à etapa de recombinação envolvida no processo de transposição, conhecido como círculo-rolante (*rolling circle*). *ISCR1* pode mobilizar estruturas adjacentes a ele quando, durante a replicação, a transposase erra ao identificar a região que determinaria a terminação da replicação, prosseguindo pelo DNA

adjacente (Toleman et al., 2006). Assim, possivelmente a mobilização e posterior disseminação de *bla*_{CTX-M-2} do cromossomo de *Kluyvera* spp. tenha envolvido quatro etapas: a inserção de *ISCR1* nas adjacências do gene *bla*_{CTX-M-2} no cromossomo bacteriano; a posterior transposição, onde um erro na terminação da replicação fez com que *bla*_{CTX-M-2} fosse carregado juntamente com *ISCR1*; a recombinação homóloga com uma cópia de *ISCR1* originalmente situada à jusante do integron do tipo *sul1* em um plasmídeo conjugativo; e, por fim, a conjugação pela qual *bla*_{CTX-M-2} foi transmitido a outras espécies (Poirel et al., 2008).

O fato de havermos encontrado o gene *bla*_{CTX-M-2} em um contexto genético idêntico àquele que é tipicamente encontrado entre enterobactérias sugere a transmissão horizontal e inter-espécies destas estruturas. Além disso, na amostra de *P. aeruginosa* estudada, o gene *bla*_{CTX-M-2} estava localizado no cromossomo bacteriano. Considerando que na maioria das enterobactérias produtoras de enzimas do tipo CTX-M-2 o respectivo gene é carregado por plasmídeos, podemos sugerir que, após um evento de conjugação, um plasmídeo contendo *bla*_{CTX-M-2} foi perdido após este gene e a estrutura que o mobilizava terem se inserido no cromossomo de *P. aeruginosa*, o que provavelmente

teria resultado da incompatibilidade entre o referido plasmídeo e o ambiente em *P. aeruginosa*.

Embora este estudo tenha possibilitado perceber a ocorrência de enzimas do tipo CTX-M entre isolados de *P. aeruginosa* no Brasil, sua prevalência ainda é desconhecida e, portanto, são necessários outros estudos que relatem a extensão deste problema. Com o objetivo de responder a este questionamento, recentemente, Picão e colaboradores realizaram um estudo no qual a presença do gene *bla*_{CTX-M} foi investigada em uma coleção de 105 isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes à cefepima, recuperados em dezesseis hospitais de oito cidades brasileiras: São Paulo, Rio de Janeiro, Porto Alegre, Salvador, Belo Horizonte, Blumenau, Curitiba e São Luís do Maranhão. Neste estudo, amostras recuperadas nas cidades de São Paulo (n=2) e Porto Alegre (n=1) apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-2}, resultando em uma frequência de 3,8 % entre os isolados resistentes à cefepima (Picão et al., 2009a).

O segundo trabalho apresentado teve como principal objetivo determinar o mecanismo enzimático envolvido na resistência a ceftazidima entre amostras de *P. aeruginosa* coletadas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital São Paulo, durante o ano de 2005. Neste estudo, foi determinado o perfil de sensibilidade a

diferentes antimicrobianos nas amostras estudadas, assim como foram pesquisados, nos prontuários médicos dos pacientes infectados pelas amostras em estudo, informações a respeito da doença de base apresentada, a fonte primária da infecção e a terapia antimicrobiana administrada. Foram investigados, em seguida, a produção de β -lactamases, o contexto e o suporte genético dos genes que as codificavam. Por fim, foi realizada a tipagem molecular dos isolados.

Entre os isolados de *P. aeruginosa* recuperados em hemoculturas colhidas no Hospital São Paulo durante o ano de 2005, 28% apresentaram resistência a ceftazidima. Para estes isolados, aztreonam apresentou a maior taxa de sensibilidade (44,1%), seguido por piperacilina-tazobactam (39,5%), piperacilina (34,8%) e imipenem (16,2%), enquanto que nenhuma destas amostras apresentou sensibilidade ao cefepime. As taxas de sensibilidade observadas para gentamicina, ciprofloxacina e amicacina foram 11,6%, 9,3% e 16,2%, respectivamente. Somente a polimixina B foi efetiva contra todos os isolados (100% de sensibilidade). A concentração inibitória mínima de diferentes antimicrobianos frente aos isolados estudados, estão apresentadas em anexo (Anexo I, página 104).

Um estudo recentemente publicado por Andrade e colaboradores, no qual foram avaliados isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados em diferentes hospitais brasileiros entre os anos 2003 e 2008, revelou uma taxa de resistência a ceftazidima de 30,9%, e 0,1% de resistência à polimixina, valores muito semelhantes àqueles observados neste trabalho (Andrade et al., 2008).

A avaliação dos prontuários médicos nos permitiu perceber que metade dos pacientes que apresentavam infecção da corrente sanguínea causada pelas amostras de *P. aeruginosa* estudadas recebeu terapia adequada por sete ou mais dias. Desses, 52,6 % receberam alta hospitalar, enquanto que 47,3 % evoluíram ao óbito. Em todos estes casos, o óbito estava relacionado a choque séptico. Entre os pacientes que receberam um antimicrobiano ao qual o isolado estudado era resistente, ou mesmo aqueles pacientes que receberam terapia adequada ao perfil de sensibilidade apresentado pelo isolado de *P. aeruginosa* estudados, porém por menos de sete dias, 21% tiveram o quadro infeccioso revertido e receberam alta hospitalar. Entretanto, 79% destes pacientes evoluíram ao óbito (Anexos II e III, páginas 107 e 109, respectivamente). Estes dados são preocupantes por refletirem que, possivelmente, a terapia empírica praticada nesta instituição de saúde em 2005 não estava condizente com o perfil de sensibilidade demonstrado pela maior

parte dos isolados bacterianos, ao menos entre *P. aeruginosa*. Por outro lado, essa análise apresenta uma série de limitações, fruto da natureza microbiológica e, portanto, não clínica deste trabalho. Assim, faz-se necessário a realização de um estudo que analise mais detalhadamente os prontuários destes pacientes, avaliando individualmente cada caso e, só então, correlacionar a evolução do quadro clínico do paciente aos dados microbiológicos aqui fornecidos.

O mecanismo responsável pela resistência à ceftazidima na maior parte da amostras (n=27; 62,8%), foi a produção da metalo- β -lactamase SPM-1. Entre os isolados produtores desta enzima, o agente β -lactâmico que apresentou a maior taxa de sensibilidade foi aztreonam (51,8%), resultado esperado visto que SPM-1, assim como outras metalo- β -lactamases, não apresenta atividade sobre aztreonam. Por outro lado, os produtores de SPM-1 apresentaram altas taxas de sensibilidade à piperacilina e à piperacilina/tazobactam: 48,1% e 40,7%; respectivamente. É importante ressaltar aqui que para a análise da sensibilidade a estes agentes foram utilizados os pontos de corte recomendados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/), onde cepas de *P. aeruginosa* apresentam sensibilidade a piperacilina e piperacilina/tazobactam, quando as respectivas

CIMs são ≤ 16 mg/L e $\leq 16/16$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Caso houvésemos analisado estes resultados utilizando os pontos de corte recomendados pelo CLSI – sensibilidade a piperacilina e piperacilina/tazobactam quando CIM ≤ 64 e $\leq 64/4$ $\mu\text{g/mL}$ –, as taxas de sensibilidade a estes agentes entre as amostras produtoras de SPM-1 seriam ainda maiores: 85,2% e 77,8%; respectivamente.

É sabido que SPM-1 hidrolisa preferencialmente cefalosporinas; porém esta enzima é também capaz de hidrolisar as penicilinas, e, entre estas, SPM-1 apresenta maior eficiência hidrolítica contra piperacilina (Murphy et al., 2003). Assim, é preocupante o fato de cerca de metade das amostras produtoras de SPM apresentarem sensibilidade in vitro a este agente, visto que este fato não prediz sua eficácia para o tratamento de infecções causadas por amostras produtoras de SPM-1. Nestes casos, a detecção fenotípica da produção de MBL seria valiosa. Porém, infelizmente, esta não é uma prática empregada rotineiramente nos laboratórios de microbiologia clínica.

Os pesquisadores que caracterizaram geneticamente a enzima SPM-1 reportaram, inicialmente, que o gene que a codifica, *bla*_{SPM-1}, estava localizado em um plasmídeo de alto peso molecular, capaz de se replicar tanto em *P. aeruginosa*, como em *E. coli* (Toleman et al., 2002). Contudo, em uma revisão sobre carbapenemases

recentemente publicada, Walsh afirmou que *bla*_{SPM-1} está, sem exceção, localizado no cromossomo bacteriano (Walsh, 2008), embora faça parte de um elemento genético móvel formado por duas cópias de uma seqüência de inserção nomeada *ISCR4* (Poirel et al., 2004b).

No presente estudo, diversas tentativas de transferir *bla*_{SPM-1} por conjugação e por transformação falharam, mesmo utilizando cepas de *P. aeruginosa* como receptoras. Adicionalmente, obtivemos resultados negativos em diferentes experimentos de extração e eletroforese de DNA plasmidial, seguido por transferência a uma membrana de nylon e posterior hibridização com sonda *bla*_{SPM-1} marcada. A investigação do contexto genético revelou em todas as amostras a mesma estrutura observada anteriormente por Poirel e colaboradores (2004b). Estes achados reforçam a natureza cromossomal e altamente conservada de *bla*_{SPM-1}.

Um dos isolados de *P. aeruginosa* estudados apresentava a produção da metalo- β -lactamase do tipo IMP-1. No Brasil, a produção de enzimas do tipo IMP entre amostras de *P. aeruginosa* é bem menos freqüente que a de SPM-1. Enquanto a produção de SPM-1 foi identificada por todo território brasileiro, isolados de *P. aeruginosa* produtoras de enzimas do tipo IMP foram identificados, até o momento, apenas em

Brasília, São Paulo e Porto Alegre (Martins et al., 2007; Mendes et al., 2004; Sader et al., 2005). Como normalmente observado em amostras produtoras de enzimas do tipo IMP, neste estudo o gene *bla*_{IMP-1} ocupava a primeira posição em um integron de classe 1, seguido por um cassete gênico responsável por conferir resistência aos aminoglicosídeos. Embora as estruturas envolvidas na mobilização do gene *bla*_{IMP-1} não tenham sido evidenciadas, os experimentos realizados sugerem que este gene também estava localizado no cromossomo bacteriano.

Outro mecanismo de resistência evidenciado em nove dos quarenta e três isolados de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima estudados (20,9%) foi a produção de enzimas do tipo GES. Estas β -lactamases constituem ESBLs peculiares por apresentarem a possibilidade de aumentar seu espectro hidrolítico contra o imipenem, como resultado da substituição de um único aminoácido no seu sítio ativo. A enzima GES-1 foi caracterizada a partir de um isolado de *K. pneumoniae*, originário da Guiana Francesa, em 2000 (Poirel et al., 2000). A partir de então, variantes do tipo GES foram descritas em diversas espécies de enterobactérias e em diferentes países, como Grécia, Portugal, Japão, Coréia, Holanda, Canadá e Brasil (de Vries et al., 2006; Dropa et al., 2009; Duarte et al., 2003; Jeong et al., 2005; Poirel et al., 2009a; Vourli et al., 2004; Wachino et al., 2004).

Amostras de *P. aeruginosa* produtoras de enzimas do tipo GES foram isoladas na Grécia, África do Sul, Argentina, França, China, Brasil e Espanha (Castanheira et al., 2004a; da Fonseca et al., 2007; Dubois et al., 2002; Pasteran et al., 2005; Viedma et al., 2009; Wang et al., 2006; Weldhagen e Prinsloo, 2004). Até o momento existem 12 variantes descritas e, destas, GES-2, -4, -5, -6 e -11 são adicionalmente capazes de hidrolisar carbapenems (Moubareck et al., 2009; Walsh, 2008). No Brasil, três relatos reportam a ocorrência de enzimas do tipo GES em amostras clínicas de *P. aeruginosa*, isoladas na cidade de São Paulo (GES-1), em São Luís do Maranhão (GES-1 e GES-5) e no Rio de Janeiro (os autores não realizaram o seqüenciamento do gene amplificado) (Castanheira et al., 2004a; da Fonseca et al., 2007; Pellegrino et al., 2006).

Neste estudo, identificamos na cidade de São Paulo sete isolados de *P. aeruginosa* produtores de GES-1 e dois produtores de GES-5. Entre os agentes β -lactâmicos, os isolados produtores de GES-1 apresentaram a maior taxa de sensibilidade ao imipenem (71,4%), seguido por piperacilina/tazobactam (57,1%) e meropenem (28,6%); enquanto que os isolados produtores de GES-5 mostraram-se resistentes a todos os β -lactâmicos, com exceção de aztreonam (50% de sensibilidade, n=1). Entre os sete produtores de GES-1, observamos a predominância de um mesmo clone (seis amostras,

genótipo B), enquanto que uma amostra produtora de GES-1 pertencia ao genótipo C, o mesmo apresentado pelos produtores de GES-5 (Anexo IV, página 110).

Além disso, os sete isolados produtores de GES-1, independente da diferença de genótipo, apresentaram seqüências idênticas de *bla*_{GES-1}. Estas seqüências identificadas diferiam daquela de *bla*_{GES-1} descrita a amostra de *K. pneumoniae* originária da Guiana Francesa (código de acesso no GenBank AF156485), por uma mutação (silenciosa) na posição 591 (T→C). Esta mutação, entretanto, estava presente em *bla*_{GES-1} identificado em *P. aeruginosa* isolada em São Luis do Maranhão (da Fonseca et al., 2007, código de acesso no GenBank DQ 236170). Da mesma maneira, as seqüências de *bla*_{GES-5} identificadas neste estudo também diferiam daquela de *bla*_{GES-5} primeiramente descrita (código de acesso no GenBank AY 494717), apresentando uma substituição A→G, na posição 54. É importante ressaltar, ainda, que a amostra de *P. aeruginosa* produtora de GES-5 isolada em São Luis do Maranhão também apresentava esta mutação silenciosa no gene correspondente (da Fonseca et al., 2007, código de acesso no GenBank DQ 236171).

Assim, quando comparamos as seqüências de *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} primeiramente descritas, observamos a divergência de três pares de base: posições 54,

493 e 591. Neste estudo, porém, como resultado das mutações silenciosas acima mencionadas, a comparação das seqüências de *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} identificadas demonstrou existir divergência de um único par de base, na posição 493. Logicamente, esta divergência é aquela que determina a alteração do aminoácido na posição 170 de Ambler (glicina para serina), substituição responsável pelo maior espectro hidrolítico de GES-5 (Anexo V, página 111). Estes achados sugerem que, no hospital estudado, o gene *bla*_{GES} pode ter evoluído de forma a aumentar o espectro hidrolítico da enzima correspondente, provavelmente como resposta à pressão seletiva do uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar, como ilustra a árvore filogenética construída com as seqüências de *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} primeiramente descritas e as sequencias de *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} identificadas neste estudo (Anexo V).

A análise das seqüências de DNA à montante e à jusante de *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} evidenciou que tais genes estavam inseridos em estruturas genéticas idênticas. *bla*_{GES} era seguido pelos cassetes gênicos *aac(6')-Ib-cr* e *aacA7*. O segmento *attC* do cassete *aacA7* foi interrompido por uma nova seqüência de inserção, nomeada *ISPa29*, que estava posicionada imediatamente antes do cassete *qacEA1/sulI*, a porção conservada 3'CS dos integrons da classe 1.

A seqüência de inserção *ISPa29* pertence à família das *IS1111*, formada por elementos que apresentam algumas particularidades, tais como: (i) seqüências repetidas invertidas de 11 a 13 pb subterminais, ou seja, que não estão presentes nas margens do gene; (ii) mecanismo de transposição que não gera duplicação do sítio de inserção e (iii) a seqüência que codifica a transposase não é delimitada pelas seqüências repetidas invertidas. Ao contrário, estes elementos apresentam cerca de 50-100 pb e 200-300 pb à montante e à jusante da região codificante, respectivamente, cuja função é desconhecida (Partridge e Hall, 2003; Post e Hall, 2009). A característica mais marcante de *ISPa29*, no entanto, não é comum a todos os membros da família *IS1111*. Trata-se de sua especificidade pelos sítios de recombinação *attC* de cassetes gênicos, que a faz pertencer ao subgrupo *IS1111-attC* (Tetu & Holmes, 2008). Esta característica faz com que estes elementos sejam inseridos em integrons sem que ocorra o truncamento de genes. Sua inserção, porém, pode prejudicar a expressão do cassete gênico posicionado à jusante da IS, a menos que esta seqüência de inserção carregue consigo um promotor que aumente os níveis de transcrição daquele gene adjacente. Segundo Tetu & Holmes (2008), as interações de elementos do subgrupo *IS1111-attC* com integrons em *Pseudomonas* spp. parecem seguir um rápido ciclo de infecção, expansão e extinção; de modo que a consequência deste processo seja a transformação de parte deste integron. Ainda segundo

estes autores, a disseminação deste tipo de elementos de inserção parece ter ocorrido recentemente entre isolados clínicos de *Pseudomonas* spp. Assim, as interações de *IS1111-attC* com integrons possivelmente representam uma etapa inicial de um processo evolutivo, podendo contribuir, futuramente, com a formação de mosaicos de elementos genéticos, tais como as ilhas genômicas. É interessante notar que *ISPa21*, um elemento do tipo *IS1111-attC*, foi descrito em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na França, inserido em um integron de classe 1 que também abrigava o gene *bla_{GES-9}* (Poirel et al., 2005a).

Em ambas as extremidades 5'CS e 3'CS do integron identificado neste estudo, foram observadas seqüências de inserção *IS26*, em orientações opostas, possivelmente formando um transposon composto. Infelizmente, não pudemos evidenciar as repetições diretas nas extremidades das *IS26* e, assim, não podemos afirmar categoricamente que este transposon seria responsável pela mobilização da estrutura envolvendo *bla_{GES}* nas amostras estudadas.

Diferentes achados indicaram que os genes *bla_{GES-1}* e *bla_{GES-5}* estavam localizados no cromossomo bacteriano das amostras estudadas. Em primeiro lugar, diversas tentativas de transferir *bla_{GES}* por conjugação e transformação falharam; assim

como os experimentos de hibridização com sonda *bla*_{GES} marcada em membranas de nylon contendo preparações de DNA plasmidial. Em segundo lugar, a hibridização do DNA presente no gel de PFGE com sonda *bla*_{GES} revelou a presença de sinal, localizado em diferentes locais do genoma, dependendo do genótipo apresentado pela amostra (Anexo IV, página 110). Finalmente, o seqüenciamento do DNA à montante da cópia de IS26, adjacente à extremidade 5'CS do integron em estudo, revelou a presença de genes constitutivos de *P. aeruginosa*.

Como mencionado anteriormente, três outros estudos reportaram a produção de enzimas do tipo GES entre amostras de *P. aeruginosa* no Brasil, sendo que em dois destes trabalhos a estrutura na qual o gene *bla*_{GES} estava inserido foi identificada (Castanheira et al., 2004a; da Fonseca et al., 2007). Como observado no presente estudo, os autores dos trabalhos anteriormente publicados evidenciaram que o gene *bla*_{GES} encontrava-se inserido em integrons da classe-1. Porém, as regiões variáveis destes integrons eram completamente distintas entre si, e também distintas daquela presente no integron In52, no qual o gene *bla*_{GES} foi primeiramente descrito (Poirel et al., 2000). A diversidade estrutural dos integrons associados ao gene *bla*_{GES}, somada aos achados de amostras distintas produtoras de enzimas do tipo GES provenientes de diferentes e

distantes locais no Brasil, e mesmo em outros países como a Guiana Francesa e a Argentina, sugerem que as amostras produtoras de GES já estejam estabelecidas na América Latina, podendo haver, ainda, um grande nicho ecológico não detectado desse gene nessa região.

Na coleção de isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima estudada, duas (4,6%) apresentaram a produção de CTX-M-2. Tais amostras foram isoladas em um curto intervalo de tempo a partir de pacientes internados simultaneamente na mesma unidade. Estes dados, somados ao fato de os isolados apresentarem o mesmo genótipo, sugerem a ocorrência de transmissão cruzada entre os pacientes. Assim como observado na amostra descrita no primeiro trabalho apresentado, nos isolados deste segundo estudo, *bla*_{CTX-M-2} estava localizado no cromossomo bacteriano; à jusante de *ISCR1*, e entre duas cópias de *qacEΔ1/sulI* da extremidade 3'CS de um integron do tipo *sulI*. Visto que CTX-M-2 não hidrolisa ceftazidima com eficiência, estes isolados certamente apresentam outro mecanismo de resistência associado e, considerando que resistência à ceftazidima foi o critério adotado para a seleção das amostras a serem estudadas, a ocorrência de CTX-M em *P. aeruginosa* aqui visualizada possivelmente está subestimada.

Quatro dos isolados resistentes à ceftazidima estudados apresentaram reversão da resistência a este agente na presença de cloxacilina, substância capaz de inibir a atividade de cefalosporinases cromossomais. Tais isolados foram então considerados hiperprodutores de AmpC. Ainda assim, estas amostras não foram excluídas da pesquisa de β -lactamases adquiridas, as quais não apresentaram, contudo, atividade hidrolítica contra cefepima e imipenem, ou qualquer amplificação dos genes avaliados pela técnica de PCR. É interessante notar, ainda, que todos os isolados hiperprodutores de AmpC apresentavam sensibilidade aos aminoglicosídeos testados, o que reforça a inexistência de outros determinantes de resistência aos β -lactâmicos, visto que cassetes gênicos que conferem resistência aos aminoglicosídeos frequentemente estão associados a genes codificadores de β -lactamases adquiridas. Adicionalmente, três das quatro amostras hiperprodutoras de AmpC apresentavam resistência aos carbapenens. Este achado pode ser resultado da diminuição da expressão de OprD, porina pela qual os carbapenens entram na célula bacteriana, e/ou mutações no gene que codifica a enzima AmpC, visto que substituições de aminoácidos específicos em seu sítio ativo ocasionam o aumento do espectro hidrolítico destas enzimas que passam a hidrolisar o imipenem (Lister, 2002; Rodriguez-Martinez et al., 2009). Cefalosporinases que apresentam tais mutações são conhecidas como ESAC (**E**xtended-**S**pectrum **A**mp**C**), ou cefalosporinases de espectro

estendido, e foram recentemente descritas em um estudo realizado na França (Rodriguez-Martinez et al., 2009). Entretanto, outros experimentos são necessários para confirmar esta hipótese.

A realização deste projeto permitiu a identificação da produção de diferentes β -lactamases entre isolados de *P. aeruginosa* no Hospital São Paulo, cuja disseminação parece estar mais associada à disseminação de clones por transmissão cruzada entre pacientes. Estes achados foram apresentados à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e ao Laboratório de Microbiologia da respectiva instituição, para que sejam discutidos os protocolos vigentes, visando à melhoria da assistência à saúde prestada.

Com a experiência adquirida ao longo da realização desse trabalho, pretendemos ampliar a linha de pesquisa já existente no Laboratório ALERTA da Disciplina de Infectologia da UNIFESP, na tentativa de compreender a dinâmica da resistência bacteriana além do ambiente hospitalar.

CONCLUSÕES

- Aproximadamente um terço dos isolados de *P. aeruginosa* recuperados de hemoculturas durante o ano de 2005 no Hospital São Paulo, eram resistentes à ceftazidima, os quais apresentaram taxas de resistência superiores a 80% a outros β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Por outro lado, nenhum isolado apresentou resistência à polimixina.

- A produção da ESBL CTX-M-2 foi identificada como responsável pelo fenótipo de resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima observado.

- Entre os isolados resistentes à ceftazidima as β -lactamases mais frequentes foram: a MBL SPM-1, seguida pela ESBL GES-1, a hiperprodução da cefalosporinase cromossomal AmpC, a ESBL CTX-M-2 e a MBL IMP-1.

- Os genes codificadores das β -lactamases adquiridas foram identificados no cromossomo bacteriano, sendo que *bla*_{SPM-1} e *bla*_{CTX-M-2} estavam associados aos elementos genéticos móveis ISCR4 e ISCR1, respectivamente; e *bla*_{GES} e *bla*_{IMP-1} estavam inseridos em integrons da classe 1. Possivelmente, a disseminação de *bla*_{GES} estava relacionada ao transposon composto formado por duas cópias de IS26.

- A tipagem molecular dos isolados revelou que a frequência das β -lactamases identificadas está relacionada à disseminação de clones epidêmicos.

- Embora a produção de β -lactamases exerça um importante papel na resistência aos β -lactâmicos, o perfil de sensibilidade apresentado pelos isolados estudados sugere a existência da associação de diferentes mecanismos de resistência.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpaka, P.E. , W. H. Swanston, H. N. Ihemere, A. Correa, J. A. Torres, J. D. Tafur, M.C. Montealegre, J. P. Quinn & M.V. Villegas. 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 2670-2671.

al Naiemi, N., B. Duim & A. Bart. 2006. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Med. Microbiol.* **55**:1607-1608.

Ambler, R. P. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **289**:321-331.

Andrade, S., H. S. Sader, A. Barth, J. Ribeiro, C. Zoccoli, A. C. C. Pignatari & A. C. Gales. 2008. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacilli Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2003-2008). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **12**:3-9.

Aubert, D., D. Girlich, T. Naas, S. Nagarajan & P. Nordmann. 2004. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum beta-lactamase bla_{VEB} gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:3284-3290.

Aubert, D., L. Poirel, J. Chevalier, S. Leotard, J. M. Pages & P. Nordmann. 2001. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1615-1620.

Bae, I. K., Y. N. Lee, S. H. Jeong, S. G. Hong, J. H. Lee, S. H. Lee, H. J. Kim & H. Youn. 2007. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **58**:465-468.

Bauernfeind, A., H. Grimm & S. Schweighart. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**:294-298.

Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, P. Mangold, S. Amann, E. Akalin, O. Ang, C. Bal & J. M. Casellas. 1996. Characterization of beta-lactamase gene bla_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:616-620.

Bennett, J. W., M. L. Herrera, J. S. Lewis, B. W. Wickes & J. H. Jorgensen. 2009. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:292-294.

Bert, F., D. Vanjak, V. Leflon-Guibout, S. Mrejen, S. Delpierre, A. Redondo & M. H. Nicolas-Chanoine. 2007. IMP-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a French patient repatriated from Malaysia: impact of early detection and control measures. *Clin.Infect.Dis.* **44**:764-765.

Blondel-Hill, E., D. A. Henry & D. P. Speert. *Pseudomonas*, p. 734-748. Em Murray, P.R. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press, 2007.

Bush, K. 1989a. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:264-270.

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

Bush, K., G. A. Jacoby & A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211-1233.

Canton, R. & T. M. Coque. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr.Opin.Microbiol.* **9**:466-475.

Carvalho, A. P., R. M. Albano, D. N. de Oliveira, D. A. Cidade, L. M. Teixeira & E. A. Marques. 2006. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb.Drug Resist.* **12**:103-108.

Castanheira, M., J. M. Bell, J. D. Turnidge, D. Mathai & R. N. Jones. 2009. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**: 1225-1227.

Castanheira, M., R. E. Mendes, T. R. Walsh, A. C. Gales & R. N. Jones. 2004a. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**: 2344-2345.

Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt & T. R. Walsh. 2004b. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4654-4661.

Celenza, G., C. Pellegrini, M. Caccamo, B. Segatore, G. Amicosante & M. Perilli. 2006. Spread of *bla*_{CTX-M}-type and *bla*_{PER-2} beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:975-978.

Cipriano, R., V. V. Vieira, E. L. Fonseca, K. Rangel, F. S. Freitas & A. C. Vicente. 2007. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microb. Drug Resist.* **13**:142-146.

Claeys, G., G. Verschraegen, T. de Baere, & M. Vanechoutte. 2000. PER-1 beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:924-925.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Collis, C.M. & R. M. Hall. 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* **19**: 2875-2885.

Collis, C.M. & R. M. Hall. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 155-162.

Craig, N. Mobile DNA: an introduction, p. 3-12. Em Craig, N., R. Craigie, M. Gellert, A.M. Lambowitz. Mobile DNA II. Washington DC. ASM Press: 2002.

Crowder MW, J. Spencer & A.J. Vila. (2006). Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc. Chem. Res.* **39**:721-728.

da Fonseca. Expressão de genes de resistência intrínsecos e adquiridos em *Pseudomonas aeruginosa* e funcionalidade de cassetes gênicos associados a integrons classe 1. 2009. 160f. Tese (Doutorado) – Pós graduação em biologia parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

da Fonseca, E. L., V. V. Vieira, R. Cipriano & A. C. Vicente. 2007. Emergence of *bla*_{GES-5} in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:576-577.

Danel, F., L. M. Hall, D. Gur & D. M. Livermore. 1997. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:785-790.

David, M., J. F. Lemeland & S. Boyer. 2008. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: about 24 cases at Rouen University Hospital. *Pathol. Biol. (Paris)* **56**:429-434.

de Vries, J. J., W. H. Baas, P. K. van der, A. Heesink, J. E. Degener & J. P. Arends. 2006. Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**:1153-1158.

Docquier, J. D., F. Luzzaro, G. Amicosante, A. Toniolo & G. M. Rossolini. 2001. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:910-911.

Docquier, J. D., M. L. Riccio, C. Mugnaioli, F. Luzzaro, A. Endimiani, A. Toniolo, G. Amicosante & G. M. Rossolini. 2003. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1522-1528.

Dropa, M., L. C. Balsalobre, N. Lincopan, E. M. Mamizuka, V. C. Cassettari, G. R. Matte & M. H. Matté. 2009. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02944.x

Duarte, A., F. Boavida, F. Grosso, M. Correia, L. M. Lito, J. M. Cristino & M. J. Salgado. 2003. Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1481-1482.

Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, C. Andre, L. Coulange & C. Quentin. 2005. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4129-4138.

Dubois, V., L. Poirel, C. Marie, C. Arpin, P. Nordmann & C. Quentin. 2002. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*_{GES-1} and a fused product of *aac3-Ib/aac6'-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 638-645.

Duljasz, W., M. Gniadkowski, S. Sitter, A. Wojna & C. Jebelean. 2009. First organisms with acquired metallo-beta-lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2221-2222.

Empel, J., K. Filczak, A. Mrowka, W. Hryniewicz, D. M. Livermore & M. Gniadkowski. 2007. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2829-2834.

Erac, B. & Z. Gulay. 2007. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol.(Praha)* **52**:535-541.

Frost L.S., R. Leplae, A. O. Summers & A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* **3**:722-732.

Gales, A. C., R. N. Jones, J. Turnidge, R. Rennie & R. Ramphal. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* **32 Suppl 2**:S146-S155.

Gales, A. C., L. C. Menezes, S. Silbert & H. S. Sader. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:699-702.

Garza-Ramos, U., P. Tinoco, J. Silva-Sanchez, R. Morfin-Otero, E. Rodriguez-Noriega, G. Leon-Garnica, H. S. Sader & R. N. Jones. 2008. Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int.J.Antimicrob.Agents* **31**:78-80.

Girlich, D., T. Naas, A. Leelaporn, L. Poirel, M. Fennewald & P. Nordmann. 2002. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin.Infect.Dis.* **34**:603-611.

Girlich, D., T. Naas & P. Nordmann. 2004. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2043-2048.

Giuliani, F., J. D. Docquier, M. L. Riccio, L. Pagani & G. M. Rossolini. 2005. OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a blaVIM-1-

containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1973-1980.

Hall, R.M. & C.M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**: 593-600.

Higgins PG, L. Poirel, M. Lehmann, P. Nordmann & H. Seifert. (2009). OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.00856-09.

Ho, P. L., K. H. Chow, K. Y. Yuen, W. S. Ng & P. Y. Chau. 1998. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:49-54.

Hocquet, D., P. Nordmann, F. El Garch, L. Cabanne & P. Plesiat. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1347-1351.

Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia & A. Philippon. 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3045-3049.

Iyobe, S., H. Kusadokoro, A. Takahashi, S. Yomoda, T. Okubo, A. Nakamura & K. O'Hara. 2002. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2014-2016.

Jacobs, C., J. M. Frere & S. Normark. 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88**:823-832.

Jacoby, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:161-82, Table.

Jacoby, G. A. & P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:908-911.

V. Jarlier, M.H. Nicolas, G. Fournier & A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 867-878

- Jeong, S. H., I. K. Bae, D. Kim, S. G. Hong, J. S. Song, J. H. Lee & S. H. Lee.** 2005. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4809-4810.
- Jiang, X., Z. Zhang, M. Li, D. Zhou, F. Ruan & Y. Lu.** 2006. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2990-2995.
- Juan, C., X. Mulet, L. Zamorano, S. Alberti, J. L. Perez & A. Oliver.** 2009. Detection of the Novel Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) OXA-143 from a Plasmid-Located Integron in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.00822-09
- Kalai, B. S., W. Achour, M. Bejaoui, A. Abdeladhim & A. Ben Hassen.** 2009. Detection of SHV-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains by genetic methods. *Pathol.Biol.(Paris)* **57**:e73-e75.
- Koh, T. H., K. Yamaguchi & Y. Ishii.** 2008. Characterisation of the metallo-beta-lactamase VIM-6 and its genetic support. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**: 446-449.
- Koneman E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger & J.W.C. Winn.** Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. Em Koneman et al. Diagnóstico microbiológico. 2001. Rio de Janeiro: MEDSI. 5: 263-30.
- Lewin, B.** Transposons, p. 521-549. Em Lewin B., Genes IX. 9ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- Lister, P. D.** 2002. Chromosomally-encoded resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*: therapeutic implications. *Am. J. Pharmacogenomics.* **2**: 235-243.
- Lister, P. D., D. J. Wolter & N. D. Hanson.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin.Microbiol.Rev.* **22**:582-610.
- Livermore, D. M.** 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557-584.
- Livermore, D. M.** 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**:3-10.
-

Livermore, D. M. & N. Woodford. 2006. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. **14**:413-420.

Llanes, C., C. Neuwirth, F. El Garch, D. Hocquet & P. Plesiat. 2006. Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase. Clin. Microbiol. Infect. **12**:270-278.

Lodge, J. M. & L. J. Piddock. 1991. The control of class I beta-lactamase expression in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. J.Antimicrob.Chemother. **28**:167-172.

Luzzaro, F., E. Mantengoli, M. Perilli, G. Lombardi, V. Orlandi, A. Orsatti, G. Amicosante, G. M. Rossolini & A. Toniolo. 2001. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. J. Clin. Microbiol. **39**:1865-1870.

Mansour W., S. Dahmen, L. Poirel, K. Charfi, D. Bettaieb, N. Boujaafar & O. Bouallegue. (2009). Emergence of SHV-2a extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Tunisia. Microb. Drug Resist. **15**: 295-301.

Marchandin, H., H. Jean-Pierre, C. De Champs, D. Sirot, H. Darbas, P. F. Perigault & C. Carriere. 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 213-216.

Martins, A. F., A. P. Zavascki, P. B. Gaspareto & A. L. Barth. 2007. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. Infection **35**: 457-460.

Mendes R.E., M. Castanheira, M.A. Toleman, H.S. Sader, R.N. Jones & T.R. Walsh. 2007. Characterization of an integron carrying *bla*_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac(6')-31*, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. Antimicrob Agents Chemother. **51**:2611-2614.

Mendes, R. E., M. A. Toleman, J. Ribeiro, H. S. Sader, R. N. Jones & T. R. Walsh. 2004. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 4693-4702.

Mirsalehian, A., M. Feizabadi, F. A. Nakhjavani, F. Jabalameli, H. Goli & N. Kalantari. 2009. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-

spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. doi:10.1016/j.burns.2009.01.015.

Moubareck, C., S. Bremont, M. C. Conroy, P. Courvalin & T. Lambert. 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3579-3581.

Mugnier, P., P. Dubrous, I. Casin, G. Arlet & E. Collatz. 1996. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2488-2493.

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

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

Nagano, N., Y. Nagano, C. Cordevant, N. Shibata & Y. Arakawa. 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3978-3984.

Neonakis I.K., E.V. Scoulica, S.K. Dimitriou, A.I. Gikas & Y.J. Tselentis. 2003. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microb. Drug. Resist.* **9**:161-165.

Ni, M., D. Zhang & J. Qi. 2005. Analysis of AmpC beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Huazhong. Univ Sci. Technol. Med. Sci.* **25**:17-9, 23.

Nordmann, P., G. Cuzon & T. Naas. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **9**:228-236.

Nordmann, P. & T. Naas. 1994. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:104-114.

Nordmann, P. & L. Poirel. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**: 321-331.

- Pagani, L., E. Mantengoli, R. Migliavacca, E. Nucleo, S. Pollini, M. Spalla, R. Daturi, E. Romero & G. M. Rossolini.** 2004. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2523-2529.
- Pai, H. & G. A. Jacoby.** 2001. Sequences of the NPS-1 and TLE-1 beta-lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2947-2948.
- Pappas, G., K. Saplaoura & M. E. Falagas.** 2009. Current treatment of pseudomonal infections in the elderly. *Drugs Aging* **26**:363-379.
- Partridge, S. R. & R. M. Hall.** 2003. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *J. Bacteriol.* **185**:6371-6384.
- Partridge S.R., G. Tsafnat, E. Coiera & J.R. Iredell.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 757:784.
- Pasteran, F., D. Faccone, A. Petroni, M. Rapoport, M. Galas, M. Vazquez & A. Procopio.** 2005. Novel variant (*bla*_{VIM-11}) of the metallo-β-lactamase *bla*_{VIM} family in a GES-1 extended-spectrum-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 474-475.
- Pasteran, F., M. Rapoport, A. Petroni, D. Faccone, A. Corso, M. Galas, M. Vazquez, A. Procopio, M. Tokumoto & V. Cagnoni.** 2006. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3222-3224.
- Paterson, D. L. & R. A. Bonomo.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:657-686.
- Pellegrino, F. L., K. R. Netto-dos Santos, L. W. Riley & B. M. Moreira.** 2006. *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **10**: 251-253.
- Pena, C., C. Suarez, F. Tubau, C. Juan, B. Moya, M. A. Dominguez, A. Oliver, M. Pujol & J. Ariza.** 2009. Nosocomial outbreak of a cefepime-nonsusceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 β-lactamase. *J. Clin. Microbiol.* doi: 10.1128/JCM.00094-09
-

Picão, R.C., L.C.C. Felhberg, P.P. Barbosa, R. Girardello; K.C. Bauab & A. C. Gales. 2009a. Cefotaximases (CTX-M) em *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): devemos nos preocupar? **25° Congresso Brasileiro de Microbiologia.** Porto de Galinhas, PE. Poster A03-090.

Picão, R. C., L. Poirel, A. C. Gales & P. Nordmann. 2009b. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 2225-2226.

Poirel, L., L. Brinas, N. Fortineau & P. Nordmann. 2005a. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3593-3597.

Poirel, L., L. Brinas, A. Verlinde, L. Ide & P. Nordmann. 2005b. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3743-3748.

Poirel, L., A. Carrer, J. D. Pitout & P. Nordmann. 2009a. Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2492-2498.

Poirel, L., P. Gerome, C. De Champs, J. Stephanazzi, T. Naas & P. Nordmann. 2002a. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 566-569.

Poirel, L., P. Kampfer & P. Nordmann. 2002b. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 4038-4040.

Poirel, L., T. Le, I. T. Naas, A. Karim & P. Nordmann. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 622-632.

Poirel, L., E. Lebessi, M. Castro, C. Fevre, M. Foustoukou & P. Nordmann. 2004a. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2277-2279.

Poirel, L., M. Magalhaes, M. Lopes & P. Nordmann. 2004b. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene *bla*_{S_{PM}-1}-surrounding sequences from disseminated

Pseudomonas aeruginosa isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1406-1409.

Poirel, L., T. Naas & P. Nordmann. 2008. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**:75-81.

Poirel, L., T. Naas & P. Nordmann. 2009b. Class D beta-lactamases: Diversity, Epidemiology and Genetics. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01512-08

Poirel, L., E. Ronco, T. Naas & P. Nordmann. 1999. Extended-spectrum β -lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**: 651-652.

Poirel, L., V. O. Rotimi, E. M. Mokaddas, A. Karim & P. Nordmann. 2001a. VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 468-470.

Poirel, L., G. F. Weldhagen, T. Naas, C. De Champs, M. G. Dove & P. Nordmann. 2001b. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2598-2603.

Post, V. & R. M. Hall. 2009. Insertion sequences in the IS1111 family that target the attC recombination sites of integron-associated gene cassettes. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**: 182-187.

Queenan, A. M. & K. Bush. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 440-58.

Recchia G.D., H.W. Stokes & R.M. Hall. 1994. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase. *Nucleic Acid Res.* **22**: 2071-2078.

Recchia G.D. & R.M. Hall. 1997. Origins of mobile genes cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* **5**: 389-394.

Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel & P. Nordmann. 2009. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1766-1771.

Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea & C. Mugnaioli. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**: 33-41.

Ryoo, N. H., K. Lee, J. B. Lim, Y. H. Lee, I. K. Bae & S. H. Jeong. 2009. Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo-beta-lactamase in a Korean hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **63**:115-117.

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

Sader, H. S., A. O. Reis, S. Silbert & A. C. Gales. 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 73-76.

Sanschagrín, F., N. Bejaoui & R. C. Levesque. 1998. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1966-1972.

Schmidtke, A. J. & N. D. Hanson. 2006. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2030-2037.

Sevillano, E., L. Gallego & J. M. Garcia-Lobo. 2009. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol.Biol.(Paris)*. **57**: 493-495.

Siarkou, V. I., D. Vitti, E. Protonotariou, A. Ikonomidis & D. Sofianou. 2009. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*_{VIM-17} metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 1325-1330.

Siefert, J.L. Defining the mobilome, p.13-27. Em Gogarten, M.B.; J.P. Gogarten, & L. Olendzenski, *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*. New York, NY: Humana Press, 2009.

Snyder, L. & W. Champness. Plasmids, p. 157-186. Em Snyder, L. & W. Champness, *Molecular Genetics of Bacteria*. 2ª edição. Washington, DC.: ASM Press, 2003a.

Snyder, L. & W. Champness. Transposition and site-specific recombination, p. 330-340. Em Snyder, L. e W. Champness, *Molecular Genetics of Bacteria*. 2ª edição. Washington, DC.: ASM Press, 2003b.

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

Strateva, T., V. Ouzounova-Raykova, B. Markova, A. Todorova, Y. Marteva-Proevska & I. Mitov. 2007. Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. *J. Chemother.* **19**: 140-145.

Strateva, T. & D. Yordanov. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* **58**: 1133-1148.

Szabo, D., J. Szentandrassy, Z. Juhasz, K. Katona, K. Nagy & L. Rokusz. 2008. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **30**: 7-12.

Tamilselvi A & G. Mugesh. 2008. Zinc and antibiotic resistance: metallo-beta-lactamases and their synthetic analogues. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**:1039-1053.

Tato, M., A. Valverde, T. M. Coque & R. Canton. 2006. PER-1 multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**: 472-473.

Tetu, S. G. & A. J. Holmes. 2008. A family of insertion sequences that impacts integrons by specific targeting of gene cassette recombination sites, the IS1111-attC Group. *J. Bacteriol.* **190**: 4959-4970.

Toleman, M. A., P. M. Bennett & T. R. Walsh. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 296-316.

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

Vahaboglu, H., R. Ozturk, G. Aygun, F. Coskuncan, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin & M. Otkun. 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2265-2269.

Viedma, E., C. Juan, J. Acosta, L. Zamorano, J. R. Otero, F. Sanz, F. Chaves & A. Oliver. 2009. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4930-4933.

Vignoli, R., G. Varela, M. I. Mota, N. F. Cordeiro, P. Power, E. Ingold, P. Gadea, A. Sirok, F. Schelotto, J. A. Ayala & G. Gutkind. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2940-2943.

Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, J. N. Kattan, J. A. Lopez & J. P. Quinn. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1553-1555.

Vourli, S., P. Giakkoupi, V. Miriagou, E. Tzelepi, A. C. Vatopoulos & L. S. Tzouvelekis. 2004. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**: 209-213.

Wachino, J., Y. Doi, K. Yamane, N. Shibata, T. Yagi, T. Kubota & Y. Arakawa. 2004. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2905-2910.

Xavier, D.E. Avaliação da expressão de sistemas de efluxo para resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado) – Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.

Xavier, D. E., A. C. Gales, R. E. Mendes, A.C.C. Pignatari, L. Santos Filho, L. F. Cirilo & M. Castanheira. 2006. IMP-18-Producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): increasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. **46th ICAAC - Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, San Francisco, CA. Abstract C2-419.

Walsh, T. R. 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**: 367-371.

Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel & P. Nordmann. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:306-325.

Wang, C., P. Cai, D. Chang & Z. Mi. 2006. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 1261-1262.

Weldhagen, G. F. 2006. GES: an emerging family of extended spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Newsletters* **28**: 145-149.

Weldhagen, G. F., L. Poirel & P. Nordmann. 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2385-2392.

Weldhagen, G. F. & A. Prinsloo. 2004. Molecular detection of GES-2 extended spectrum Beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**: 35-38.

Wolter, D. J., N. Khalaf, I. E. Robledo, G. J. Vazquez, M. I. Sante, E. E. Aquino, R. V. Goering & N. D. Hanson. 2009. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 1660-1664.

Woodford, N., J. Zhang, M. E. Kaufmann, S. Yarde, M. M. Tomas, C. Faris, M. S. Vardhan, S. Dawson, S. L. Cotterill & D. M. Livermore. 2008. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 1265-1268.

Yamano, Y., T. Nishikawa, T. Fujimura, T. Yutsudou, M. Tsuji & H. Miwa. 2006. Occurrence of PER-1 producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and their susceptibility to doripenem. *J. Antibiot. (Tokyo)* **59**: 791-796.

Yan, J. J., W. C. Ko, e J. J. Wu. 2001. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2368-2371.

Yong, D., J. M. Bell, B. Ritchie, R. Pratt, M. A. Toleman & T. R. Walsh. 2007. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1, emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **47th ICAAC - Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Chicago, IL. Abstract C1-593.

Zavascki, A. P., P. B. Gaspareto, A. F. Martins, A. L. Goncalves & A. L. Barth. 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1

metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 1148-1151.

ANEXO I

Tabela Anexo 1. Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* isolados de hemocultura de pacientes hospitalizados no complexo Hospital São Paulo durante o ano de 2005.

Isolado	Genótipo	β -lactamase produzida	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
			AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	FEP	ATM	IMP	MEM	CIP	CS	TM	AN	GM	NET	
1	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	128	128	128	>512	16	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
2	A1	SPM-1	>128	>128	>512	512	16	1	>512	1	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
3	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	128	256	>512	16	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
4	A1	SPM-1	>128	>128	>512	512	32	64	>512	2	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
5	A1	SPM-1	>128	>128	>512	512	16	16	>512	32	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
6	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	32	64	>512	0.5	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
7	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	64	128	>512	16	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
8	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	16	16	>512	32	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
9	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	64	64	>512	0.5	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
10	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	64	64	>512	16	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
11	A1	SPM-1	>128	>128	>512	512	32	32	>512	1	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
12	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	16	16	>512	1	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
13	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	128	128	>512	32	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
14	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	32	32	>512	0.5	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
15	A1	SPM-1	>128	>128	512	16	16	16	>512	32	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
16	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	16	16	>512	16	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
17	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	32	32	>512	1	>512	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256

Anexo I, continuação.

Isolado	Genótipo	β -lactamase produzida	MIC ($\mu\text{g/ml}$)															
			AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	FEP	ATM	IMP	MEM	CIP	CS	TM	AN	GM	NET
18	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	16	16	>512	1	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
19	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	8	16	>512	0.5	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
20	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	32	32	>512	32	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
21	A1	SPM-1	>128	>128	>512	16	16	16	>512	0.5	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
22	A1	SPM-1	>128	>128	>512	256	16	16	>512	1	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
23	A1	SPM-1	>128	>128	>512	>512	>256	>512	>512	64	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
24	A2	SPM-1	>128	>128	64	512	16	16	>512	32	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>257	>256	>256
25	A2	SPM-1	>128	>128	>512	256	16	32	>512	32	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>258	>256	>256
26	A2	SPM-1	>128	>128	>512	256	32	32	>512	1	>32	>32	>32	\leq 1	>256	4	>256	>256
27	A2	SPM-1	>128	>128	>512	256	16	16	>512	1	>32	>32	>32	\leq 1	>256	4	>256	>256
28	B	GES-1	>128	>128	>512	>512	64	16	128	16	4	16	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
29	B	GES-1	>128	>128	>512	>512	32	32	256	0.5	2	4	1	\leq 1	2	2	4	2
30	B	GES-1	>128	>128	>512	>512	128	16	128	16	16	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
31	B	GES-1	>128	>128	>512	>512	32	16	128	32	2	8	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
32	B	GES-1	>128	>128	>512	>512	32	32	128	16	32	8	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
33	B	GES-1	>128	>128	>512	>512	128	32	512	16	4	16	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
34	C1	GES-5	>128	>128	>512	>512	128	128	32	64	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
35	C1	GES-5	>128	>128	>512	>512	64	128	16	0.25	>32	>32	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
36	C2	GES-1	>128	>128	>512	512	16	16	>512	16	2	4	>32	\leq 1	>256	>256	>256	>256
37	D1	AmpC	>128	>128	512	>512	>256	>512	16	16	16	16	\leq 0,125	\leq 1	1	2	1	4
38	D2	AmpC	>128	>128	512	>512	64	128	16	16	16	>32	0,25	\leq 1	1	2	1	4

Anexo I, continuação.

Isolado	Genótipo	β-lactamase produzida	MIC (µg/ml)															
			AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	FEP	ATM	IMP	MEM	CIP	CS	TM	AN	GM	NET
39	D2	AmpC	>128	>128	>512	>512	64	32	256	16	2	16	0,25	≤1	1	2	1	4
40	E1	CTX-M-2	>128	>128	>512	>512	32	64	>512	8	>32	>32	>32	≤1	>256	>256	>256	>256
41	E1	CTX-M-2	>128	>128	>512	16	64	16	>512	8	1	>32	>32	≤1	>256	>256	>256	>256
42	F	AmpC	>128	>128	>512	>512	64	64	32	16	16	>32	>32	≤1	1	4	1	2
43	G	IMP-1	>128	>128	>512	>512	8	8	>512	0,25	>32	>32	4	≤1	>256	>256	>256	>256

AMX, amoxicilina; AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; TIC, ticarcilina; TCC, ticarcilina com ácido clavulânico; PIP, piperacilina; TZP, piperacilina com tazobactam; FEP, cefepima; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacina; CS, colistina; TM, tobramicina; AN, ampicilina; GM, gentamicina e NET, netilmicina.

ANEXO II

Tabela Anexo 2. Resumo dos dados microbiológicos e clínicos dos eventos de infecção cujo desfecho clínico foi o óbito do paciente.

Dados clínicos dos pacientes infectados pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i> estudados										
Isolado	Data do isolamento	β -lactamase	Unidade de internação	Idade (anos)	Doença de base	Fonte primária da infecção	Data do pedido da hemocultura	Data do óbito	Óbito relacionado a choque séptico?	Terapia adequada por 7 ou mais dias?
8	12/4/2005	SPM-1	UTI	48	Pancreatite crônica	Corrente sanguínea	7/4/2005	20/04/2005	Sim	Sim
10	22/05/2005	SPM-1	UTI	60	Pancreatite crônica	Corrente sanguínea	19/05/2005	9/6/2005	Sim	Sim
22	17/12/2005	SPM-1	UTI	70	-	Pneumonia	13/12/2005	8/1/2005	Sim	Sim
24	27/01/2005	SPM-1	UTI	29	Linfoma	Intra-abdominal	17/01/2005	19/01/2005	Sim	Sim
26	22/11/2005	SPM-1	UTI	64	DPOC	Intra-Abdominal	18/11/2005	19/11/2005	Sim	Sim
29	19/01/2005	GES-1	PS	62	Insuficiência renal crônica	Pneumonia	13/01/2005	16/01/2005	Sim	Sim
38	15/02/2005	AmpC	UTI	9 meses	endocrinopatia auto-imune	Pneumonia	12/2/2005	12/2/2005	Sim	Sim
39	12/4/2005	AmpC	UTI	79	-	Pneumonia	8/4/2005	12/4/2005	Sim	Sim
42	12/8/2005	AmpC	UTI	39	Asma severa	Corrente sanguínea	8/8/2005	26/08/2009	Sim	Sim

AnexoII, continuação.

Dados clínicos dos pacientes infectados pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i> estudados										
Isolado	Data do isolamento	β-lactamase	Unidade de internação	Idade (anos)	Doença de base	Fonte primária da infecção	Data do pedido da hemocultura	Data do óbito	Óbito relacionado a choque séptico?	Terapia adequada por 7 ou mais dias?
1	7/1/2005	SPM-1	UTI	21	Leucemia linfóide aguda	Corrente sanguínea	3/1/2005	8/1/2005	Sim	Não
2	19/01/2005	SPM-1	PS	61	-	Corrente sanguínea	13/01/2005	17/01/2005	Sim	Não
3	19/01/2005	SPM-1	UTI	17	Leucemia mielóide aguda	Corrente sanguínea	12/1/2005	13/01/2005	Sim	Não
5	27/01/2005	SPM-1	PS	91	-	Trato urinário	24/01/2005	28/1/2005	Sim	Não
13	28/06/2005	SPM-1	UTI	31	Leucemia mielóide aguda	Corrente sanguínea	23/06/2005	24/6/2005	Sim	Não
16	6/9/2005	SPM-1	UTI	74	-	Intra-Abdominal	31/8/2005	2/9/2005	Sim	Não
17	20/09/2005	SPM-1	UTI	70	Mieloma Múltiplo	Pneumonia e trato urinário	7/9/2005	9/9/2005	Sim	Não
18	27/10/2005	SPM-1	UTI	70	Linfoma	Pneumonia	24/10/2005	31/10/2005	Sim	Não
20	15/12/2005	SPM-1	UTI	76	-	Pneumonia	10/12/2005	16/12/2005	Sim	Não
25	15/07/2005	SPM-1	UTI	78	Hepatite C	Pneumonia	11/7/2005	13/7/2005	Sim	Não
28	13/01/2005	GES-1	PS	79	Síndrome de Wallenberg	Pneumonia	9/1/2005	13/01/2005	Sim	Não
32	17/08/2005	GES-1	PS	27	Teratoma mediastinal	Corrente sanguínea	14/8/2005	15/08/2005	Sim	Não
34	1/2/2005	GES-5	Cirurgia	60	Pielonefrite obstrutiva crônica	Intra-abdominal	28/1/2005	29/01/2005	Sim	Não
37	19/01/2005	AmpC	UTI	66	-	Corrente sanguínea	13/1/2005	16/01/2005	Não	Não
43	31/05/2005	IMP-1	UTI	63	Carcinoma pancreático	Pneumonia	25/5/2005	30/05/2005	Sim	Não

ANEXO III

Tabela Anexo 3. Resumo dos dados microbiológicos e clínicos dos eventos de infecção cujos pacientes receberam alta hospitalar.

Dados microbiológicos				Dados clínicos			
Isolado	Data do isolamento	β -lactamase	Unidade de internação	Idade (anos)	Doença de base	Fonte primária de infecção	Terapia adequada por 7 ou mais dias?
7	1/3/2005	SPM-1	Transplante de Medula	53	Mieloma múltiplo	Corrente Sanguínea	Sim
12	31/05/2005	SPM-1	Hemodiálise	1	Insuficiência renal crônica	Corrente Sanguínea	Sim
14	7/7/2005	SPM-1	UTI	37	HIV, HCV	Corrente Sanguínea	Sim
19	10/11/2005	SPM-1	UTI	38	Paraganglioma aórtico	Pneumonia	Sim
21	15/12/2005	SPM-1	UTI	70	Insuficiência renal crônica	Pneumonia	Sim
30	28/01/2005	GES-1	PS	79	Leucemia mielóide crônica	Pneumonia	Sim
31	2/8/2005	GES-1	PS	49	Cancer esofago	Pneumonia	Sim
33	20/09/2005	GES-1	UTI	54	Cancer bexiga	Pneumonia	Sim
35	5/7/2005	GES-5	UTI	44	-	Pneumonia	Sim
41	30/03/2005	CTX-M-2	UTI	36	HIV	Trato urinário	Sim
4	27/01/2005	SPM-1	PS	62	Epilepsia	Pneumonia	Não
27	29/11/2005	SPM-1	PS	74	-	Corrente Sanguínea	Não
36	22/05/2005	GES-1	PS	47	Cancer bexiga	Trato urinário	Não
40	22/03/2005	CTX-M-2	UTI	46	HIV, HBV, HCV, Tuberculose pulmonar	Corrente Sanguínea	Não

ANEXO IV

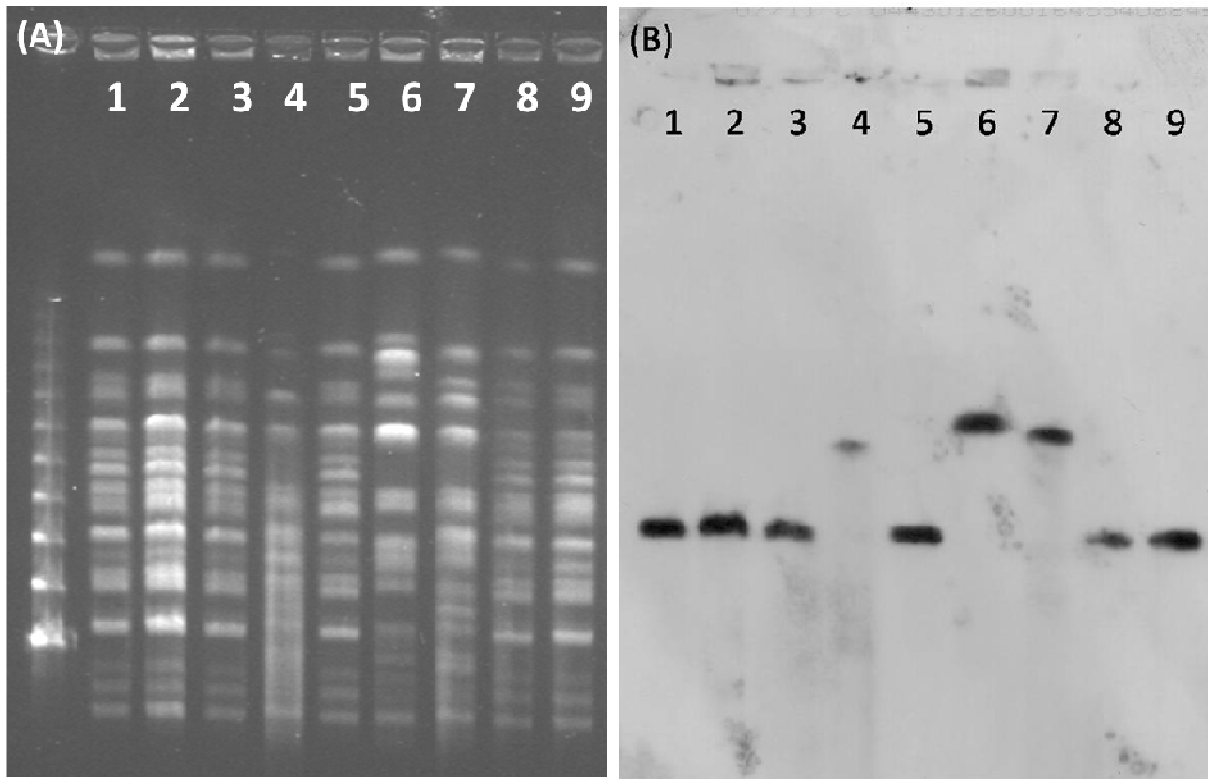


Figura Anexo 4. (A) Tipagem molecular por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de GES-1 e produtores de GES-5. (B) Hibridização do DNA presente no gel de PFGE com sonda marcada específica para *bla*_{GES}.

Linha 1, isolado 28 (Genótipo B, produtor de GES-1); Linha 2, isolado 29 (Genótipo B, produtor de GES-1); Linha 3, isolado 30 (genótipo B, produtor de GES-1); Linha 4, isolado 34 (genótipo C1, produtor de GES-5); linha 5, isolado 31 (genótipo B, produtor de GES-1); Linha 6, isolado 36, genótipo C1, produtor de GES-5); Linha 7, isolado 35 (Genótipo C2, produtor de GES-1); linha 8, isolado 32 (genótipo B, produtor de GES-1); linha 9, isolado 33 (genótipo B, produtor de GES-1).

ANEXO V

Figura Anexo 5. Alinhamento e árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos dos genes *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} primeiramente descritos (código de acesso no GenBank AF156486 e AY494717, respectivamente) e *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} identificados neste estudo.

```

GES-5_AY494717_      ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCATCGGAA 60
GES-5_este.estudo_  ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCATCGGAA 60
GES-1_AF156486_     ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCATCGGAA 60
GES-1_este.estudo_  ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGCATATGCATCGGAA 60
*****

GES-5_AY494717_      AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT 120
GES-5_este.estudo_  AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT 120
GES-1_AF156486_     AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT 120
GES-1_este.estudo_  AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAGCAGCTCAGATCGGT 120
*****

GES-5_AY494717_      GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT 180
GES-5_este.estudo_  GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT 180
GES-1_AF156486_     GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT 180
GES-1_este.estudo_  GTTGCATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGCCACCGAATGGCGCAGCGTTTT 180
*****

GES-5_AY494717_      GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA 240
GES-5_este.estudo_  GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA 240
GES-1_AF156486_     GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA 240
GES-1_este.estudo_  GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGAAAGAATTGACTCA 240
*****

GES-5_AY494717_      GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGACATGATCGTCAATGGTCT 300
GES-5_este.estudo_  GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGACATGATCGTCAATGGTCT 300
GES-1_AF156486_     GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGACATGATCGTCAATGGTCT 300
GES-1_este.estudo_  GGCACCGAGCGGGGGATCGAAAACCTTTCATATGGGCCGACATGATCGTCAATGGTCT 300
*****

GES-5_AY494717_      CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT 360
GES-5_este.estudo_  CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT 360
GES-1_AF156486_     CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT 360
GES-1_este.estudo_  CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGAGGCAGCGCAAGCT 360
*****

GES-5_AY494717_      GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT 420
GES-5_este.estudo_  GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT 420
GES-1_AF156486_     GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT 420
GES-1_este.estudo_  GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCT 420
*****

GES-5_AY494717_      GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAATAATGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA 480
GES-5_este.estudo_  GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAATAATGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA 480
GES-1_AF156486_     GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAATAATGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA 480
GES-1_este.estudo_  GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAATAATGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAA 480
*****

```

GES-5_AY494717_	GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACAACACGCTATTGCT	540
GES-5_este.estudo_	GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACAACACGCTATTGCT	540
GES-1_AF156486_	GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACAACACGCTATTGCT	540
GES-1_este.estudo_	GAGCCGGAGATGGGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATAACAACACGCTATTGCT	540

GES-5_AY494717_	ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC	600
GES-5_este.estudo_	ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC	600
GES-1_AF156486_	ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC	600
GES-1_este.estudo_	ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCAC	600

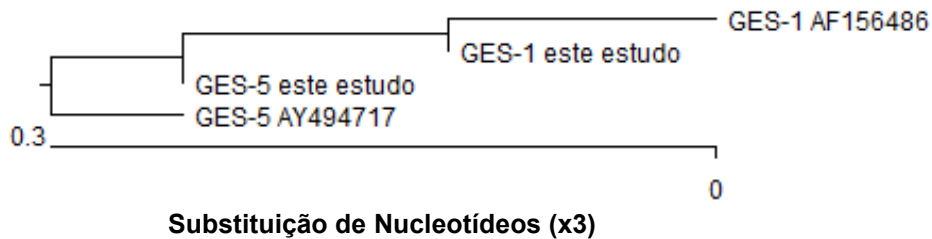
GES-5_AY494717_	ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT	660
GES-5_este.estudo_	ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT	660
GES-1_AF156486_	ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT	660
GES-1_este.estudo_	ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAACGGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTT	660

GES-5_AY494717_	CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC	720
GES-5_este.estudo_	CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC	720
GES-1_AF156486_	CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC	720
GES-1_este.estudo_	CCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACGGGGGCCGGAACGAC	720

GES-5_AY494717_	ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG	780
GES-5_este.estudo_	ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG	780
GES-1_AF156486_	ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG	780
GES-1_este.estudo_	ATTGGTTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTATACAACGGCCCCG	780

GES-5_AY494717_	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCCGGTCAAGTTATTACACAA	840
GES-5_este.estudo_	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCCGGTCAAGTTATTACACAA	840
GES-1_AF156486_	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCCGGTCAAGTTATTACACAA	840
GES-1_este.estudo_	AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCCGGTCAAGTTATTACACAA	840

GES-5_AY494717_	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG	864
GES-5_este.estudo_	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG	864
GES-1_AF156486_	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG	864
GES-1_este.estudo_	CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG	864



ANEXO VI

Designação dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* estudados

Numeração adotada nesta tese	Número da amostra no banco de microrganismos do LEMC	Numeração adotada nesta tese	Número da amostra no banco de microrganismos do LEMC
1	5534	22	6664
2	5573	23	6669
3	5574	24	5597
4	5596	25	6247
5	5602	26	6585
6	5660	27	6594
7	5728	28	5554
8	5867	29	5570
9	5962	30	5611
10	6032	31	6281
11	6056	32	6332
12	6059	33	6403
13	6156	34	5630
14	6213	35	6200
15	6343	36	6033
16	6380	37	5569
17	6409	38	5673
18	6512	39	5869
19	6543	40	5785
20	6645	41	5821
21	6646	42	6318
		43	6049

Further Identification of CTX-M-2 Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*[∇]

β -Lactamase production is the main mechanism for β -lactam resistance in gram-negative rods. The more threatening β -lactamases that have successfully emerged and are believed to spread only in *Enterobacteriaceae* are CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) (5). The acquired β -lactamases with wide activity spectra that are important in *Pseudomonas aeruginosa* include class B metallo- β -lactamases (mostly IMP and VIM types and especially SPM-1 in Brazil) and class A ESBLs, particularly VEB-, PER-, and GES-type enzymes (3, 8, 9). However, a single CTX-M-1-producing *P. aeruginosa* isolate has been reported from The Netherlands (1), as well as CTX-M-2- and CTX-M-43-positive *P. aeruginosa* isolates in Bolivia (2). This study reports the identification of a CTX-M-2-producing *P. aeruginosa* strain isolated from a Brazilian teaching hospital.

During June 2005, a 63-year-old male patient with a recent hospitalization history was admitted to the intensive care unit for suspicion of pneumonia. He received ceftriaxone and clindamycin as first-line therapy. Four days later, he presented with septic shock and died. A blood culture grew *P. aeruginosa* (isolate P6208).

Isolate P6208 was resistant to all β -lactams tested, except imipenem and ceftazidime. A double-disk synergy test was performed with ticarcillin-clavulanic acid- and cefotaxime-cefepime-containing disks. The production of an ESBL was

evidenced only under unusual conditions (with a distance between the disks of 1.5 cm center to center) (Fig. 1). Isolate P6208 was also resistant to fluoroquinolones, amikacin, gentamicin, and tobramycin and was susceptible to colistin. The MICs of imipenem, ceftazidime, cefepime, and cefotaxime determined by using Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) were 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, >256 μ g/ml, and >32 μ g/ml, respectively.

HindIII-restricted total DNA from isolate P6208 as described previously (6) was used for cloning in pBK-CMV and was then transformed into *Escherichia coli* TOP10 and selected on agar plates containing ticarcillin (50 μ g/ml) and kanamycin (30 μ g/ml). The *E. coli* TOP10(p6208) recombinant strain displaying an ESBL phenotype was obtained. The sequencing of the 2,340-bp cloned DNA insert of recombinant plasmid p6208 identified a *bla*_{CTX-M-2} gene. It was preceded by an ISCR1 element located 498-bp upstream and followed by the *qacE Δ I* gene cassette. This ISCR1-*bla*_{CTX-M-2} structure has already been identified in several enterobacterial species (7).

Plasmid extraction performed by the Kieser method (4) did not evidence any plasmid. In addition, repetitive attempts to transfer the *bla*_{CTX-M-2} gene by electroporation failed, using both *E. coli* TOP10 and *P. aeruginosa* PAO1 as recipient strains. Thus, the *bla*_{CTX-M-2} gene might be likely chromosomally located in isolate P6208.

This study identified a CTX-M-2-producing *P. aeruginosa* in Brazil. This finding is important since clinical laboratories may misidentify CTX-type enzymes in those nonfermenters, jeopardizing the choice of antimicrobial chemotherapy and the implementation of infection control measures. This report underlines that *P. aeruginosa* may become a hidden location for *bla*_{CTX-M} genes.

This work was partially funded by grants from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539) and Université Paris XI, France, and mostly by a grant from the European Community (LSHM-CT-2005-018705) and the INSERM. We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) that conceded a PDEE grant to R.C.P. (protocol 3682/07-2), and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing a researcher grant to A.C.G. (process number 307714/2006-3).

REFERENCES

- Al Naiemi, N., B. Duim, and A. Bart. 2006. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Med. Microbiol.* 55:1607–1608.
- Celenza, G., C. Pellegrini, M. Caccamo, B. Segatore, G. Amicosante, and M. Perilli. 2006. Spread of *bla*_{CTX-M}-type and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:975–978.
- Gates, A. C., L. C. Menezes, S. Silbert, and H. S. Sader. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:699–702.
- Kieser, T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12:19–36.
- Pitout, J. D., and K. B. Laupland. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8:159–166.
- Poirrel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann. 2000. Bio-

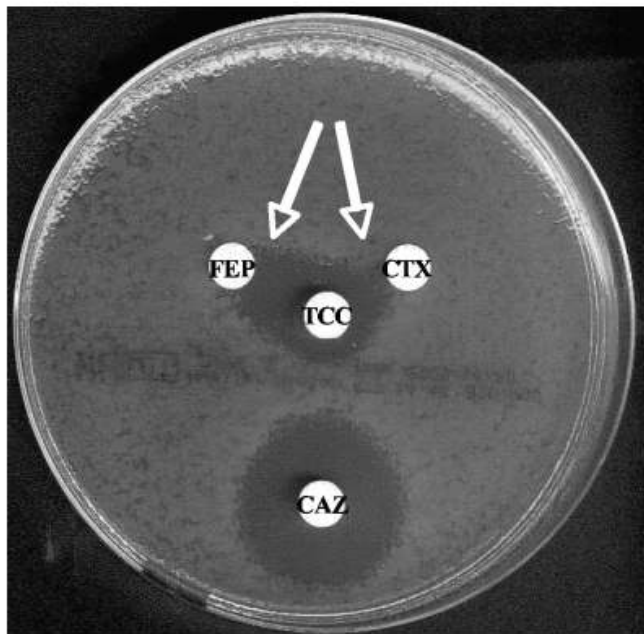


FIG. 1. Double-disk synergy test with *bla*_{CTX-M-2}-positive *P. aeruginosa* clinical isolate P6208. Arrows indicate double-disk synergy. Abbreviations: CAZ, ceftazidime; TCC, ticarcillin-clavulanic acid; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime.

- chemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:622–632.
7. Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann. 2008. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:75–81.
8. Walsh, T. R. 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:367–371.
9. Weldhagen, G. F., L. Poirel, and P. Nordmann. 2003. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2385–2392.

Renata Cristina Picão
Laurent Poirel
INSERM U914 Emerging Resistance to Antibiotics
Hôpital de Bicêtre
Assistance Publique/Hôpitaux de Paris
K.-Bicêtre, France

Ana C. Gales
Laboratório ALERTA
Universidade Federal de São Paulo
São Paulo, Brazil

Patrice Nordmann*
Service de Bactériologie-Virologie
INSERM U914 Emerging Resistance to Antibiotics
Hôpital de Bicêtre
Assistance Publique/Hôpitaux de Paris
Faculté de Médecine et Université Paris Sud
K.-Bicêtre, France

*Phone: 33-1-45-21-36-32
Fax: 33-1-45-21-63-40
E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr.

[†]Published ahead of print on 17 February 2009.

Diversity of β -Lactamases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Causing Bloodstream Infections in Brazil[∇]

Renata C. Picão,^{1,2} Laurent Poirel,¹ Ana C. Gales,² and Patrice Nordmann^{1*}

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 Emerging Resistance to Antibiotics, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Paris Sud, K.-Bicêtre, France,¹ and Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil²

Received 6 April 2009/Returned for modification 2 May 2009/Accepted 5 July 2009

A retrospective survey was conducted to characterize β -lactamases in a collection of 43 ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with bloodstream infections hospitalized at a Brazilian teaching hospital between January and December 2005. Resistance rates for carbapenems, aminoglycosides, and quinolones were over 80%, with only colistin remaining active against all isolates. Pulsed-field gel electrophoresis analysis identified seven different genotypes. AmpC overproduction was found to be the sole β -lactamase-mediated mechanism responsible for ceftazidime resistance in four isolates (9.3%). Nine isolates (20.9%) produced an extended-spectrum β -lactamase (ESBL), either GES-1 ($n = 7$, 16.3%) or CTX-M-2 ($n = 2$, 4.6%). Carbapenemase activity was detected in 30 (70%) additional isolates. Among those isolates, two isolates (4.6%) produced the ESBL GES-5, possessing the ability to hydrolyze imipenem; a single isolate (2.3%) produced the metallo- β -lactamase (MBL) IMP-1; and 27 isolates produced the MBL SPM-1 (62.8%). None of the isolates coproduced both ESBL and MBL. Insertion sequence elements ISCR4 and ISCR1 were associated with *bla*_{SPM-1} and *bla*_{CTX-M-2} genes, respectively, whereas the *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes were part of class 1 integron structures. This study underlines the spread of MBL- and ESBL-producing *P. aeruginosa* isolates as an important source of ceftazidime resistance in Brazil.

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of hospital-acquired infections. Acquisition of β -lactamases, such as class A extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and class B metallo- β -lactamases (MBLs), by *P. aeruginosa* nosocomial isolates is detrimental to antimicrobial therapy in hospitalized patients (19).

The ESBLs reported for *P. aeruginosa* are SHV, TEM, PER, VEB, BEL, GES, and, more recently, CTX-M types (1, 7, 8, 16, 20, 23, 29). The GES-type enzymes are unusual since point amino acid changes in their active sites may extend their hydrolytic activity to carbapenems (31, 39, 40). ESBL production in *P. aeruginosa* has been documented in Brazil (2, 5, 21), but its prevalence remains unknown.

Five types of acquired MBLs have been identified in *P. aeruginosa*: IMP, VIM, SPM, GIM, and AIM (41, 42). In Brazil, IMP-, VIM-, and SPM-producing *P. aeruginosa* clinical isolates have been identified (35). In addition, SPM producers have been reported as endemic in Brazilian territory due to dissemination of a single clone (10).

The aim of this study was to investigate the diversity and frequency of both ESBL and MBL production and to characterize the genetic support of those acquired β -lactamase genes in a collection of ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates from Brazil, taken as a model of a developing country.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. A total of 154 consecutive *P. aeruginosa* isolates were recovered from patients with bloodstream infections hospitalized at Hospital São Paulo between January and December 2005. A single isolate per patient was retained for this study. Among those isolates, 43 (28%) were ceftazidime resistant by the CLSI disk diffusion method (inhibition zone of ≤ 14 mm and MIC of ≥ 32 μ g/ml) and thus were further characterized. *Escherichia coli* TOP10 was used as a recipient strain in cloning experiments (23). Transformation experiments were performed using both *E. coli* TOP10 and *P. aeruginosa* PAO1 as the recipients.

Clinical data. Clinical data including age, comorbidities, unit of the hospital, site of infection, therapeutic regimen, and final disposition (death or discharge) have been collected for each patient.

Susceptibility testing and screening for AmpC overproducers and/or ESBL production. Antibiotic susceptibility profiles of the 43 *P. aeruginosa* isolates were determined by the agar dilution method according to the CLSI guidelines (3). AmpC overproducers were identified by testing susceptibility to ceftazidime on Mueller-Hinton plates supplemented with 250 μ g/ml cloxacillin (18, 33). Detection of ESBL production was carried out by a double disk synergy method testing ceftazidime, aztreonam, and cefepime at a distance of 15 mm from ticarcillin-clavulanic acid disks, on Mueller-Hinton plates supplemented or not with cloxacillin-containing plates (28).

Screening for carbapenemase activity. Hydrolysis of imipenem was assessed by UV spectrophotometry assays, as described previously (10, 11, 25). Briefly, 10 ml of an overnight broth culture was harvested and then disrupted by sonication. Whole-protein extracts were obtained after centrifugation. Hydrolytic activity of 20 μ l of the crude extract was determined against 100 μ M imipenem in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), and measurements were carried out at a wavelength of 297 nm.

PCR amplification for detection of ESBL and MBL genes; analysis of the genetic environment and sequencing. Specific primers were used under standard PCR conditions to detect ESBL- and MBL-encoding genes, namely, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{BEL}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, and *bla*_{AIM} (7, 12, 15, 16, 17, 20, 23, 26, 29, 30, 38, 42). The genetic environment of *bla*_{IMP} was determined by PCR using the previously published specific primers to anneal at the 5' and 3' conserved sequences (CSs) of class 1 integrons, followed by sequencing (24). The genetic environment of

* Corresponding author. Mailing address: Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France. Phone: 33-1-45-21-36-32. Fax: 33-1-45-21-63-40. E-mail: nordmann.patrice@bct.aphp.fr.

[∇] Published ahead of print on 13 July 2009.

*bla*_{CTX-M-2} was determined by PCR and further sequencing using specific primers for the insertion sequence *ISCR1* located upstream and for the *qacEΔ1* and *sul1* tandem gene (17). The genetic context of *bla*_{SPM-1} was determined by using primers hybridizing with *ISCR4*, as described previously (27). For direct DNA sequencing, PCR products were purified using PCR purification columns (Qiagen, Courtaboeuf, France). Sequencing reactions were performed using specific primers and an automated ABI 337 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with software available over the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

PFGE analysis. Genetic relatedness among the ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using restriction enzyme *SpeI* (GE Healthcare, Orsay, France) as described previously (27). Analysis of PFGE patterns was performed by visual inspection of photographs of ethidium bromide-stained gels. The isolates were classified according to the criteria described by Tenover et al. (36). The *P. aeruginosa* isolate 48-1997 (38), corresponding to the SPM-producing national clone, was included in PFGE experiments for direct comparison of genotypes.

Genetic support of β-lactamase-encoding genes. Plasmid extraction was performed by the Kieser technique (13). *E. coli* NCTC50192, harboring four plasmids of 154, 66, 38, and 7 kb, was used as a size marker for plasmids. Transformation assays were performed by electroporation with plasmid extracts from the identified positive isolates, and both *E. coli* TOP10 and *P. aeruginosa* PAO1 were used as recipient strains. Selection was performed on agar plates supplemented with 50 μg/ml amoxicillin (amoxicilline) and 50 μg/ml ticarcillin for *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively. DNA-DNA hybridization of plasmid extracts was performed with a Southern transfer onto a Hybond N⁺ nylon membrane (GE Healthcare) as previously described. Labeling of the probe and signal detection were carried out using an enhanced chemiluminescence nonradioactive labeling and detection kit according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). The genetic localization of the β-lactamase-encoding genes was also attempted by using the endonuclease I-CeuI technique, as described previously (14).

Cloning experiments. Total DNA from *P. aeruginosa* 35 was HindIII restricted, ligated into the corresponding site of plasmid pBK-CMV, and then transformed in the *E. coli* TOP10 reference strain by electroporation as described previously (25). Recombinant plasmids were selected on Trypticase soy agar plates containing 1 μg/ml imipenem and 30 μg/ml kanamycin. The cloned DNA fragment of recombinant plasmid p35 was sequenced on both strands.

RESULTS

Clinical data, susceptibility testing, and screening for AmpC overproducers and ESBL producers. Forty-three out of the 154 *P. aeruginosa* isolates (28%) displayed ceftazidime resistance. Table 1 summarizes the clinical data, antimicrobial susceptibility profiles, and molecular typing of those 43 isolates. They were collected mainly from patients hospitalized in intensive care units (25 isolates), the emergency room (10 isolates), and the pediatric oncology unit (four isolates) (Table 1). In summary, the retrospective analysis of medical records showed that 24 patients (55.8%) had received adequate antimicrobial therapy, while empirical treatment was not optimal for 14 patients (32.5%). Additionally, the medical records of five patients (11.6%) were not available. Among the 24 patients who had received adequate empirical treatment or for whom antimicrobial therapy was correctly modified according to the results of susceptibility testing, 10 were discharged after 7 or more days of antimicrobial therapy, nine died after 7 or more days of treatment, and five died before 7 days of treatment. Among the 14 patients who had received inadequate empirical therapy, 10 died before results of antimicrobial susceptibility testing, whereas four patients were discharged. Notably, in quite a high number of cases, antibiotics such as carbapenems and the last-resort antibiotic polymyxin B had been used, although unsuccessfully for 20 out of 38 patients. Corresponding clinical data are presented in Table 1.

The 43 ceftazidime-resistant isolates were also resistant to

ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, ceftiprome, and cefepime. The highest susceptibility rates were obtained for colistin (100%), followed by aztreonam (44.1%), piperacillin-tazobactam (39.5%), piperacillin (34.8%), imipenem (18.6%), and amikacin (18.6%). Only for piperacillin and piperacillin-tazobactam were susceptibility rates obtained following the breakpoints recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (an isolate is deemed susceptible when the MIC is ≤16 mg/liter). Overproduction of AmpC was identified to be likely the sole enzymatic mechanism responsible for ceftazidime resistance in four isolates (9.3%). Nine isolates were classified as ESBL producers.

Imipenem hydrolysis was observed for 30 isolates, all of them resistant to imipenem. A high imipenem hydrolysis rate was obtained for 28 isolates (average specific activity of 0.2 U · mg of protein⁻¹), and a lower but significant rate was obtained for two isolates (average specific activity of 0.007 U · mg of protein⁻¹).

Identification of acquired β-lactamase genes. The *bla*_{GES-1} (*n* = 7) and *bla*_{CTX-M-2} (*n* = 2) genes were identified in nine isolates exhibiting an ESBL phenotype. In addition, the *bla*_{GES-5} gene, which encodes an unusual ESBL with carbapenemase activity, was identified in two isolates which did not display any ESBL phenotype but corresponded to the two isolates for which weak carbapenem hydrolysis was detected. The MBL-encoding genes *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} were identified in 27 isolates (62.8%) and one isolate (2.3%), respectively, corresponding to those isolates for which a high imipenem hydrolysis rate had been noted.

Clonal relationship. PFGE analysis performed with the 43 *P. aeruginosa* clinical isolates showed seven main genotypes. The 27 SPM-1-producing isolates belonged to a single genotype, A (corresponding to the genotype of the Brazilian epidemic clone), which can be divided into two subtypes, A1 and A2. GES-1-producing isolates belonged to either genotype B (six isolates) or genotype C1 (one isolate). The two GES-5-producing isolates belonged to genotype C2, which was closely related to genotype C1 (two-band difference). The four AmpC overproducers belonged to genotypes G (one isolate) and D (three isolates), the latter being subclassified into two subtypes, D1 (one isolate) and D2 (two isolates). Genotypes E and F corresponded to the two CTX-M-2-producing isolates and the single IMP-1-producing isolate, respectively (Table 1).

Genetics of β-lactamase-encoding genes. PCR mapping and sequencing revealed that the *bla*_{CTX-M-2} gene was preceded by *ISCR1* and followed by the *qacEΔ1* and *sul1* tandem genes (Fig. 1), as previously reported for *Enterobacteriaceae* (34). *ISCR* elements are insertion sequences transposing in a particular way since they can mobilize adjacent sequences by rolling-circle transposition (37). Analysis of the SPM-1-producing strains showed that the *bla*_{SPM-1} gene was preceded by *ISCR4* and followed by *groEL* and *ISCR4* (Fig. 1) with a perfect identity compared to the sequences previously reported from *bla*_{SPM-1}-producing *P. aeruginosa* isolates (27). Sequencing of the 5' CS-3' CS amplicon obtained from isolate 42 showed that the *bla*_{IMP-1} gene was located at the first position of a class 1 integron possessing the strong promoter configuration with *P*_{ant} and *P*₂. Class 1 integrons are DNA structures that may integrate or excise antibiotic resistance genes as a form of gene cassettes (4). The *bla*_{IMP-1} gene was associated with the *aadA1*

TABLE 1. Clinical features of the patients from whom ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates were collected*

Isolate	Clone	Date of isolation (day/mo/yr)	Hospital unit	Antimicrobial susceptibility	β -Lactamase identified	Age (yr)	Underlying disease	Primary infection	Empirical treatment	Clinical outcome
1	A1	1/7/2005	ICU	CS	SPM-1	21	Acute lymphoblastic leukemia	Bloodstream	FEP, IMP, PMB	Death
2	A1	1/19/2005	ER	CS, PIP-TZP, ATM	SPM-1	61	None	Bloodstream	RIF, IMP, GM	Death
3	A1	1/19/2005	ICU	CS	SPM-1	17	Acute myeloid leukemia	Bloodstream	FEP	Death
4	A1	1/27/2005	ER	CS, ATM	SPM-1	62	Epilepsy	Pneumonia	FEP, IMP	Discharge
5	A1	1/27/2005	ER	CS, PIP-TZP	SPM-1	91	None	Urinary tract	FEP, IMP, TZP	Death
6	A1	2/10/2005	Pediatric oncology	CS, ATM	SPM-1	3	None	NA	NA	NA
7	A1	3/1/2005	Bone marrow transplant	CS	SPM-1	53	Multiple myeloma	Bloodstream	IMP, PMB	Discharge
8	A1	4/12/2005	ICU	CS, PIP-TZP	SPM-1	48	Chronic pancreatitis	Bloodstream	IMP, PMB	Death
9	A1	5/3/2005	Pediatric oncology	CS, ATM	SPM-1	14	NA	NA	NA	NA
10	A1	5/22/2005	ICU	CS	SPM-1	60	Chronic pancreatitis	Bloodstream	CIP, IMP, PMB	Death
11	A1	5/31/2005	Hemodialysis	CS, ATM	SPM-1	1	NA	NA	NA	NA
12	A1	5/31/2005	Hemodialysis	CS, PIP-TZP, ATM	SPM-1	1	Chronic renal failure	Bloodstream	CIP, MEM, PMB	Discharge
13	A1	6/28/2005	ICU	CS	SPM-1	31	Acute myeloid leukemia	Bloodstream	FEP, IMP	Death
14	A1	7/7/2005	ICU	CS, ATM	SPM-1	37	HIV, HCV	Bloodstream	PMB	Discharge
15	A1	8/23/2005	Pediatric oncology	CS, PIP-TZP	SPM-1	10	NA	NA	NA	NA
16	A1	9/6/2005	ICU	CS, PIP-TZP	SPM-1	74	None	Intra-abdominal	IMP	Death
17	A1	9/20/2005	ICU	CS, ATM	SPM-1	70	Multiple myeloma	Pneumonia and urinary tract	FEP, IMP, PMB	Death
18	A1	10/27/2005	ICU	CS, PIP-TZP, ATM	SPM-1	70	Lymphoma	Pneumonia	PMB	Death
19	A1	11/10/2005	ICU	CS, PIP-TZP, ATM	SPM-1	38	Aortic paraganglioma	Pneumonia	IMP, TZP, PMB	Discharge
20	A1	12/15/2005	ICU	CS	SPM-1	76	None	Pneumonia	FEP, IMP, PMB	Death
21	A1	12/15/2005	ICU	CS, PIP-TZP, ATM	SPM-1	70	Chronic renal failure	Pneumonia	FEP, IMP, PMB	Discharge
22	A1	12/17/2005	ICU	CS, PIP-TZP, ATM	SPM-1	70	None	Pneumonia	PMB	Death
23	A1	12/20/2005	Pediatric oncology	CS	SPM-1	18	NA	NA	NA	NA
24	A2	1/27/2005	ICU	CS, PIP-TZP	SPM-1	29	Lymphoma	Intra-abdominal	IMP, PMB	Death
25	A2	7/15/2005	ICU	CS	SPM-1	78	Hepatitis C	Pneumonia	IMP	Death
26	A2	11/2/2005	ICU	CS, ATM, AMK	SPM-1	64	COPD	Intra-abdominal	FEP, IMP, PMB	Death
27	A2	11/29/2005	ER	CS, PIP-TZP, ATM, AMK	SPM-1	74	None	Bloodstream	CRO, NIT	Discharge
28	B	1/13/2005	ER	CS, PIP-TZP, IMP	GES-1	79	Wallenberg syndrome	Pneumonia	FEP	Death
29	B	1/19/2005	ER	CS, ATM, IMP, MEM, CIP, TM, AMK, GM, NET	GES-1	62	Chronic renal failure	Pneumonia	FEP, IMP, PMB, GM	Death
30	B	1/28/2005	ER	CS, PIP-TZP	GES-1	79	Chronic myeloid leukemia	Pneumonia	FEP, IMP, TZP	Discharge
31	B	8/2/2005	ER	CS, PIP-TZP, IMP	GES-1	49	Esophageal cancer	Pneumonia	PMB	Discharge
32	B	8/17/2005	ER	CS	GES-1	27	Mediastinal teratoma	Bloodstream	CIP, FEP	Death
33	B	9/20/2005	ICU	CS, IMP	GES-1	54	Bladder cancer	Pneumonia	FEP, IMP, PMB, TZP	Discharge

34	C1	2/1/2005	Surgery	CS	GES-5	60	Chronic obstructive pyelonephritis	Intra-abdominal	IMP	Death
35	C1	7/5/2005	ICU	CS, ATM	GES-5	44	None	Pneumonia	IMP, PMB	Discharge
36	C2	5/22/2005	ER	CS, PIP-TZP, IMP, MEM	GES-1	47	Bladder cancer	Urinary tract	FEP	Discharge
37	D1	1/19/2005	ICU	CS, CIP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	66	None	Bloodstream	IMP, TZP	Death
38	D2	2/15/2005	ICU	CS, CIP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	9 mo	Autoimmune endocrine disease	Pneumonia	CIP, MEM	Death
39	D2	4/12/2005	ICU	CS, IMP, CIP, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	79	None	Pneumonia	FEP, IMP, PMB	Death
40	E	3/22/2005	ICU	CS, ATM	CTX-M-2	46	HIV, HBV, HCV, pulmonary tuberculosis	Bloodstream	FEP, CIP	Discharge
41	E	3/30/2005	ICU	CS, ATM, IMP	CTX-M-2	36	HIV	Urinary tract	PMB	Discharge
42	F	5/31/2005	ICU	CS, PIP-TZP, ATM	IMP-1	63	Pancreatic cancer	Pneumonia	IMP, PMB	Death
43	G	8/12/2005	ICU	CS, TM, AMK, GM, NET	AmpC overproduction	39	Severe asthma	Bloodstream	CAZ, GM	Death

^a Abbreviations: AMK, amikacin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CS, colistin; FEP, cefepime; GM, gentamicin; IMP, imipenem; MEM, meropenem; NET, netilmicin; NIT, nitrofurantoin; PMB, polymyxin B; TM, tobramycin; PIP, piperacillin; TZP, tazobactam; RIF, rifampin (rifampicin); COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ER, emergency room; HBV, hepatitis B virus infection; HCV, hepatitis C virus infection; HIV, human immunodeficiency virus infection; ICU, intensive care unit; NA, not available.

gene cassette encoding resistance to aminoglycosides in that class 1 integron (Fig. 1).

Using the I-CeuI technique, no conclusive results regarding the genetic location of *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SPM-1}, and *bla*_{IMP-1} genes were obtained. No plasmid was identified in the two *bla*_{CTX-M-2}-positive isolates as well as in all *bla*_{SPM-1}-positive isolates, whereas a single plasmid of 100 kb was identified in the *bla*_{IMP-1}-positive isolate. Southern blot hybridization of plasmid DNA extracted from *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SPM-1}, and *bla*_{IMP-1}-positive isolates using the corresponding probes did not give a positive signal. In addition, the transfer of these resistance determinants to both *E. coli* and *P. aeruginosa* PAO1 recipient strains remained unsuccessful.

Detailed analysis of *bla*_{GES}-positive isolates. In order to detail the environment of the *bla*_{GES} genes in *P. aeruginosa* isolates, a cloning step was necessary. Cloning of HindIII-digested total DNA from isolate 35 resulted in a *bla*_{GES-5}-positive recombinant plasmid containing an insert of approximately 10 kb. Sequencing of the insert revealed that the *bla*_{GES-5} gene was located at the first position of a class 1 integron, followed by the *aacA7* and *aacA4* gene cassettes. The 59-base element (59-be) of the *aacA4* gene cassette was interrupted by a new insertion sequence element named ISPa29 belonging to the IS1111 family, members of which have been shown to insert themselves into the recombination sites of gene cassettes by site-specific recombination (32). ISPa29 was 1,534 bp long, possessed 12-bp-long imperfect subterminal inverted repeats, and was not bracketed by any target site duplication as commonly observed for IS1111 family members (Fig. 1) (32). Its transposase shared 63% identity with that of IS1492 identified from *Pseudomonas putida*. The ISPa29 sequence has been deposited on the IS Biotoul website (<http://www-is.biotoul.fr>). This class 1 integron was bracketed by two copies of IS26, located in opposite orientations as drawn in Fig. 1, thus constituting a composite transposon structure, as already found for another β-lactamase gene (*bla*_{VEB-1})-positive integron, In53 (22).

Further PCR mapping used to target IS26 elements and the gene cassettes for the *bla*_{GES-5}- and *bla*_{GES-1}-positive isolates showed that they possessed the same class 1 integron structure. That integron possessed the promoter *P*_{amv} whereas promoter *P*₂ was under an inactive form. As observed for the *bla*_{GES-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* strain ORI-1 from French Guiana (26), the *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes identified in our isolates were purified as a form of gene cassette with a truncated 59-be of 19 bp. Again, the I-CeuI technique did not allow us to clarify whether those *bla*_{GES}-like genes were chromosomally or plasmid located. In addition, plasmid analysis followed by Southern blotting and hybridization with a *bla*_{GES}-specific probe performed with all *bla*_{GES}-positive isolates failed to identify any plasmid. In accordance with those latter negative results, repeated attempts to transfer the *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes by transformation into *E. coli* or *P. aeruginosa* recipient strains failed. Those results strongly suggested the chromosomal location of the *bla*_{GES}-like genes.

DISCUSSION

The rate of ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* strains (28%) isolated from blood cultures was quite high in this study. A similarly high rate of resistance has been reported for many

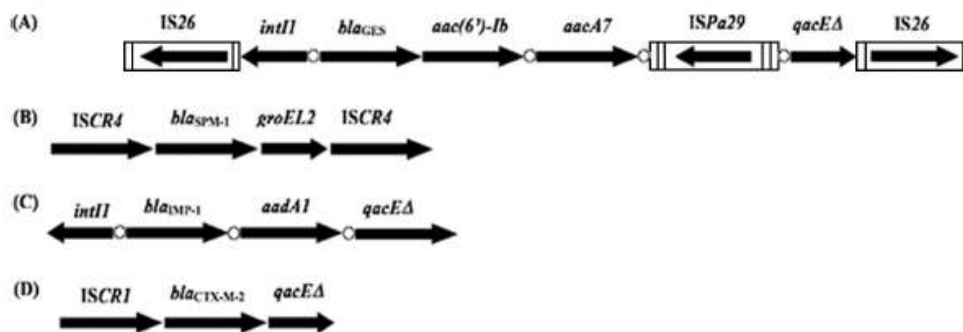


FIG. 1. Schematic representation of the genetic environment of β -lactamase-encoding genes identified in *P. aeruginosa* isolates. The coding genes are represented by arrows indicating their translation orientations, and 59-bes are indicated as white circles. (A) Genetic environment of *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5}. (B) Genetic environment of *bla*_{SPM-1}. (C) Genetic environment of *bla*_{TMP-1}. (D) Genetic environment of *bla*_{CTX-M-2}.

developing countries worldwide (42). Here we showed that this high rate is mainly due to ESBL- and MBL-encoding genes, together with the clonal spread of several specific clones. Interestingly, AmpC overproduction as a single enzymatic mechanism for ceftazidime resistance was rarely observed; it seemed to be replaced by acquisition of β -lactamases with an expanded spectrum of activity. Worryingly, a very high proportion of those isolates were also resistant to imipenem (82%) and meropenem (95%), suggesting the presence of nonenzymatic mechanisms of carbapenem resistance, such as porin loss and/or overexpression of efflux pumps.

Our study showed that the *bla*_{GES}-type ESBL genes were identified in 13.9% of the ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates and were divided into two distinct clones. Since *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} genes were identified in the same *P. aeruginosa* clone, it may correspond to a local evolution of this clone. Considering that GES-5 possesses a wider spectrum of hydrolysis than that of GES-1, it might be speculated that this evolution could be due to a carbapenem-related selective pressure. Notably, those *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5} gene cassettes had a truncated 59-be that was identical to that described in the *bla*_{GES-1}-positive *K. pneumoniae* ORI-I strain from French Guiana (34). Since French Guiana and Brazil are neighboring countries, those findings may suggest a spread of *bla*_{GES}-related structures in that part of the world.

The present study underlines the idea that the current spread of CTX-M enzymes may occur not only in the *Enterobacteriaceae* but also in *P. aeruginosa*. Interestingly, one recent study carried out in the same Brazilian hospital found that 44.8% of *K. pneumoniae* clinical isolates were CTX-M-2 producers (6). In addition, a CTX-M-2-producing *P. aeruginosa* strain that was susceptible to ceftazidime was recently identified in this hospital (22). Such a spread of CTX-Ms may be difficult to detect since many CTX-M variants confer a higher degree of resistance to cefotaxime than to ceftazidime (34). Therefore, since our selection criterion was based on ceftazidime resistance, the rate of CTX-M production among *P. aeruginosa* isolates identified here might be underestimated.

The genetic environments surrounding the *bla*_{CTX-M} and *bla*_{GES}-type β -lactamase genes in *P. aeruginosa* were identical to those identified in the *Enterobacteriaceae*, underlining their common origin. It is likely that the location of the β -lactamase genes in *P. aeruginosa* results from their transfer from the *Enterobacteriaceae*.

Overall, the production of SPM-1 carbapenemase was the main source of resistance to ceftazidime, accounting for 62.8% of the isolates. SPM-1-producing *P. aeruginosa* isolates are widely disseminated in Brazil, with a single clone identified in different cities (10). This clone has been also recently identified in *P. aeruginosa* isolates recovered from Switzerland (9). We showed here that this SPM-1-producing clone had been responsible for a large outbreak causing septicemia in 27 hospitalized patients, leading to the death of at least 15 of them.

This study underlines the possibility that a variety of β -lactamases with wide spectra of activity may circulate in *P. aeruginosa* in Brazil, contributing to a multidrug resistance phenotype. Lack of their identification and consequently lack of isolation of carriers may lead to a further dissemination.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially funded by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-EA3539), Université Paris XI, France, and mostly by grants from the European Community (DRESP2 contract, LSHM-CT-2005-018705 and TROCAR HEALTH-F3-2008-223031) and by the INSERM. We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), which gave a PDEE grant to Renata Cristina Picão (protocol #3682/07-2) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing a researcher grant to Ana Cristina Gales (process number 307714/2006-3).

REFERENCES

- Al Naleim, N., B. Duim, and A. Bart. 2006. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Med. Microbiol.* 55:1607–1608.
- Castanheira, M., R. E. Mendes, T. R. Walsh, A. C. Gales, and R. N. Jones. 2004. Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2344–2345.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Collis, C. M., and R. M. Hall. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:155–162.
- Da Fonseca, E. L., V. V. Vieira, R. Cipriano, and A. C. Vicente. 2007. Emergence of *bla*_{GES-5} in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:576–577.
- Do Carmo Filho, J. R., R. M. Silva, M. Castanheira, M. C. Tognini, A. C. Gales, and H. S. Sader. 2008. Prevalence and genetic characterization of *bla*_{CTX-M} among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. *J. Chemother.* 20:600–603.
- Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, C. André, L. Coulangue, and C. Quentin. 2005. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home. *J. Clin. Microbiol.* 43:4129–4138.

8. Dubois, V., L. Poirel, C. Marie, C. Arpin, P. Nordmann, and C. Quentin. 2002. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*_{GES-1} and a fused product of *aac3-Ib/aac6'-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:638–645.
9. El Salabi, A., M. A. Toleman, T. R. Walsh, R. Frei, and T. Bruderer. 2008. The metallo- β -lactamase (MBL) SPM-1 arrives in Europe, abstr. C1-124, p. 92. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC)-Infect. Dis. Soc. Am. (IDSA) 46th Annu. Meet. American Society for Microbiology and Infectious Diseases Society of America, Washington, DC.
10. Gales, A. C., L. C. Menezes, S. Silbert, and H. S. Sader. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:699–702.
11. Héritier, C., L. Poirel, D. Aubert, and P. Nordmann. 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:268–273.
12. Hirakata, Y., T. Yamaguchi, M. Nakano, K. Izumikawa, M. Mine, S. Aoki, A. Kondoh, J. Matsuda, M. Hirayama, K. Yanagihara, Y. Miyazaki, K. Tomono, Y. Yamada, S. Kamihira, and S. Kohno. 2003. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 37:26–32.
13. Kieser, T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12:19–36.
14. Liu, S. L., A. Hessel, and K. E. Sanderson. 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6874–6878.
15. Moland, E. S., N. D. Hanson, V. L. Herrera, J. A. Black, T. J. Lockhart, A. Hossain, J. A. Johnson, R. V. Goering, and K. S. Thomson. 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:711–714.
16. Naas, T., L. Philippon, L. Poirel, E. Ronco, and P. Nordmann. 1999. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1281–1284.
17. Nagano, N., Y. Nagano, C. Cordevant, N. Shibata, and Y. Arakawa. 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* 42:3978–3984.
18. Nordmann, P., and H. Mammert. 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* 2:297–307.
19. Nordmann, P., T. Naas, N. Fortineau, and L. Poirel. 2007. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:436–440.
20. Nordmann, P., E. Ronco, T. Naas, C. Dupont, Y. Michel-Briand, and R. Labia. 1993. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:962–969.
21. Pellegrino, F. L., K. R. Netto-dos Santos, L. W. Riley, and B. M. Moreira. 2006. *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 10:251–253.
22. Picão, R. C., L. Poirel, A. C. Gales, and P. Nordmann. 2009. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2225–2226.
23. Poirel, L., L. Brinas, A. Verlinde, L. Ide, and P. Nordmann. 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3743–3748.
24. Poirel, L., L. Cabanne, H. Vahaboglu, and P. Nordmann. 2005. Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla*_{PER-1} gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1708–1713.
25. Poirel, L., M. Guibert, D. Girlich, T. Naas, and P. Nordmann. 1999. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:769–776.
26. Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:622–632.
27. Poirel, L., M. Magalhaes, M. Lopes, and P. Nordmann. 2004. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1406–1409.
28. Poirel, L., O. Mennteu, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann. 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* 41:3542–3547.
29. Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E. B. Chaibi, R. Labia, and P. Nordmann. 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:573–581.
30. Poirel, L., T. Naas, D. Nicolas, L. Collet, S. Bellais, J. D. Cavallo, and P. Nordmann. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:891–897.
31. Poirel, L., G. F. Weldhagen, T. Naas, C. De Champs, M. G. Dove, and P. Nordmann. 2001. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2598–2603.
32. Post, V., and R. M. Hall. 2009. Insertion sequences in the IS1111 family that target the *attC* recombination sites of integron-associated gene cassettes. *FEMS Microbiol. Lett.* 290:182–187.
33. Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel, and P. Nordmann. 2009. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1766–1771.
34. Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, and C. Mugnaioli. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(Suppl. 1):33–41.
35. Sader, H. S., A. O. Reis, S. Silbert, and A. C. Gales. 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:73–76.
36. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
37. Toleman, M. A., P. M. Bennett, and T. R. Walsh. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:296–316.
38. Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 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.
39. Vourli, S., P. Giakkoupi, V. Mirtagou, E. Tzelepi, A. C. Vatopoulos, and I. S. Tzouveleki. 2004. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 234:209–213.
40. Wachino, J., Y. Doi, K. Yamane, N. Shibata, T. Yagi, T. Kubota, and Y. Arakawa. 2004. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2905–2910.
41. Walsh, T. R. 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:367–371.
42. Yong, D., J. M. Bell, B. Ritchie, R. Pratt, M. A. Toleman, and T. R. Walsh. 2007. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593, p. 75. Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.

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](#)