

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

RÔMULO GUARNERI

**ESTUDO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* MULTIRRESISTENTES E PRODUTORES DE
METALO- β -LACTAMASES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Jr.

Florianópolis

2011

Dedico este trabalho a minha esposa Isis, minha filha Emanuele e ao Amor, Ele que é meu pensar e meu agir, nEle temos vida. Deus é amor. Amar é cumprir a Lei e o Amor deve estar sempre acima da nossa vontade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Deus da Vida por todo o mover e aos meus familiares pela presença. Minha esposa e filha que me compreenderam, compartilharam de perto minhas aflições e procuraram minha felicidade nos momentos juntos. Meus pais, irmãos e familiares que me motivaram e me auxiliaram de várias maneiras, meus sogros que também puderam dar suporte neste período e meus irmãos em Cristo que intercederam pela minha vida.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Artur Smânia Jr., meu orientador, primeiramente por aceitar o desafio e então, por fornecer todo o auxílio necessário para a conclusão deste trabalho, bem como, a sua esposa Prof.^a Dr.^a Elza de F. A. Smânia pela motivação e auxílio técnico.

Igualmente, agradeço às colegas de profissão e minhas supervisoras Cássia M. Zoccoli e Nina R. Tobouti pelos recursos disponibilizados e compreensão de minha ausência durante as atividades rotineiras no Laboratório Médico Santa Luzia.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC e professores associados a outros programas pela oportunidade de aperfeiçoamento acadêmico e profissional, em especial, à Prof.^a Dr.^a Andrea de L. Pimenta pelos conselhos precisos, os quais renderam a estrutura final deste trabalho e por aceitar examinar o mesmo; à Prof.^a Dr.^a Simone Senna pela motivação e por também aceitar julgar a valia deste trabalho; ao Prof. Dr. Carlos R. Merlin pelos insumos fornecidos e à secretária do programa, Joice F. da Costa, pela competência e solicitude sempre imediatas.

Também agradeço pela convivência e favores dos colegas do Setor de Microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia e colegas do Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC.

Agradeço ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica/Laboratório ALERTA da UNIFESP/EPM, em especial à Dr.^a Eloísa Campana e à Dr.^a Ana Gales por fornecerem cepas de referência utilizadas neste trabalho, à Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner da UFSM por participar do exame deste trabalho e pela disposição em realizar análises moleculares da amostragem deste, bem como ao Prof. Alexandre Rieger e colegas de laboratório da UNISC por efetivarem essas atividades.

“Há um vazio no formato de Deus no coração de todo homem.” Blaise Pascal

“A ciência nos dá o conhecimento do mundo e a religião nos dá o significado.” Michael Keller

RESUMO

Nas últimas duas décadas, índices crescentes de resistência têm minado a eficácia dos agentes antimicrobianos. *Pseudomonas aeruginosa* são importantes patógenos hospitalares e esta espécie é considerada um reservatório de genes determinantes de resistência, inclusive genes que codificam para as metalo- β -lactamases (M β L). M β L são betalactamases capazes de hidrolisar os antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos, os quais constituem o tratamento empírico de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. Neste trabalho foram analisados 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa* quanto à susceptibilidade aos principais antimicrobianos utilizados na clínica. Através da determinação das concentrações inibitórias mínimas, 41 desses não eram sensíveis a imipenem e meropenem e 31 se apresentaram simultaneamente resistentes a estes dois carbapenêmicos e às cefalosporinas ceftazidima e cefepima. Vinte e quatro isolados foram considerados produtores de M β L através do teste de sinergismo de disco duplo (DDST) utilizando ácido 2-mercaptopropiônico como inibidor seletivo de M β L. Trinta e cinco isolados (35/42) foram avaliados quanto à presença dos genes de M β L. Em dezessete dos isolados em que os testes fenotípicos se apresentaram positivos, quinze (15/17) corresponderam às subclasses SPM-1 (14/15) e IMP-1 (1/15). Nos demais isolados onde os testes fenotípicos se apresentaram negativos, também em quatro (4/18) deles pôde ser verificada a presença da subclasse SPM-1. A ocorrência de isolados produtores desta enzima naqueles isolados não sensíveis aos carbapenêmicos foi de 58,54% (24/41; $p = 0,4322$), no entanto, naqueles simultaneamente resistentes aos carbapenêmicos e cefalosporinas, aliados à observação de CIM elevadas, foi de 85,71% (24/28; $p < 0,001$), sugerindo que o isolamento de *P. aeruginosa* apresentando este último fenótipo é um indicativo mais apurado da presença de M β L. Os isolados desta amostragem também demonstraram uma associação positiva entre a presença de M β L e perfis de multirresistência. Foi observado que 81,5% (22/27) dos isolados sensíveis a, no máximo, colistina e aztreonam, produziam M β L. Assim, a correlação entre a presença dessa enzima e a observação de multirresistência foi de 91,67% ($p < 0,001$) e a uma razão 3,3 vezes superior à correlação obtida para os isolados não produtores de M β L.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. Metalo- β -lactamases. Carbapenemases.

ABSTRACT

In the last two decades, increasing rates of resistance have weakened the effectiveness of antimicrobial agents. *Pseudomonas aeruginosa* is an important nosocomial pathogen and the species is considered as a reservoir of resistant genes, including those coding for metallo- β -lactamases (M β L). M β L are enzymes able to hydrolyze the carbapenem beta-lactam antibiotics, which are the empirical treatment of infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria. In the present work, 42 clinical isolates of *P. aeruginosa* with different susceptibility to the main antimicrobials used in the clinic were analyzed. By determining the minimum inhibitory concentrations, 41 of them were not sensitive to imipenem and meropenem, and 31 were simultaneously resistant to these carbapenems and to the cephalosporins ceftazidime and cefepime. Twenty-four isolates were considered as producers of M β L through double-disk synergy test (DDST) using the acid 2-mercaptopropionic as an MBL selective inhibitor. Thirty-five isolates (35/42) were evaluated for the presence of M β L genes. In seventeen of them, in which the phenotypic tests were positive, fifteen (15/17) corresponded to subclasses SPM-1 (14/15) and IMP-1 (1/15). In the other eighteen isolates where phenotypic tests were negative, four of them (4/18) also presented the SPM-1 gene. In the group of isolates resistant to carbapenems, the occurrence of producers of this enzyme was 58.54% (24/41; $p = 0.4322$). However, when the resistant isolates to both carbapenem and cephalosporin were combined with the observation of high MIC values, this value increased to 85.71% (24/28; $p < 0.001$). This suggests that the occurrence of isolates of *P. aeruginosa* showing the latter phenotype is a reliable indicative of the presence of M β L. Isolates of this sample also showed a positive association between the presence of M β L and profiles of multidrug resistance. The results showed that 81.5% (22/27) of the isolates sensitive at least to colistin and aztreonam, produced M β L. The correlation between the presence of M β L and the observation of multidrug resistance was of 91.67% ($p < 0.001$), in a rate 3.3 times greater than the risk obtained for the isolates that did not produce M β L.

Keywords: Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Metallo- β -lactamases. Carbapenemases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura 3D de um segmento do peptidoglicano.	39
Figura 2 – Montagem do peptidoglicano (etapa extracitoplasmática) e atuação dos antimicrobianos betalactâmicos impedindo a maturação de sua estrutura polimérica (inibição das reações de transpeptidação).	40
Figura 3 – Ilustração da atuação das betalactamases no espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas.	49
Figura 4 – Ilustração das atuações sinérgicas do composto inibidor 2-MPA e do agente antimicrobiano CAZ sobre a inibição do crescimento bacteriano em isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de M β L nos DDST.	82
Figura 5 – Resultados de DDST.	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Agentes antimicrobianos representantes das principais classes dos betalactâmicos.	41
Quadro 2 – Principais mecanismos de resistência encontrados em <i>P. aeruginosa</i> e os grupos ou agentes antimicrobianos afetados.	45
Quadro 3 – Betalactamases descritas em <i>P. aeruginosa</i>	52
Quadro 4 – Resultados dos testes de sinergismo de disco duplo (DDST) nos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i>	88
Quadro 5 – Correlação entre os resultados das PCR e dos DDST para 35 isolados de <i>P. aeruginosa</i> estudados.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Agentes antimicrobianos testados e critérios interpretativos aplicados para o teste de disco difusão em gel.....	76
Tabela 2 – Antimicrobianos testados, concentrações empregadas e intervalos de CIM calculadas disponíveis no Cartão de Suscetibilidade para Gram-Negativos AST-N105 (Vitek 2 Compact®, bioMérieux, Marcy L’Etoile, França).....	79
Tabela 3 – Critérios interpretativos usados para distinguir a susceptibilidade de estirpes de <i>P. aeruginosa</i>	80
Tabela 4 – Resultado dos Testes de Sinergismo de Disco Duplo para os 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> selecionados e interpretação dos resultados obtidos.	89
Tabela 5 – CIM obtidas de 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> pelo método automatizado, expressas em µg/ml e interpretadas segundo os critérios preconizados.....	95
Tabela 6 – CIM obtidas de 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> pelo método convencional, expressas em µg/ml e categorizadas segundo os critérios interpretativos preconizados.	98
Tabela 7 – Comparação das frequências de isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos antimicrobianos betalactâmicos testados segundo os resultados das CIM e associação estatística positiva ($\rho < 0,05$) entre a presença de M β L e a frequência de isolados resistentes.	114
Tabela 8 – Comparação das susceptibilidades dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> aos agentes antimicrobianos das demais classes terapêuticas testadas (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas) segundo os resultados de DDST e associação estatística positiva ($\rho < 0,05$) da presença de M β L e frequência de isolados resistentes.	117
Tabela 9 – Perfil de susceptibilidade segundo a produção de M β L dos 27 isolados mais resistentes deste estudo.....	118

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> entre os sítios anatômicos dos pacientes.	86
Gráfico 2 – Distribuição dos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> segundo as instituições ou ambientes onde se encontravam os pacientes dos quais os espécimes biológicos foram obtidos.	86
Gráfico 3 – Distribuição dos 24 isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtoras de M β L entre as instituições onde se encontravam os pacientes dos quais os espécimes clínicos foram recuperados e representatividade do número de isolados analisados de cada instituições entre a amostragem total.	91
Gráfico 4 – Distribuição dos 24 isolados produtores de M β L segundo os sítios anatômicos de onde foram recuperados.	93
Gráfico 5 – Distribuição dos 24 isolados produtores de M β L segundo as unidades hospitalares nas instituições onde se encontravam os pacientes dos quais os isolados foram recuperados.	93
Gráfico 6 – Suscetibilidade dos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos betalactâmicos.	100
Gráfico 7 – Distribuição das CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos testados nos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i>	102
Gráfico 8 – Suscetibilidade dos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> aos representantes das demais classes (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas) de antimicrobianos testadas.	104
Gráfico 9 – Distribuição das CIM obtidas para as demais classes de antimicrobianos testadas nos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i>	106
Gráfico 10 – Suscetibilidade dos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos betalactâmicos agrupados segundo seus resultados nos DDST.	109
Gráfico 11 – Distribuição das CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos nos 24 isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram DDST positivos (“+”).	110
Gráfico 12 – Distribuição das CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos nos 14 isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram DDST negativos (“-”).	112
Gráfico 13 – Suscetibilidade dos 42 isolados de <i>P. aeruginosa</i> aos representantes das demais classes de antimicrobianos testados (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas) agrupados segundo seus resultados nos DDST.	116

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Lista dos 42 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes estudados segundo suas procedências, sítios de coleta e datas de recuperação.	149
Anexo B – Histórico de recuperação de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes a partir de espécimes clínicos obtidos do mesmo paciente em que foi obtido o isolado P08.	151
Anexo C – Histórico de recuperação de isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes a partir de espécimes clínicos obtidos do mesmo paciente em que foi obtido o isolado P13.	151
Anexo D – Histórico de recuperação de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes a partir de espécimes clínicos obtidos do mesmo paciente em que foi obtido o isolado P83.	152
Anexo E – Pré-visualização do laudo contendo as CIM do isolado P22 (Isolado de <i>P. aeruginosa</i> avaliado por este estudo).	153
Anexo F – Resultados de DDST positivos dos 24 isolados de <i>P. aeruginosa</i> considerados como produtores de M β L.	155
Anexo G – Resultados de DDST negativos dos 14 isolados de <i>P. aeruginosa</i> considerados como não produtores de M β L.	157
Anexo H – DDST de 4 isolados de <i>P. aeruginosa</i> considerados inconclusivos para a presença de M β L devido à sensibilidade (P27, P80 e P83) ou sensibilidade intermediária (P07) à Ceftazidima apresentada pelos mesmos.	159
Anexo I – Cálculos ¹ da sensibilidade e do valor preditivo negativo encontrados para o sistema Vitek® 2 para a detecção de carbapenemases em isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes quando comparados ao DDST (<i>Double-Disk Sinergy Test</i>).	161
Anexo J – Representação gráfica dos fenótipos na identificação dos mecanismos mediadores de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos através do sistema Vitek® 2.	163
Anexo K – Associação entre a presença de M β L e os isolados com perfis de suscetibilidade mais resistentes da amostragem deste trabalho (42 isolados).	167
Anexo L – Frequências de suscetibilidade aos antimicrobianos betalactâmicos de isolados de <i>P. aeruginosa</i> recuperados de pacientes internados em sete instituições públicas e privadas da região da Grande Florianópolis e recuperados de pacientes atendidos em caráter ambulatorial atendidos pelo serviço de microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL) de Florianópolis, SC, no período de março a dezembro de 2010.	169
Anexo M – Frequências de suscetibilidade aos representantes de outras classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas) de isolados de <i>P. aeruginosa</i> recuperados de pacientes internados em sete instituições públicas e privadas da região da Grande Florianópolis e recuperados de pacientes atendidos em caráter ambulatorial atendidos pelo	

serviço de microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL) de
Florianópolis, SC, no período de março a dezembro de 2010..... 170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MPA	Ácido 2-Mercaptopropiônico
AME	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CID	Classificação Internacional de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DDST	Teste de Sinergismo de Disco Duplo
DNA	Ácido Desoxi-Ribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ESBL	Betalactamases de Espectro Estendido
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
IC95%	Índice de Confiança (95%)
IS	<i>Insertion Sequence</i>
ISCR	<i>Insertion Sequence Common Region</i>
LEMC	Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
LIS	<i>Laboratory Information System</i>
LMSL	Laboratório Médico Santa Luzia
LPS	Lipopolissacarídeo
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
MβL	Metalo-β-Lactamase
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
QRDR	<i>Quinolone-Resistance Determining Region</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SENTRY	Programa de Vigilância Epidemiológica e Resistência Antimicrobiana
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultravioleta
TBE	Tris-Borato-EDTA (solução tampão)

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
%	Por cento
®	Marca registrada
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrometro
<i>bla</i>	<i>Beta-lactamase allele</i>
C-N	Ligação Carbono-Nitrogênio
<i>d</i>	Dextrógiro
h	Hora
kb	Kilobases
K_{cat}/k_m	Constante de Especificidade
<i>l</i>	Levógiro
MgCl_2	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Militro
mM	Milimolar
mol	1.10^{23} moléculas
ng	Nanogramas
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
pmol	Picomol
R\$	Reais
rpm	Rotações por minuto
™	<i>Team</i>
U	Unidades
V	Volt
v/v	Volume/Volume
Zn^{2+}	Cátion Divalente de Zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvii
LISTA DE ANEXOS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. OBJETIVOS.....	31
1.1.1. Objetivo Geral.....	31
1.1.2. Objetivos Específicos.....	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	33
2.1.1. Epidemiologia e Suscetibilidade.....	35
2.1.2. Tratamento de infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	36
2.2. ANTIMICROBIANOS E MECANISMOS DE AÇÃO.....	36
2.2.1. Antimicrobianos Betalactâmicos.....	37
2.2.1.1. Betalactâmicos carbapenêmicos.....	42
2.2.2. Antimicrobianos não-betalactâmicos.....	42
2.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	43
2.3.1. Mecanismos de resistência em <i>P. aeruginosa</i>	44
2.3.1.1. Betalactamases em <i>P. aeruginosa</i>	48
2.3.1.2. Carbapenemases.....	54
2.3.1.3. Metallo- β -Lactamases.....	54
2.3.1.4. Metallo- β -lactamases em isolados de <i>P. aeruginosa</i> recuperados no Brasil.....	64
2.4. IMPACTO CLÍNICO DE ISOLADOS DE <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i> PRODUTORES DE M β L.....	70
3. METODOLOGIA.....	75
3.1. AMOSTRAGEM.....	75
3.1.1. Identificação.....	75
3.1.2. Difusão em gel.....	75
3.1.3. Critério de seleção.....	77
3.1.4. Armazenamento.....	77

3.2.	SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> AOS ANTIMICROBIANOS.....	77
3.2.1.	Cepas Bacterianas.....	77
3.2.1.1.	Isolados de <i>P. aeruginosa</i>	77
3.2.1.2.	Cepas de referência.....	77
3.2.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	78
3.2.2.1.	Método automatizado.....	79
3.2.2.2.	Método convencional.....	81
3.3.	DETECÇÃO FENOTÍPICA DA PRESENÇA DE METALO- β -LACTAMASES.....	81
3.4.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	83
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.1.	ESPÉCIMES CLÍNICOS.....	85
4.2.	DETECÇÃO FENOTÍPICA DE M β L PELO TESTE DE SINERGISMO DE DISCO DUPLO – DDST.....	88
4.3.	COMPARAÇÕES ENTRE AS SUSCETIBILIDADES ENCONTRADAS PELAS METOLOGIAS AUTOMATIZADA E DISCO DIFUSÃO EM GEL.....	94
4.4.	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DOS PERFIS DE SUSCETIBILIDADE DA AMOSTRAGEM.....	98
4.4.1.	Comparações das suscetibilidades aos antimicrobianos betalactâmicos entre isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores e não produtores de M β L.....	108
4.4.2.	Comparações das suscetibilidades aos antimicrobianos não-betalactâmicos entre os isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores e não produtores de M β L.....	115
4.5.	CORRELAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE MULTIRRESISTÊNCIA E A PRESENÇA DE METALO- β -LACTAMASES.....	117
4.5.1.	Avaliação dos critérios de seleção da amostragem e a presença indicativa de M β L.....	119
4.6.	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS SEGUNDO A PRESENÇA DE GENES CODIFICADORES DE METALO- β -LACTAMASES.....	121
5.	CONCLUSÕES.....	125
	REFERÊNCIAS.....	127
	ANEXOS.....	149

1. INTRODUÇÃO

Muitas as ações na área da saúde pública global, especialmente àquelas relacionadas aos ambientes hospitalares, são dependentes do uso profilático de agentes antimicrobianos eficientes (ARIAS; MURRAY, 2009; MESAROS *et al.*, 2007; THOMSON; BONOMO, 2005).

O uso de antimicrobianos representa uma importante fração dos gastos com pacientes internados, pois além do uso profilático de antimicrobianos requerido por diversas intervenções médicas, tratamentos com estes compostos são instituídos visando à erradicação de microrganismos à medida que pacientes adquirem infecções durante seu manejo intra-hospitalar (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011; LEVY, 2005). No Brasil e somente no ano de 2010, o Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) registrou mais de 11 milhões de internações em hospitais públicos do Brasil e o valor gasto com serviços hospitalares foi superior a 8,5 bilhões de reais (BRASIL, 2011).

Atualmente, entretanto, índices crescentes de resistência microbiana têm minado a eficácia dos agentes antimicrobianos (LEVY, 2005; HARBOTTLE *et al.*, 2006). Esse fenômeno é observado principalmente em ambientes hospitalares, onde bactérias de todos os gêneros se adaptam à presença intensa de antimicrobianos. Muitas situações têm sido descritas em que o isolado clínico exibe plena resistência aos antimicrobianos disponíveis inviabilizando sua erradicação do sítio infeccioso (THOMSON; BONOMO, 2005). Alguns autores asseguram que o fenômeno da resistência microbiana observado nas últimas duas décadas é surpreendentemente negativo e figura como a pior situação reconhecida desde a era pré-antibiótica, isto é, desde o período que antecedeu à introdução clínica das sulfonamidas e da penicilina. E desde então, embora muitos agentes antimicrobianos tenham sido desenvolvidos e verdadeiramente contribuído para a diminuição da mortalidade humana associada às infecções bacterianas, as perspectivas de sucesso de tratamento têm agora, em parte, se assemelhado àquela época (GISKE *et al.*, 2008a; ARIA; MURRAY, 2009; WALSH; AMIES, 2004; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006; HARBOTTLE *et al.*, 2006).

As consequências da alta prevalência de resistência aos antimicrobianos para a saúde pública são ainda maiores pela perceptível falta de interesse econômico da indústria farmacêutica na obtenção de novos compostos com atividade antimicrobiana. Apesar das melhorias

tecnológicas no processo de descoberta de novas moléculas bioativas e o grande número de estudos publicados sobre compostos promissores, a liberação de novos antimicrobianos que confrontem o fenômeno da resistência diminuiu drasticamente. Na última década foram produzidos novos antimicrobianos apenas para Gram-positivos, mas nenhuma nova classe ou composto foi desenvolvido especificamente para bacilos Gram-negativos multirresistentes (ABBANAT; MORROW; BUSH, 2008; GISKE *et al.*, 2008a; COATES; HU, 2007; LEVY, 2005; LOMBARDINO; LOWE, 2004).

Patógenos resistentes à terapia com antimicrobianos que detêm a atenção das comissões que se ocupam do controle de infecções hospitalares estão distribuídos tanto no grupo das bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. No entanto, os organismos Gram-negativos são mais refratários à terapia com antimicrobianos. Infecções causadas por *P. aeruginosa*, por exemplo, são especialmente problemáticas de tratar e normalmente exigem o uso dos antimicrobianos mais recentes (MENDES *et al.*, 2006; WALSH; AMIES, 2004).

Pseudomonas aeruginosa é um microrganismo ubiqüitário que se encontra disseminado em humanos e em ambientes hospitalares. Esta espécie é considerada um patógeno oportunista e é o principal bacilo Gram-negativo não fermentador da glicose (BGN-NF) causador de infecções nosocomiais, bem como um dos mais importantes patógenos nestes ambientes (JONES; SADER; BEACH, 2001). Isolados de *P. aeruginosa* são reconhecidos pela sua capacidade de colonizar e infectar principalmente o trato respiratório, sendo frequentemente recuperados de pacientes com pneumonia aguda e crônica, mas também, estão associados à bacteremias, infecções relacionadas a dispositivos invasivos, feridas cirúrgicas e queimaduras, dentre outros sítios (GILLHAM *et al.*, 2009; GIAMARELLOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; MASTORAKI *et al.*, 2008; MESAROS *et al.*, 2007; WINN *et al.*, 2006; TODER, 2002).

P. aeruginosa é capaz de expressar muitos mecanismos de resistência podendo tornar-se multirresistente, isto é, refratária ao tratamento com classes distintas de antimicrobianos. A resistência intrínseca nesta espécie é devida principalmente a baixa permeabilidade da membrana externa, a expressão de sistemas de efluxo e de betalactamases. Essas características naturais dão a essa espécie predisposição para a sobrevivência em ambientes expostos a antimicrobianos. Além desses mecanismos, essa espécie pode apresentar uma variedade de outros adquiridos que podem lhe conferir resistência a

todas as classes de agentes antimicrobianos, inclusive aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos, os quais são considerados como uma das principais escolhas no tratamento de espécimes multirresistentes. A emergência de isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* resistentes a múltiplos antimicrobianos tem denotado às infecções causadas por este patógeno um prognóstico ameaçador (STRATEVA; YORDANOV, 2009; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GIAMARELLOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; MESAROS *et al.*, 2007; THOMSON; BONOMO, 2005).

A suscetibilidade de isolados de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos pode ser afetada por diversos mecanismos e a co-expressão desses mecanismos pode conferir resistência a esses fármacos. Contudo, e à semelhança de outras bactérias do grupo das Gram-negativas, a aquisição de genes que codificam betalactamases é o mais importante mecanismo determinante da resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, inclusive carbapenêmicos (STRATEVA; YORDANOV, 2009; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2008; MESAROS *et al.*, 2007; QUEENAN; BUSH, 2007).

As betalactamases representam um grupo extenso de diversas enzimas com diferentes afinidades por antimicrobianos betalactâmicos e estão presentes em muitos gêneros bacterianos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos (BUSH; JACOBY, 2010). Nas bactérias Gram-negativas, as betalactamases constituem um mecanismo muito eficiente de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, pois, além de sua eficiência catalítica, são produzidas e transportadas ao espaço periplásmico destes microrganismos, um ambiente restrito que permite altas concentrações destas enzimas. Em *P. aeruginosa*, além das betalactamases naturalmente expressas e codificadas por genes localizados em seu cromossoma, já foram identificadas diversas outras betalactamases codificadas por genes adquiridos. Entre a diversidade dessas enzimas, as betalactamases emergentes mais preocupantes são aquelas que possuem hidrólise ampliada aos carbapenêmicos, já que, algumas delas são capazes de isoladamente conferir resistência em altos níveis a todos os betalactâmicos (ZAVASCKI *et al.*, 2010 *apud* XAVIER, 2010; QUEENAN; BUSH, 2007). Tais enzimas são comumente conhecidas como carbapenemases e estão divididas em duas famílias moleculares distinguidas pelo mecanismo hidrolítico de seus sítios ativos. Serino-carbapenemases, como a maioria das betalactamases, possuem um resíduo de serina que lhes confere a

atividade catalítica sobre os betalactâmicos. Enquanto que metalo- β -lactamases (M β L) são carbapenemases dependentes de íons metálicos (Zn^{2+}) como co-fator catalítico em seu sítio ativo (RICE; BONOMO, 2007; WALSH *et al.*, 2005; SADER *et al.*, 2005b; KAMINSKAIA; SPINGLER; LIPPARD, 2001).

As M β L são as carbapenemases mais prevalentes em isolados de *P. aeruginosa* (PICÃO *et al.*, 2009). A produção dessa classe de betalactamase é um dos principais mecanismos de resistência associada à falha terapêutica e aumento de índices de mortalidade nos casos em que o uso de antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos represente a escolha empírica para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno. Infecções causadas por *P. aeruginosa* produtora de M β L em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI), especialmente aqueles acometidos de bacteremia e pneumonia associada à ventilação mecânica, estão relacionadas tanto ao aumento da permanência hospitalar quanto a custos adicionais e ainda, com maior impacto, índices de mortalidade aumentados (MIYAJIMA *et al.*, 2008; MASTORAKI *et al.*, 2008; GIAMARELLOU, KANELLAKOPOULOU, 2008; ZAVASCKI *et al.*, 2006b; MARRA *et al.*, 2006).

O uso das polimixinas, uma classe de antimicrobianos introduzidos na clínica na década de 60 do século passado, mas que em seguida tiveram seu uso abandonado devido à alta incidência de toxicidade, tem sido reconsiderado, pois são os únicos fármacos que mantém boa atividade para o tratamento empírico de infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L (MASTORAKI *et al.*, 2008; MIYAJIMA *et al.*, 2008; HELFAND, BONOMO, 2005; MARRA *et al.*, 2006).

Portanto, considerando que *P. aeruginosa* é um importante patógeno em ambientes hospitalares e que essa espécie pode adquirir e expressar genes determinantes de resistência aos antimicrobianos da classe dos betalactâmicos carbapenêmicos, é de fundamental importância o estudo de isolados multirresistentes desta espécie que possam expressar MBL com o propósito de fornecer subsídios às comissões de controle de infecções hospitalares para que estas possam delinear ações capazes de impedir a ocorrência de surtos clonais desses microrganismos e a disseminação de seus genes a outras espécies microbianas.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Estudar isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos e a outras classes de antimicrobianos e que possam produzir a enzima metalo- β -lactamase.

1.1.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a suscetibilidade de isolados clínicos obtidos na região metropolitana de Florianópolis aos principais agentes betalactâmicos utilizados na prática médica para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*.
- b) Avaliar a suscetibilidade de isolados clínicos obtidos na região metropolitana de Florianópolis aos agentes antimicrobianos representantes de outras classes antimicrobianas (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas) utilizados na prática médica para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*.
- c) Identificar a produção da enzima metalo- β -lactamase nos isolados não suscetíveis aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos imipenem e meropenem.
- d) Caracterizar genotipicamente os isolados quanto à presença de genes que codifiquem para MBL.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P. aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não fermentador da glicose (BGN-NF) e lactose, aeróbico, móvel (flagelo polar), de crescimento rápido, da família *Pseudomonadaceae*. Dentre as espécies do gênero *Pseudomonas*, é a única que produz piocianina, um pigmento azul hidrossolúvel característico, o qual, em combinação com a pioverdina, produz a pigmentação verde-brilhante característica desta espécie. Seu crescimento em meio sólido de ágar base suplementado com 5% de sangue de carneiro (AS) é usualmente caracterizado por colônias grandes e de periferias espalhadas, com pigmentação cinza-metálica e exibindo β -hemólise. Além destas, a observação de outras características morfológicas podem contribuir para uma rápida caracterização ao nível de espécie, como a presença de odor frutado e reação de oxidase positiva (produção de indofenol oxidase). De forma complementar e diferencial a outras espécies com características morfológicas semelhantes, *P. aeruginosa* cresce a 42°C e apresenta reação de indol negativa (FRANCO, 2009; WINN, Jr. *et al.*, 2006; TODER, 2002).

Em consequência da grande variedade de ambientes em que pode se desenvolver, *P. aeruginosa* também é encontrada em ambientes hospitalares, onde pode infectar humanos na condição de patógeno oportunista. Pacientes com comorbidades, por exemplo, aqueles submetidos a transplantes, neutropênicos, instrumentalizados, internados em unidades de tratamento intensivo (UTI), entre outras situações, são os mais propensos a desenvolver infecções por vias endógenas (WINN, Jr. *et al.*, 2006; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002; STEIN, 1997). Esta espécie, assim como outras *Pseudomonas*, não é nutricionalmente exigente, sendo capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e de nitrogênio, e podendo, por isso, persistir em superfícies úmidas tornando-se de difícil erradicação de materiais inertes, como equipamentos cirúrgicos, dispositivos intravasculares e de suporte respiratório. Sua capacidade de formação de biofilmes é a principal característica que permite com que esta bactéria resista a esforços de descontaminação. Nessas comunidades, através de mecanismos multifatoriais de tolerância (difusão restrita de moléculas, atividade fisiológica diferencial e indução de mecanismos genéticos), podem

resistir aos tratamentos com antibióticos, biocidas e quando patógenos oportunistas, às respostas imunes do hospedeiro (HARMSEN *et al.*, 2010; MASTORAKI *et al.*, 2008; TODER, 2002).

P. aeruginosa é o BGN-NF mais importante clinicamente e um dos principais patógenos nosocomiais. Esta espécie pode expressar uma variedade de fatores de virulência, como: produção de alginato (polissacarídeo capsular que auxilia na aderência e formação de biofilmes caracterizando seu crescimento como de aparência mucóide), *pili* (aderência na colonização), neuraminidase (facilita a ligação dos *pili*), lipopolissacarídeos (endotoxina vasoativa), exotoxinas A (dano tecidual), exoenzima S (dano tecidual), enterotoxina (interrupção da atividade gastrointestinal), fosfolipase C (dano tecidual), elastase (dano tecidual e clivagem de imunoglobulinas e complemento), leucocidina (imunomodulação) e piocinanas (supressão da microbiota e destruição do epitélio pulmonar ciliado). O trato respiratório é o sítio anatômico mais frequentemente infectado por esta espécie onde, inclusive, o isolamento de *P. aeruginosa* é a causa principal de pneumonias agudas (principalmente associadas à ventilação mecânica) e crônicas (Fibrose Cística). Esta espécie também é frequentemente recuperada como agente etiológico de bacteremias e septicemias, infecções agudas e crônicas do trato urinário, otites, infecções de pele e partes moles (principalmente associadas a feridas cirúrgicas, queimaduras e úlceras de decúbito) e mais raramente, associada à ceratites, meningites, endocardites, osteomielites e infecções do trato gastrointestinal (GILLHAM *et al.*, 2009; MESAROS *et al.*, 2007; WINN *et al.*, 2006; TODER, 2002).

Essa versatilidade patológica e capacidade adaptativa são explicadas por um genoma extenso e complexo. São 5570orf (*open reading frames*), um dos maiores do mundo procariótico, com 10% dos genes dispostos em ilhas de patogenicidade. Adicionalmente, é capaz de resistir (intrinsecamente e após a aquisição de genes) a um grande número de agentes antimicrobianos e biocidas. Dos genes que codificam proteínas, 0,3% estão envolvidos na resistência a esses agentes. Infecções nosocomiais causadas por cepas resistentes são preocupantes, pois além de limitar as opções terapêuticas, estão associadas a índices de mortalidade, bacteremia secundária, permanência e custos aumentados (MESAROS *et al.*, 2007). Em um estudo conduzido por Tam e colaboradores (2010), dentre 235 isolados de *P. aeruginosa* recuperados de infecções de corrente sanguínea (ICS) entre 2005 e 2007, 33 (21%) foram considerados multirresistentes, isto é, cada isolado era resistente a três ou mais classes distintas de antimicrobianos.

2.1.1. Epidemiologia e Suscetibilidade

A capacidade adaptativa de *P. aeruginosa* reflete seu papel de destaque entre os principais patógenos humanos. Nos hospitais brasileiros, segundo um estudo realizado entre os anos de 2002 e 2006 através do Programa de Vigilância Epidemiológico e Resistência Antimicrobiana, SENTRY, (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*) o qual avaliou 1.027 isolados recuperados de pneumonias, 35,3% destes corresponderam a *P. aeruginosa*. Este mesmo estudo avaliou 680 isolados recuperados a partir de infecções de pele e partes moles onde esse microrganismo foi identificado em 14,3% destas amostras. Também, 8,0% dos 5.533 isolados recuperados de infecções de corrente sanguínea (ICS) correspondiam a essa espécie (XAVIER, 2010).

A suscetibilidade de isolados de *P. aeruginosa* é usualmente inferior a outras espécies. Durante o período de 1997 a 2001, pelas avaliações dos dados da América Latina coletados pelo SENTRY e para as principais classes terapêuticas, os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram suscetibilidades de 44,8% ao aztreonam (ATM), 62,5% à cefepima (FEP) e ceftazidima (CAZ), 72,3% à piperacilina/tazobactam (PTZ), 71,9% ao imipenem (IPM) e 74,8% ao meropenem (MEM), todos estes, agentes antimicrobianos pertencentes ao grupo dos betalactâmicos. Para amicacina (AMK), um antimicrobiano representante da classe terapêutica dos aminoglicosídeos, estes isolados apresentaram suscetibilidade de 70,2% e 58,2% à ciprofloxacina (CIP), uma fluoroquinolona. No período de 2002 a 2006, as frequências permaneceram semelhantes para os antimicrobianos AMK, CIP, FEP e CAZ. Para ATM (56,2%) e PTZ (76,6%) houve um aumento significativo da sensibilidade, enquanto que para os antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos IPM e MEM, houve uma diminuição significativa (67,1% e 69,2%, respectivamente) (XAVIER, 2010; ANDRADE *et al.*, 2003). De acordo com os dados do programa MYSTIC – *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*, referentes aos anos de 1997, 2000 e 2005, a suscetibilidade de isolados de *P. aeruginosa* em países europeus também sofreu redução na sensibilidade aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos (MESAROS *et al.*, 2007).

Dados obtidos a partir dos registros de suscetibilidade do Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL, Florianópolis – SC) entre os meses de março a dezembro de 2010, mostram que a suscetibilidade de isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados em

instituições públicas e privadas e de pacientes atendidos em caráter ambulatorial variaram, em média, entre 60 e 70% (Anexos M e N).

2.1.2. Tratamento

A recuperação de um isolado de *P. aeruginosa* de amostras clínicas hospitalares e comunitárias, representa um desafio terapêutico importante para o tratamento das infecções. A seleção de um antimicrobiano apropriado para o início da terapia é essencial para o sucesso da terapia (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; MESAROS *et al.*, 2007; WINN *et al.*, 2006). O documento suplementar M100-S21 (2011) do CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*, o qual, dentre outras informações referentes a padronizações laboratoriais para testes de suscetibilidades aos agentes antimicrobianos, dispõe de um conjunto de agentes indicados para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Os principais agentes antimicrobianos apresentados neste documento e que correspondem aos fármacos de escolha para o tratamento destas são: o monobactâmico ATM; a combinação de betalactâmico com inibidor de betalactamases PTZ; as cefalosporinas CAZ e FEP; os carbapenêmicos IPM e MEM; os aminoglicosídeos AMK e gentamicina (GEN); e a fluoroquinolona CIP. Outros agentes antimicrobianos são indicados apenas em situações diferenciadas, como em infecções do trato urinário ou quando não é recomendado o uso dos agentes supracitados. As polimixinas colistina (COL; polimixina E) e polimixina B estão agrupadas a esses antimicrobianos alternativos e possuem uma importante aplicabilidade clínica sobre estirpes multirresistentes.

2.2. ANTIMICROBIANOS E MECANISMOS DE AÇÃO

Os agentes antimicrobianos interagem de diferentes maneiras com os microrganismos bloqueando o crescimento do patógeno e eventualmente causando a sua morte. A eficácia de um antibiótico depende basicamente de três fatores: atuação específica no alvo molecular, acesso ao alvo dentro do patógeno e a interação do antimicrobiano com o hospedeiro do patógeno (DONADIO *et al.*, 2002).

Até o presente, são descritas cinco modalidades de complexos mecanismos de ação dos antimicrobianos na célula bacteriana: (i) antimicrobianos que interferem na síntese protéica; (ii) que impedem a transcrição de informação genética e replicação do genoma; (iii) que bloqueiam vias metabólicas essenciais; (iv) que atuam na membrana

celular; (v) e os que interferem na síntese do peptidoglicano. Esta última modalidade refere-se especificamente a compostos que inibem a síntese da parede celular bacteriana, estrutura essencial para o crescimento, divisão e integridade celular, implicando na formação de uma parede incompleta e consequentemente, ocasionando a lise da célula bacteriana. Dentre as classes de agentes antimicrobianos que atuam neste metabolismo, o grupo dos betalactâmicos constitui a quase totalidade dos compostos atualmente disponíveis para a prática médica. Esta peculiaridade se deve a alta especificidade e eficácia como inibidores do metabolismo de peptidoglicanos em eubactérias, seu amplo espectro de ação e sua baixa toxicidade (TAVARES, 2009; MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

2.2.1. Antimicrobianos Betalactâmicos

Os agentes antimicrobianos betalactâmicos são caracterizados quimicamente pela presença de um grupamento químico heterocíclico azetidionona, isto é, uma amida cíclica com fechamento na posição “ β ” conhecida como anel betalactâmico. Este anel é responsável pela atividade antimicrobiana desse grupo e media um efeito inibitório específico na biossíntese de componentes estruturais essenciais da parede celular bacteriana. A parede celular da célula bacteriana, tanto Gram-positiva quanto Gram-negativa, possui diversos componentes estruturais, sendo sua camada basal constituída por peptidoglicanos. Os peptidoglicanos formam uma rede polimérica de mucopeptídeos complexos, rígidos, composta por fitas glicosídicas, constituídas por dois açúcares alternados (a *N*-acetilglicosamina o ácido *N*-acetilmurâmico; [NAG-NAM]) e por cadeias peptídicas, estas compostas por quatro peptídeos (*L*-alanina, ácido *D*-glutâmico, *L*-lisina e *D*-alanina), que se entrecruzam conectando-se às fitas glicosídicas (Figura 1). A síntese do peptidoglicano inclui etapas citoplasmáticas, de transporte intermembranar e montagem/remodelagem extracitoplasmáticas. No citoplasma são formadas as unidades dissacarídeas pentapeptídicas compostas pelos açúcares aminados e peptídeos supracitados. A etapa de transporte intermembranar é efetuada pelo sistema transportador representado pelo complexo do lipídio II. A montagem e remodelagem do polímero final são efetuadas através de transferases especializadas. Essas transferases estão localizadas na face externa da membrana citoplasmática e são os alvos farmacológicos dos antimicrobianos betalactâmicos, sendo comumente chamadas PBP's (*Penicillin-Binding Protein*). PBP's são enzimas com funções de

transglicosilação e transpeptidação que atuam montando e/ou remodelando a disposição final do peptidoglicano. As transglicosilases ou glicosiltransferases catalisam o alongamento da cadeia glicosídica $(\text{NAG-NAM})_n$. As transpeptidases ou acil-serina-transferases catalisam ligações peptídicas cruzadas entre as fitas glicosídicas através da ação de um resíduo de serina em seus sítios ativos. Outras duas enzimas complementam a transpeptidação, as carboxipeptidases e endopeptidases. Os antimicrobianos betalactâmicos atuam bloqueando esta terceira etapa da biossíntese do peptidoglicano, isto é, impedem a maturação deste polímero principalmente através do bloqueio da transpeptidação pela inativação das trans-, carboxi-, endopeptidases (Figura 2). A interação covalente entre estas enzimas e os betalactâmicos é proveniente da adição nucleofílica (mecanismo de acilação) a partir do resíduo de serina do núcleo ativo das transpeptidases sobre o anel betalactâmico presente nesses antimicrobianos produzindo compostos estáveis e inativos, ou seja, os antimicrobianos betalactâmicos agem como pseudosubstratos para as PBP's. As PBP's podem ser classificadas como possuindo baixo peso molecular (normalmente não essenciais para o desenvolvimento celular) e com alto peso molecular, estas últimas são consideradas os alvos primários da ação dos betalactâmicos. As espécies bacterianas possuem uma diversidade de PBP's, o que lhes confere suscetibilidades distintas aos diferentes betalactâmicos, já que cada agente antimicrobiano betalactâmico possui afinidade específica por uma ou algumas PBP's apenas. A interação dos betalactâmicos ainda ativa o sistema autolítico das bactérias, o qual contribui para a morte celular. Este sistema autolítico é composto por autolisinas e hidrolases responsáveis pela remoção de peptidoglicano a fim de restaurar o polímero ou permitir que novas moléculas sejam incorporadas durante o crescimento e divisão bacteriana. Por quanto as reações de transpeptidação estejam inibidas pela ação de betalactâmicos, o sistema autolítico fragilizará o peptidoglicano sem que haja restauração do mesmo (TAVARES, 2009; REVELL *et al.*, 2007; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002; WALSH, 2000; GHUYSEN; GOFFIN, 1999; AOKI; OKUHARA, 1980).

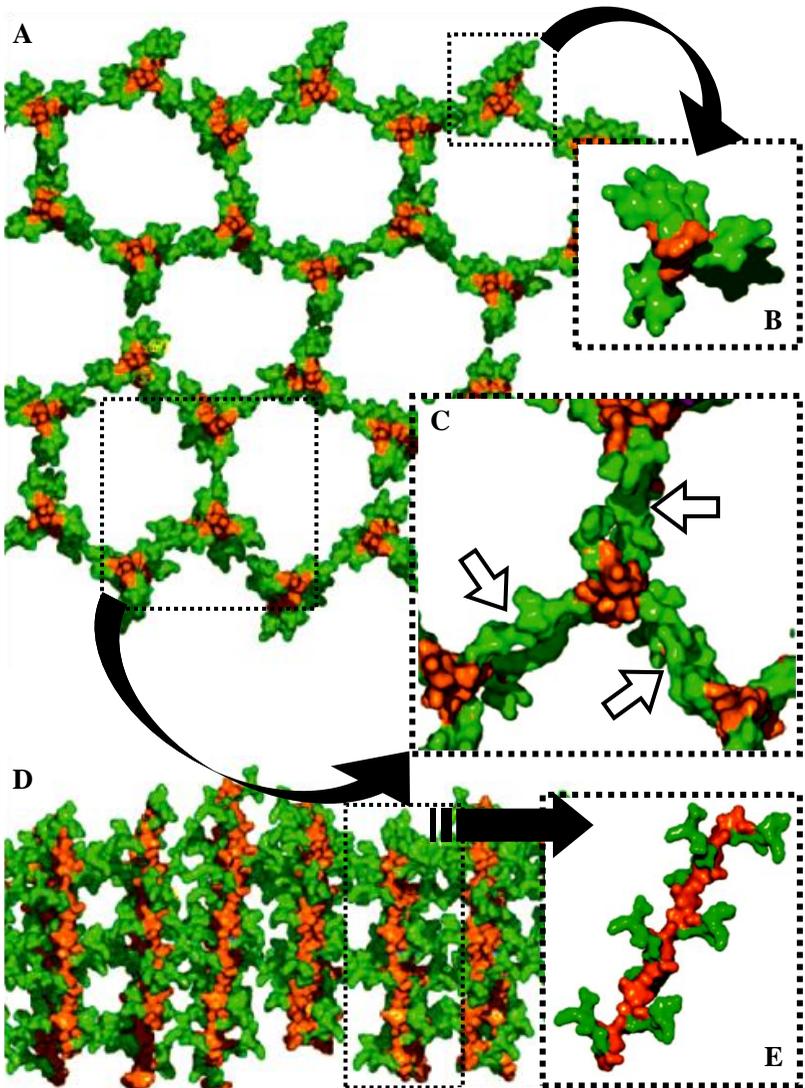


Figura 1 – Estrutura 3D de um segmento do peptidoglicano.

A e B: Vista frontal do modelo da estrutura do segmento de peptidoglicano e um octâmero destacado [NAG-NAM]₈. Estruturas alaranjadas: fitas glicosídicas. Estruturas verdes: cadeias peptídicas. **C:** Destaque das ligações transpeptídicas (setas brancas). **D e E:** Vista lateral do modelo da estrutura do segmento de peptidoglicano e octâmero destacado. Código de cores: igual às ilustrações A e B.

Fonte: Modificado de Meroueh e colaboradores (2006).

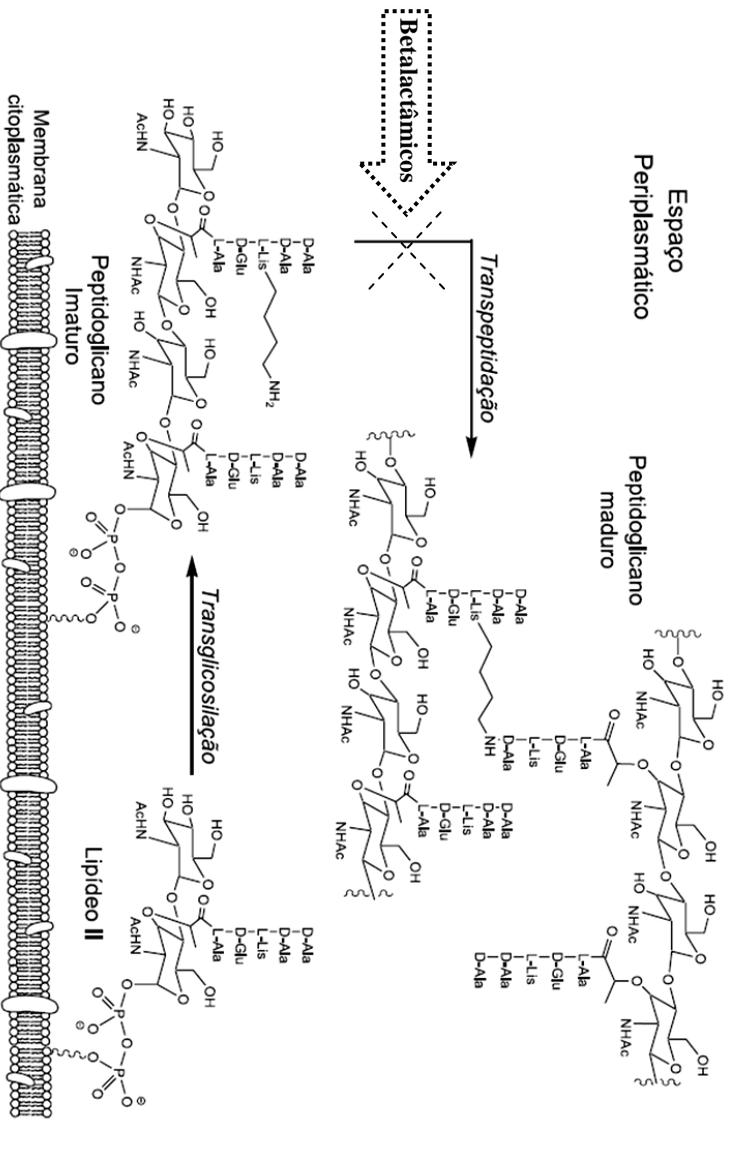


Figura 2 – Montagem do peptidoglicano (etapa extracitoplasmática) e atuação dos antimicrobianos betalactâmicos impedindo a maturação de sua estrutura polimérica (inibição das reações de transpeptidação).

Fonte: Modificado de Silveira e colaboradores (2006).

Os principais agentes antimicrobianos betalactâmicos comercialmente disponíveis atualmente estão dispostos no Quadro 1.

Classe antimicrobiana	Subclasse	Representante(s)
Penicilinas ou Penamas	Penicilinas lábeis	Penicilina G
	Aminopenicilinas	Ampicilina
	Ureidopenicilinas	Piperacilina
	Carboxipenicilinas	Ticarcilina
	Penicilinas estáveis às penicilinases de estafilococos	Meticilina Oxacilina
Betalactâmicos e inibidores de betalactamases		Piperacilina- Tazobactam Amoxicilina- Clavulonato
Ceféns ou Cefemas	Cefalosporinas de 1ª geração	Cefazolina
		Cefalotina
		Cefalexina
	Cefalosporinas de 2ª geração	Cefuroxima
	Cefalosporinas de 3ª geração ou de espectro estendido	Ceftazidima
		Ceftriaxona Cefotaxima
Cefalosporinas de 4ª geração ou de espectro estendido	Cefepima	
Cefalosporinas com atividade anti-MRSA	Ceftarolina	
	Ceftobiprole	
	Cefamicinas	Cefoxitina
Monobactâmicos		Aztreonam
Penéns ou Penemas	Carbapenêmicos	Imipenem
		Meropenem
		Doripenem

Quadro 1 – Agentes antimicrobianos representantes das principais classes dos betalactâmicos.

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina.

Fonte: CLSI (2011), Oplustil e colaboradores (2010), Tavares (2009).

2.2.1.1. Betalactâmicos carbapenêmicos

Esta subclasse dos betalactâmicos caracteriza-se por apresentar um anel pentagonal não-saturado ligado ao anel betalactâmico, diferentemente das penicilinas, premissas deste grupo de antimicrobianos nas quais esta ligação encontra-se saturada. No anel, a ligação dupla está entre os carbonos 2 e 3. O heteroátomo de enxofre também é substituído pelo carbono em relação à molécula original da penicilina e pelo qual estes betalactâmicos denominam-se carbapenemas ou carbapenêmicos. Betalactâmicos carbapenêmicos diferenciam-se ainda das penicilinas através da substituição da cadeia lateral acilamino, que está ligada ao carbono 6 do anel betalactâmico, por uma cadeia hidroxietila, o que lhes confere grande estabilidade na presença da maioria das betalactamases produzidas por bactérias (TAVARES, 2009; SADER *et al.*, 2005b).

Possuem características de elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2) sendo estáveis frente às betalactamases do grupo das penicilinas, betalactamases de espectro estendido (ESBL), cromossômicas (AmpC) e também às oxa-betalactamases (OXA) com características funcionais semelhantes às penicilinas e ESBL. Complementarmente, apresentam excelente permeabilidade através da membrana externa das Gram-negativas. Enfim, os carbapenêmicos apresentam amplo espectro de atividade, tendo sido desenvolvidos com a finalidade de atender as necessidades médicas na terapia de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes a outros betalactâmicos (SAMPAIO, 2007; MENDES *et al.*, 2006).

2.2.2. Antimicrobianos não-betalactâmicos

Outros agentes antimicrobianos não pertencentes ao grupo dos betalactâmicos também são importantes para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. As polimixinas, como a colistina e a polimixina B, apresentam atividade antimicrobiana apenas contra bactérias Gram-negativas, inclusive contra isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes. Estes compostos são catiônicos e possuem afinidade por radicais fosfato presentes nos lipopolissacarídeos da membrana externa aniônica e ao se ligarem a esses radicais, as polimixinas induzem a alterações funcionais que resultam na perda de conteúdo celular e morte da bactéria, isto é, atuam como um efeito detergente e conseqüentemente, o conteúdo da célula sofre extravasamento. A

ciprofloxacina, um representante da classe das fluoroquinolonas, as quais interferem na síntese de ácidos nucleicos inibindo a ação da DNA-girase. Assim, a dupla hélice de DNA não se forma completamente impedindo a replicação do genoma. Já os aminoglicosídeos, como a ampicilina e a gentamicina, atuam inibindo a síntese protéica ao fixarem-se na subunidade 30S dos ribossomos bacterianos e provocar um erro na incorporação de aminoácidos ao peptídeo em formação (TAVARES, 2009; LANDMAN *et al.*, 2008; SAMPAIO, 2007).

2.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA

Segundo Fraimow e Tsigrelis (2011) “resistência é a medida da habilidade reduzida que um agente antimicrobiano tem em matar ou inibir o crescimento de um organismo microbiano”. A resistência reduz as possibilidades de tratamento das infecções ameaçando a aplicação de procedimentos médicos importantes onde complicações infectivas são comuns (MARTINEZ, 2009).

Nos anos que se seguiram à observação dos primeiros microrganismos resistentes recuperados a partir de amostras clínicas, houve um aumento sistemático desse fenômeno em muitas espécies (ENK, 2005; POOLE, 2003; SWARTZ, 2000). Este comportamento não raro dos microrganismos aos fármacos utilizados na clínica direcionou os centros de pesquisa para uma constante procura e desenvolvimento de novos e mais elaborados compostos para o tratamento de infecções bacterianas (O’SHEA; MOSER, 2007; MOIR *et al.*, 1999). Contudo, estatísticas compiladas através dos programas de vigilância de resistência e dados de suscetibilidade em hospitais, onde o fenômeno da resistência é mais frequentemente observado, mostram a emergência de gêneros de bactérias resistentes a diversos, quando não a todos os antimicrobianos utilizados na clínica (MASTORAKI *et al.*, 2008; LOCKHART *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2007).

O uso indevido, indiscriminado e ininterrupto de certas classes de antimicrobianos favorece a seleção de subpopulações bacterianas com sensibilidade reduzida ou resistentes a determinados fármacos (MARTINEZ, 2009; ARIAS; MURRAY, 2009; TACCONELLI *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2006). O grupo dos antimicrobianos betalactâmicos tem sido excessivamente utilizado na clínica moderna e na indústria agropecuária o que favoreceu a seleção de estirpes resistentes aos agentes desse grupo de antimicrobianos e a disseminação de genes que são responsáveis pela expressão desse mecanismo de resistência (XU *et al.*, 2006; MAZEL; DAVIES, 1999).

A resistência adquirida corresponde a uma mudança no fenótipo usual de um determinado microrganismo resultando em diminuição da efetividade de um antimicrobiano anteriormente ativo na população selvagem desta espécie. A resistência adquirida é, portanto, a consequência natural de microrganismos geneticamente adaptados respondendo à pressão seletiva que os agentes antimicrobianos exercem sobre eles. E o que determina este fenômeno é a capacidade que certas bactérias têm em adquirir, manter e necessariamente expressar grupos específicos de genes, capacidade esta, bastante reconhecida em *P. aeruginosa* (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011; STRATEVA; YORDANOV, 2009; WALSH *et al.*, 2005).

2.3.1. Mecanismos de resistência em *P. aeruginosa*

P. aeruginosa figura no grupo das bactérias Gram-negativas como umas das espécies mais hábeis em adquirir e expressar mecanismos de resistência aos antimicrobianos (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Cepas desta espécie são intrinsecamente resistentes a muitos agentes antimicrobianos devido à baixa permeabilidade de sua membrana externa e capacidade de reprimir a expressão de porinas, também devido à expressão constitutiva e induzível de diversas bombas de efluxo e expressão constitutiva e induzível de betalactamase tipo AmpC cromossomal. Aliados a estes naturalmente encontrados, há uma variedade de mecanismos adquiridos que podem ser identificados nesta espécie e muitos deles afetam a suscetibilidade de isolados de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos betalactâmicos (ZAVASCKI *et al.*, 2010 *apud* XAVIER, 2010; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; MESAROS *et al.*, 2007). A associação de mecanismos frequentemente conduz à recuperação de isolados com fenótipos de multirresistência. Conforme Tam e colaboradores (2010), em 33 isolados que apresentaram este fenótipo (21% de 235 isolados recuperados de infecções de corrente sanguínea), 44% apresentavam hiperexpressão de sistemas de efluxo (MexAB-OprM) que lhes conferiam resistência ao betalactâmico carbapenêmico meropenem (MEM). Em todos os 33 isolados foram detectadas mutações em genes que codificam as enzimas Topoisomerase II e/ou IV mediando resistência às fluoroquinolonas. O Quadro 2 resume os principais mecanismos de resistência encontrados em *P. aeruginosa*.

Mecanismos de resistência		Antimicrobianos/Classes ¹							
		PEN	CEF	ATM	IPM	MEM	GEN	AMK	FLQ
Aporte	Porinas²				+	(+)	+	+	
Bombas de efluxo	MexAB	+	+	+			+		+
	MexCD	(+)	+	+			+		+
	MexEF				+	+			+
	MexXY	(+)	+				+	+	+
	MexGH								+
	MexVW								+
Betalactamases	iAmpC³	+	+	+					
	Penicilinas	+	(+)	(+)					
	OXA⁴	+	(+)	+					
	ESBL⁵	+	+	+					
	MBL⁶	+	+		+	+			
AME's⁷	AAC(3)-I							+	
	AAC(3)-II							+	
	AAC(6')-I								+
	AAC(6')-II							+	
	ANT(2')-I							+	
Mutações	Topoisom⁸								+
Proteção	RmtD⁹						+	+	

Quadro 2 – Principais mecanismos de resistência encontrados em *P. aeruginosa* e os grupos ou agentes antimicrobianos afetados.

¹Antimicrobianos ou classes de antimicrobianos: PEN – Penicilinas, CEF – Cefalosporinas, ATM – Aztreonam, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem, GEN – Gentamicina, AMK – Amicacina, FLQ – Fluoroquinolonas.

²Especialmente OprD. ³AmpC cromossômica induzível. ⁴Oxacilinas.

⁵Betalactamases de espectro estendido. ⁶Metalo-β-lactamases. ⁷Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. ⁸Topoisomerases II e IV. ⁹Metilase. “+” – Afetado pelo mecanismo, “(+)” – Moderadamente afetado.

Fonte: Modificado de Strateva e Yordanov (2009), Mesaros e colaboradores (2007) e Doi e colaboradores (2007).

A permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* corresponde a cerca de 1/100 da membrana de *Escherichia coli*. O envelope celular das bactérias Gram-negativas possui duas membranas: a membrana citoplasmática, com composição química essencialmente igual à membrana de Gram-positivas, e uma membrana externa, ainda posterior ao peptidoglicano. Esta segunda membrana é assimétrica e possui uma composição que a torna mais estável. Também é significativamente menos permeável a muitos compostos, inclusive agentes antimicrobianos e é constituída, não por uma bi-camada fosfolipídica como a membrana citoplasmática, mas a face interna é constituída por fosfolipídeos e a face externa desta dupla camada por lipopolissacarídeos (LPS), responsáveis pela estrutura coesa desta membrana. A membrana externa é permeada por uma classe abundante de proteínas triméricas, as porinas. Porinas funcionam como canais que seletivamente compensam a permeabilidade reduzida da membrana externa e consistem usualmente de β -fitas anfipáticas antiparalelas que se montam em formas cilíndricas de β -barris com um interior hidrofílico e exterior hidrofóbico, o qual se combina com os lipídios da membrana (BOS; ROBERT; TOMMASSEN, 2007). As porinas encontradas em *P. aeruginosa* (ex., OprD), assim como em outros gêneros de bactérias Gram-negativas, estão sob controle de mecanismos sensíveis à presença de antimicrobianos, podendo ter sua expressão reprimida, diminuindo ainda mais a permeabilidade a estes compostos. Alterações mutacionais na sequência de aminoácidos da OprD também contribuem para o fenótipo de impermeabilidade inclusive aos carbapenêmicos (principalmente imipenem), entretanto, o estabelecimento de resistência completa a estes fármacos pela atuação deste mecanismo somente é observada em cooperação com a produção de betalactamases (LIVERMORE, 1984 *apud* STRATEVA; YORDANOV, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; MESAROS *et al.*, 2007).

Os principais sistemas de efluxo envolvidos nos perfis de resistência de isolados de *P. aeruginosa* pertencem à família HAE1 (Efluxo Hidrofóbico/Anfipático 1), subclasse da superfamília transportadora RND (*Resistance Nodulation Division*), os quais são formados por três componentes: uma proteína transmembranar situada na membrana citoplasmática, uma proteína transmembranar na membrana externa (semelhantes às porinas) e uma estrutura intermediária interligando ambas. Os sistemas MexAB-OprM, MexXY-OprM e MexCD-OprJ são induzíveis, isto é, estão acopladas a sensores de membrana e sua expressão é aumentada na presença de seus

substratos. MexXY-OprM e MexCD-OprJ, particularmente, serão expressos apenas na presença de seus substratos. MexXY-OprM é expressa constitutivamente e participa da resistência intrínseca desta espécie. O sistema de efluxo MexEF-OprN e a expressão de porinas OprD estão sob a regulação do mesmo promotor e seus genes estão arranjados de maneira inversa, ou seja, quando há a indução da bomba de efluxo a expressão da porina OprD é reprimida. Quando não regulados por tais mecanismos, os sistemas de efluxo podem sofrer hiperexpressão devido a mutações em regiões promotoras/repressoras (*nalB*, *nfxB* e *nfxC* conduzindo à hiperexpressão dos sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN, respectivamente). A afinidade dos substratos em cada família está associada às cargas dos resíduos nos canais internos destas bombas de efluxo e não é raro que possam expulsar simultaneamente classes distintas de antimicrobianos. Portanto, quando um destes sistemas está determinando ou contribuindo para um dado perfil de resistência em um isolado de *P. aeruginosa*, mais de uma classe de antimicrobiano podem ser afetadas pelo mesmo mecanismo. Por exemplo, as fluoroquinolonas são substratos de todas estas bombas de efluxo e o seu uso selecionará isolados também resistentes aos aminoglicosídeos ou betalactâmicos, conforme a preferência de substratos destes sistemas de efluxo (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; MESAROS *et al.*, 2007).

Contudo, o principal papel que as bombas de efluxo desempenham como determinantes de resistência está na cooperação com outros mecanismos, como as alterações de porina e a produção de enzimas (ex., betalactamases). A expressão destes sistemas isoladamente pode conferir resistência moderada aos carbapenêmicos (MexAB-OprM ao meropenem e MexEF-OprN ao imipenem), mas depende da cooperação de outros mecanismos para conferir resistência em altos níveis. Alguns sistemas podem diferenciar substratos quimicamente muito próximos, por exemplo, o sistema MexXY-OprM possui especificidade maior por cefepima que ceftazidima, embora sejam compostos de classes muito similares (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GISKE *et al.*, 2008b).

As fluoroquinolonas, além de afetadas pelos mecanismos de efluxo, deixam de ser ativas contra isolados de *P. aeruginosa* também e primariamente a partir de mutações nas QRDR (regiões determinantes de resistência às quinolonas nos genes *gyrA/gyrB* e *parC/parE*). Estas mutações codificam variações nas enzimas DNA-girase (ou Topoisomerase II) e Topoisomerase IV que não são mais reconhecidas como alvos destes fármacos. Alterações em sítios alvos também são

determinantes de resistência em isolados de *P. aeruginosa* para aminoglicosídeos, o que se dá através da metilação da porção 16S do rRNA através das metilases ArmA e Rmt-(A a D) ou mutações nestas porções (STRATEVA; YORDANOV, 2009; MESAROS *et al.*, 2007; DOI *et al.*, 2007).

Em se tratando de antimicrobianos aminoglicosídeos, são encontradas diversas enzimas modificadoras destes fármacos (AME's) em *P. aeruginosa*. Agindo sobre substituintes específicos da molécula aminoglicosídica, estas enzimas não conferem necessariamente resistência cruzada a todos aminoglicosídeos. Assim, a enzima AAC (3)-I tem atividade específica sobre gentamicina, enquanto que AAC(3)-II, inativa gentamicina, netilmicina e tobramicina. Dentre as AME's identificadas em *P. aeruginosa*, apenas a AAC(6')-I tem atividade sobre amicacina. O aporte reduzido de moléculas de aminoglicosídeos devido à diminuição de porinas também é um mecanismo que frequentemente determina ou contribui para um fenótipo resistente a estes fármacos nesta espécie bacteriana (STRATEVA; YORDANOV, 2009; MESAROS *et al.*, 2007).

A resistência às polimixinas é rara em isolados de *P. aeruginosa* e quando encontrada, o mecanismo determinante é um sistema de duplo componente. Este sistema foi inicialmente descrito em espécies de *Salmonella* e é responsável pela mudança de epítomos nos antígenos celulares deste gênero bacteriano. Neste sistema, duas proteínas transmembranares atuam como sensores das condições iônicas insterciais e ativam uma cascata de eventos que culminam na expressão de lipopolissacarídeos (LPS) modificados. Esta alteração na composição dos LPS conduz a mudanças nas cargas da membrana externa, diminuindo a interação entre esta estrutura e as moléculas de polimixinas (DIXON; DARVEAU, 2005 *apud* XAVIER, 2010).

2.3.1.1. Betalactamases em *P. aeruginosa*

Como os anteriormente mencionados, os mecanismos que afetam os antimicrobianos betalactâmicos são diversos e podem ser intrínsecos ou adquiridos. Brevemente, correspondem aos mecanismos que contribuem com a redução da concentração intracelular destes fármacos através da diminuição ou alteração de porinas e a expressão de sistemas de efluxo; as modificações nas PBP's; a produção de betalactamases; e a cooperação de diversos mecanismos, a qual possui frequentemente um papel importante como determinante de um perfil de resistência aos betalactâmicos. A resistência aos antimicrobianos betalactâmicos em

decorrência de alterações nas PBP's possui um papel pouco importante como determinante de resistência em isolados de *P. aeruginosa*, bem como em outras bactérias Gram-negativas. A expressão diminuída ou alterações na composição de PBP2 (principal alvo dos carbapenêmicos) e PBP3 (alvos das cefalosporinas) requerem maiores dados. Contudo, dentre todos os mecanismos encontrados em bactérias Gram-negativas e também em isolados de *P. aeruginosa*, a produção de betalactamases é o mecanismo mais prevalente e relevante na determinação de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos (Figura 3). Algumas enzimas são capazes de, isoladamente, conferir resistência em altos níveis a todos os betalactâmicos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b).

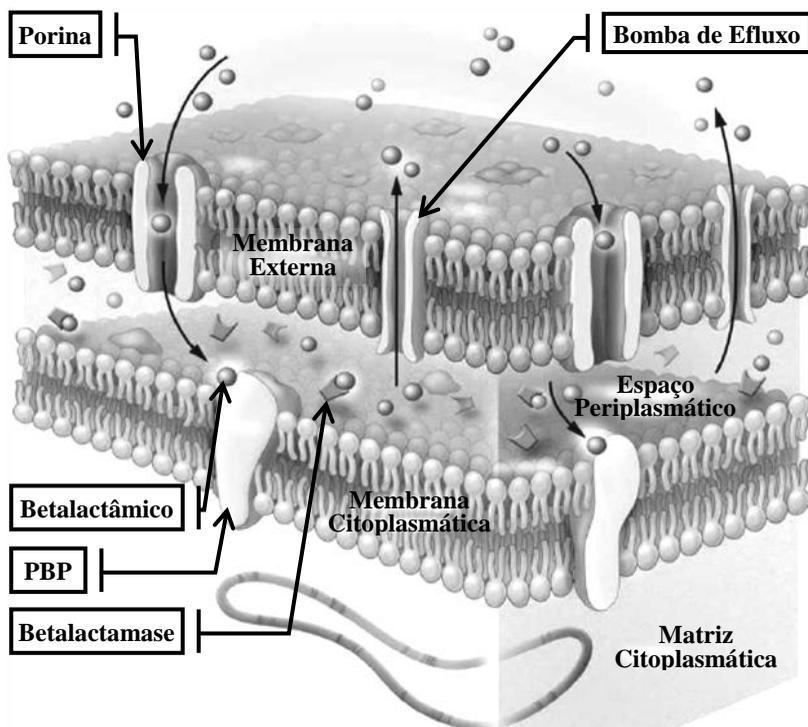


Figura 3 – Ilustração da atuação das betalactamases no espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas.

PBP – *Penicillin-Binding Protein*.

Fonte: Modificado de Picão (2010).

Estas enzimas têm importância crucial nas atenções das ações conjuntas de detecção e manejo de isolados que as produzem, já que o uso de betalactâmicos constitui o regime preferencial no tratamento de infecções por isolados Gram-negativos. Betalactamases são um grupo de enzimas bastante diversificadas e seus genes encontram-se amplamente difundidos em muitos gêneros bacterianos. Os genes de betalactamases podem ser encontrados inseridos no cromossoma bacteriano bem como numa extensa variedade de aparatos genéticos móveis, alguns considerados de alta mobilidade (BUSH; JACOBY, 2010; QUEENAM; BUSH, 2008; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2008; WALSH, 2006; WALSH *et al.*, 2005).

As betalactamases são definidas pelo *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry* como enzimas que catalisam a hidrólise de amidos, amidinas e outras ligações C-N, separando a base do substrato (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Estas enzimas são macromoléculas protéicas com eficiência catalítica elevada. Segundo o índice que mensura esta eficiência (constante de especificidade: K_{cat}/K_m [$M^{-1} s^{-1}$]), as betalactamases são consideradas enzimas “perfeitas”, pois atingem um índice ($> 10^8 M^{-1}s^{-1}$) somente limitado pela difusão das moléculas em meio aquoso (NELSON; COX, 2004; WANG *et al.*, 1999).

A eficácia das betalactamases se deve também às características estruturais presentes apenas em bactérias Gram-negativas. A permeabilidade diminuída da membrana externa aliada ao ambiente onde se encontram as PBP's, alvos dos antimicrobianos betalactâmicos, facilita a atuação das betalactamases. O espaço entre as duas membranas é chamado periplasma ou espaço periplasmático e comporta, além de uma variedade de sistemas protéicos, o peptidoglicano. É neste espaço em que a característica seletividade da membrana externa se combina com a presença concentrada das betalactamases (BOS; ROBERT; TOMMASSEN, 2007). Quando os betalactâmicos atravessam a membrana externa através das porinas de isolados produtores de betalactamases, encontram estas enzimas concentradas no espaço periplasmático e, antes que estes fármacos alcancem seus alvos, isto é, as PBP's dispostas na membrana citoplasmática, deverão superar a ação das betalactamases presentes neste espaço. A atividade das betalactamases está direcionada especificamente à hidrólise do anel betalactâmico destes fármacos, provocando a produção de um composto ácido desprovido de atividade antibacteriana (PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008; MACEDO *et al.*, 2005; YAMAGUCHI *et al.*, 2005; WALSH, 2000).

Devido à grande variabilidade de enzimas, a classificação das betalactamases vem sendo um desafio (JACOBY, 2006; MOLAND *et al.*, 2008). Até o momento foram estabelecidos cinco esquemas de classificação para as betalactamases, sendo que dois destes são os mais utilizados (GARCIA, 2007). Resumidamente, Bush, Jacoby e Medeiros (1995) classificaram as betalactamases segundo suas funcionalidades, isto é perfil de hidrólise sobre os betalactâmicos e perfil de inibição frente a alguns compostos inibidores (Grupos Funcionais de 1 a 4 e subgrupos) e Ambler (1980 *apud* BUSH; JACOBY, 2010) pelas semelhanças estruturais entre elas, dividindo-as em classes moleculares de A a D. Nas classes moleculares, as enzimas estão divididas em dois grupos principais, as serino-betalactamases que possuem um resíduo de serina no núcleo ativo (classes A, C e D) e aquelas dependentes de cátions como co-fator enzimático (classe B), as metalo- β -lactamases (M β L). Assim, através do perfil de inibição destas enzimas as serino-betalactamases são conhecidas pela sua completa ou parcial inibição *in vitro* (algumas também *in vivo*) pelos compostos clavulonato, tazobactam e/ou sulbactam, enquanto que as M β L são comumente classificadas pela sua inibição através do composto ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e insensibilidade com relação aos inibidores referidos anteriormente (BUSH; JACOBY, 2010).

O crescente número de novas enzimas caracterizadas tem exigido constantes atualizações destes esquemas (BUSH; JACOBY, 2010; LIVERMORE, 2008). O endereço eletrônico <<http://www.lahey.org/Studies/>>, mantido pelos autores do esquema de classificação de betalactamases em grupos funcionais, cita uma amostragem de mais de mil enzimas e somente dos principais tipos.

Constitutivamente, isolados de *P. aeruginosa* expressam as betalactamases do tipo AmpC (subtipos PDC-1 a 10), também conhecidas como cefalosporinases e pertencentes ao grupo funcional “1” e classe molecular “C” (BUSH; JACOBY, 2010; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2009 *apud* PICÃO, 2009). Portanto, estas betalactamases são intrínsecas nesta espécie e são codificadas por genes dispostos no seu cromossoma. A expressão de AmpC está acoplada a um sistema induzível e reversível que, quando desreprimido, é capaz de tornar esta espécie resistente a todos os betalactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos. Entretanto, a hiperprodução de AmpC coopera com outros mecanismos (ex., a superprodução de bombas de efluxo, diminuição de porinas OprD e/ou produção de outras betalactamases) para conferir resistência aos carbapenêmicos (STRATEVA; YORDANOV, 2009; THOMSON; BONOMO, 2005).

A espécie *P. aeruginosa* pode expressar uma grande diversidade de betalactamases e alguns isolados produzem simultaneamente mais de um tipo (Quadro 3) (PICÃO *et al.*, 2009).

Grupos Funcionais (BUSH-JACOBY)	Classes Moleculares (AMBLER)	Betalactamases
1	C	AmpC (PDC-; intrínseca)
2a	A	TEM-1, -2, -90, -110 SHV-1
2be	A	PER-1, -2 VEB-1, -2, -3 TEM-4, -21, -24, -42, -115 SHV-2a, -5, -12 GES-1, -2, -5, -8, -9 BEL, LBT 802 CTX-M-1, -2, -43
2c	A	PSE-1, -4 CARB-3, -4, CARB-like AER-1
2d	D	LCR-1, NPS-1 OXA-1, -3, -4, -5, -7, 9, -10, -11, -12, -14, -19, -20, -21, -24/40, -28, -30, -31, -32, -35, -45, -46, -50, -53, -161
2f	A	KPC-2, -5
3	B	IMP-1, -4, -6, -7, -9, -10, -12, -13, -15, -16, -18, -22. VIM-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -11, -13, -15, -16, -17, -18. SPM-1 GIM-1 AIM-1 TMB-1

Quadro 3 – Betalactamases descritas em *P. aeruginosa*.

Fonte: Modificado de Zavascki e colaboradores (2010) *apud* Xavier (2010) e Picão (2009).

Um estudo conduzido com 43 isolados de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima recuperados de infecções da corrente sanguínea, demonstrou-se que em apenas 9% dos isolados a única

betalactamase encontrada foi a naturalmente expressa AmpC. Todas as demais enzimas eram codificadas por genes adquiridos. 63% dos isolados expressavam SPM-1 e 2%, IMP-1, ambas M β L pertencentes à classe molecular B. Da classe molecular A, em 16%, 5% e 5% dos isolados encontrou-se a presença de GES-1 (betalactamase de espectro estendido ou ESBL), CTX-M-2 (ESBL) e GES-5 (serino-carbapenemase), respectivamente (PICÃO *et al.*, 2009).

Nessa espécie, embora sejam encontradas diversas betalactamases com atividade dirigida contra carbapenêmicos (ex., GES-2, GES-5, OXA-24/40, OXA-50, KPC-1 e KPC-2), a quase totalidade de enzimas com estas características corresponde às M β L (ZAVASCKI *et al.*, 2010 *apud* XAVIER, 2010; PICÃO, 2009; PEREZ *et al.*, 2007; SADER *et al.*, 2005a). M β L pertencem ao grupo 3 de Bush e Jacoby (2010) ou B de Ambler (1980 *apud* BUSH; JACOBY, 2010). No estudo supracitado de Picão e colaboradores (2009), dos 30 isolados produtores de carbapenemases (70%), apenas 2 produziam enzimas do tipo serino-carbapenemases (GES-5).

Em isolados de *P. aeruginosa*, a presença de genes que codifiquem betalactamases adquiridas determinando a resistência aos betalactâmicos é persistente. Como exemplo, Pollini e colaboradores (2010) recuperaram 18 isolados de *P. aeruginosa* durante seis anos consecutivos de acompanhamento de um paciente portador da síndrome da mucoviscidose (Fibrose Cística) de um hospital pediátrico na Itália. Pacientes portadores de Fibrose Cística, dentre outras morbidades, apresentam episódios pulmonares obstrutivos muitas vezes exacerbados pela colonização por *P. aeruginosa* e outros microrganismos. Neste relato, em todos os isolados recuperados de *P. aeruginosa* dessa infecção/colonização crônica puderam ser identificados o alelo da betalactamase IMP-13 (*bla*_{IMP-13}; variante alélica da subclasse IMP das M β L), desde o primeiro episódio pulmonar identificado. Adicionalmente, estes isolados eram compatíveis com o principal clone causador de surtos naquele país, bem como em outros países europeus. Este clone carrega um integron classe 1, que além de mobilizar o gene da betalactamase citada, carrega também genes que determinam resistência a outras classes de antimicrobianos (*aacA4*, mediando resistência a aminoglicosídeos, neste caso). A vantagem que estes clones possuem para ocasionar surtos, é que, mesmo com o desuso de antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos, podem ser selecionados de uma forma indireta, ou seja, particularmente com o uso de aminoglicosídeos (MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005).

2.3.1.2. Carbapenemases

As betalactamases com perfil de carbapenemases estão divididas em três famílias moleculares (A, B e D) e distinguem-se pelo mecanismo hidrolítico de seus sítios ativos. As serino-carbapenemases pertencem às classes moleculares A e D e são betalactamases que possuem um resíduo de serina no seu sítio ativo. São usualmente mediadoras de resistência nas *Enterobacteriaceae* (ex., NMC, SME-1, IMI-1, KPC-1, OXA-48 e GES-2) ou *Acinetobacter* spp (ex., OXA 23 a 27, OXA-40 e OXA-48) (QUEENAN; BUSH, 2007). Apesar da avidéz destas enzimas pelos carbapenêmicos, elas nem sempre são capazes de mediar altos níveis de resistência e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico. As serino-carbapenemases possuem maior importância em isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae*, no entanto, um aumento da incidência de outras carbapenemases, as M β L, tem sido descrito recentemente nesta família bacteriana (INGLATERRA, 2011; KUMARASAMY *et al.*, 2010).

Distintamente das serino-carbapenemases, as M β L possuem um ou dois íons metálicos como co-fator catalítico em seu sítio ativo, o qual é mais amplo e maleável, capaz de acomodar um número maior de substratos conferindo a estas enzimas também uma habilidade maior na inativação de antimicrobianos betalactâmicos. Até o momento, são encontradas com maior frequência em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (WALSH *et al.*, 2005; SADER *et al.*, 2005a; MOALI *et al.*, 2003). Como exemplificado pelo trabalho de Picão e colaboradores (2009), o qual foi desenvolvido com isolados brasileiros, nesta espécie e em estirpes multirresistentes, as M β L são não somente as carbapenemases mais prevalentes, mas também as betalactamases mais frequentemente observadas (65%) dentre todas as subclasses de betalactamases.

2.3.1.3. Metalo- β -Lactamases

As M β L são enzimas dependentes de cátions divalentes, usualmente Zn²⁺, como co-fator catalítico em seu sítio ativo e a proximidade a este co-fator permite a outras duas moléculas de água presentes no sítio ativo destas enzimas um ganho de potencial nucleofílico que gera excelente desempenho de hidrólise, sendo capaz de clivar a ligação de amida cíclica do anel betalactâmico de praticamente todos os antimicrobianos betalactâmicos, inclusive dos carbapenêmicos (RICE; BONOMO, 2007). O núcleo das M β L é

considerado extenso e maleável, acomodando a maioria dos substratos betalactâmicos. A subclasse SPM-1 ainda apresenta uma alça flexível próxima ao núcleo, a qual permite que as moléculas dos antimicrobianos betalactâmicos sejam mais bem direcionadas para a atividade hidrolítica do núcleo metálico (WALSH *et al.*, 2005; MOALI *et al.*, 2003). As M β L são insensíveis aos inibidores de betalactamases clavulonato, tazobactam e sulbactam, frequentemente tratados como substratos pobres (BUSH; JACOBY, 2010; WALSH *et al.*, 2005).

A inibição pelo EDTA é uma característica comum às M β L, no entanto, seu emprego é apenas diagnóstico ou para termos de distinção classificatória (BUSH; JACOBY, 2010; MENDES, 2005). Muitos compostos já foram sintetizados objetivando o uso clínico, alguns com potencial promissor, mas não há ainda nenhum inibidor clínico de M β L disponível (PAYNE *et al.*, 2002; NAGANO *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2006).

As M β L não hidrolisam com eficiência o antimicrobiano aztreonam, um agente antimicrobiano também pertencente à classe dos betalactâmicos, embora em estudos de modelos animais com pneumonia causada por *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 (uma subclasse de M β L), a infecção não pôde ser erradicada com aztreonam mesmo em doses elevadas (WALSH *et al.*, 2005). Da mesma maneira, mas considerando a resistência a este fármaco sendo mediada multifatorialmente, o estudo conduzido por Cipriano e colaboradores (2007), no qual foram avaliados os perfis de suscetibilidade de 27 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, observou que 25 destes isolados eram resistentes ao antimicrobiano aztreonam. Todos estes eram produtores de uma subclasse das M β L denominada SPM-1 e pertencentes a um clone responsável pela alta prevalência desta enzima entre isolados desta espécie no Brasil.

Como as demais betalactamases, as metalo- β -lactamases podem ser codificadas por genes situados no cromossoma bacteriano ou em plasmídios. A primeira M β L cromossômica foi descrita em 1966 em um isolado de *Bacillus cereus* (BcII) e mais tarde (1982) em *Stenotrophomonas maltophilia* (L1). A partir de então, diversas outras espécies foram identificadas como produtoras de M β L. Apesar de extensamente estudadas, as M β L presentes no cromossoma bacteriano de *S. maltophilia* e *Bacillus anthracis*, por exemplo, e nas quais lhes conferem resistência intrínseca aos carbapenêmicos, estão presentes em poucos microrganismos de importância clínica. Entretanto, a partir da década de 90 do século passado, M β L codificadas por genes presentes em aparatos móveis, como os plasmídios, passaram a ser identificadas

em diversos gêneros de bactérias Gram-negativas, muitos deles considerados importantes patógenos humanos como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae*. Os genes que codificam MBL adquiridas possuem baixa similaridade com os genes cromossomais não transferíveis. Comparativamente, todas as subclasses transferíveis (pertencentes à classe molecular B1) possuem entre elas uma identidade na composição da sequência primária de aproximadamente apenas 30%, assim como apresentam aproximadamente 25% de identidade quando comparadas as demais MBL não transferíveis (distribuídas entre as subclasses moleculares, B1, B2 e B3) (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; WALSH *et al.*, 2005).

A singularidade bioquímica e estrutural das MBL lhes destaca em posições separadas segundo os esquemas de grupos funcionais de Bush e Jacoby (2010) e de classes moleculares de Ambler (1980 *apud* BUSH; JACOBY, 2010). Respectivamente a estes dois esquemas, o grupo funcional 3 as agrupa pelas semelhanças do perfil de hidrólise e inibição pelo EDTA e a classe molecular B, segundo a similaridade estrutural das metalo-enzimas (Quadro 3, acima). O grupo funcional 3, subdivide as MBL de acordo com a preferência de substratos, isto é, hidrólise preferencial de carbapenêmicos comparados com outros betalactâmicos, sendo que o subgrupo 3a possui um amplo espectro, 3b tem afinidade maior por carbapenêmicos e 3c, embora já classificado separadamente, nas últimas revisões dos esquemas tem sido classificado em conjunto a este. Quanto à inibição da atividade enzimática, outros compostos além do EDTA são conhecidos, como o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) que modifica o sítio ativo dessas enzimas (PAYNE *et al.*, 1997; MENDES, 2005). A classificação das MBL ao nível molecular ou estrutural como o proposto por Ambler (1980 *apud* BUSH; JACOBY, 2010), se mostra complexa devido às grandes diferenças na composição destas moléculas. Embora a estrutura tridimensional destas metalo-enzimas seja similar, isto é, um dobramento $\alpha\beta\beta\alpha$, as MBL diferem significativamente na composição dos aminoácidos e particularmente, nos resíduos envolvidos nas ligações com os substratos. Isto explica as diferenças preferenciais nos perfis de hidrólise destas enzimas, mas também dificulta a correlação da origem destas enzimas em relação às demais betalactamases (WALSH *et al.*, 2005; MOALI *et al.*, 2003). As MBL pertencentes à subclasse B1 compreendem as enzimas codificadas por genes transferíveis (ex., IMP e VIM) e as cromossômicas BcII (exclusiva de *Bacillus cereus*) e CcrA (exclusiva de *Bacteroides fragilis*); as agrupadas na subclasse B2 são derivadas da enzima Sfh-1 da *Aeromonas* spp (incluindo CphA e ImiS) e *Serratia fonticola*; e as

MβL pertencentes à subclasse B3 são a enzima L1 (*Stenotrophomonas maltophilia*) e THIN-B (*Janthinobacterium lividum*) (BUSH; JACOBY, 2010; WALSH *et al.*, 2005; YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

As MβL adquiridas são mobilizadas por plasmídeos e transposons e podem ser encontradas virtualmente em todos os gêneros de bactérias Gram-negativas de maior importância médica. Tais genes que codificam MβL, podem estar situados tanto no cromossoma quanto em plasmídios bacterianos, estando muitas vezes inseridos em integrons especialmente de classe 1 ou ainda, em ilhas de patogenicidade móveis inseridas em plasmídios (particularmente a subclasse SPM-1). Estes aparatos de transferência são capazes de se difundirem intra e alguns interespecificamente e ainda carreiam genes determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos (principalmente aminoglicosídeos, mas também fluoroquinolonas e sulfonamidas) ou biocidas (MENDES *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2005).

Um grande número de genes de MBL, inclusive em isolados de *P. aeruginosa*, que tiveram seus contextos genéticos avaliados (integrons ou plasmídios), encontrava-se associado a um ou mais genes determinantes de resistência, especialmente genes que codificam AME's ou metilases (resistência aos antimicrobianos aminoglicosídeos), mas também relacionado à codificação de proteínas que afetam a permeabilidade celular e sistemas de efluxo (resistência à fluoroquinolonas e betalactâmicos), além de outras betalactamases. Estas associações, ao menos em parte, explicam os casos de multirresistência em *P. aeruginosa* produtoras de MBL (DOI *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2006; MENDES, 2005; SEVERINO; MAGALHÃES, 2002).

Watanabe e colaboradores (1991) descreveram a primeira MβL codificada por genes inseridos em elementos genéticos transferíveis. Pertencente à subclasse IMP, a primeira subclasse de MβL caracterizada foi identificada em um isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperado em 1988 no Japão e o alelo de resistência se encontrava em um plasmídeo conjugativo. Poucos anos depois, o mesmo alelo (*bla*_{IMP-1}) foi identificado inserido em um integron classe 3 e que agora continha genes determinantes de resistência aos antimicrobianos aminoglicosídeos em um isolado clínico de *Serratia marcescens*, uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* (WALSH *et al.*, 2005). O primeiro relato de uma MBL da subclasse IMP no continente americano ocorreu em 2002 onde a enzima (IMP-7) foi identificada em um isolado de *P. aeruginosa* pertencente ao Canadá (GIBB *et al.*, 2002 *apud* MENDES, 2005). Em seguida, Gales e

colaboradores (2003 *apud* MENDES *et al.*, 2006) identificaram um isolado de *Acinetobacter baumannii* produtor de IMP-1 pertencente a cidade de São Paulo, Brasil.

Em 1999, uma segunda subclasse de MBL adquirida foi descrita. A subclasse VIM foi identificada e caracterizada a partir de um isolado de *P. aeruginosa* obtido na Itália e possuía baixa identidade com a subclasse IMP (LAURETTI *et al.*, 1999 *apud* MENDES, 2005). Em 2004, Mendes e colaboradores descreveram as primeiras identificações desta subclasse na América Latina. A partir de amostras encaminhadas para o programa de vigilância epidemiológica SENTRY, três isolados de *P. aeruginosa* recuperadas em 2002 pertencentes à Venezuela e quatro *Pseudomonas* spp. (uma *P. putida* e três *P. aeruginosa*) recuperadas também em 2002, mas no Chile, foram identificados como produtores de MBL adquirida da subclasse VIM (bla_{VIM-2}). No mesmo ano, Toleman e colaboradores (2004 *apud* MENDES *et al.*, 2004a) identificaram e caracterizaram outro isolado de *P. aeruginosa* produtora de MBL nos Estados Unidos e expressando, neste caso, VIM-7.

Desde então, estas duas subclasses, IMP e VIM, passaram a ser descritas em isolados clínicos de todos os continentes do globo e a um número também crescente de variantes alélicas ou subtipos. Aliás, estas duas subclasses possuem uma grande quantidade de variantes alélicas e até o momento, a subclasse IMP apresenta 29 variantes e a subclasse VIM, 27. Variantes da subclasse IMP são mais comumente encontradas em BGN-NF; da subclasse VIM, em microrganismos fermentadores, bem como em BGN-NF. Dada a identificação inicial da subclasse IMP no Japão e por estas enzimas e suas variantes aparentarem estar inicialmente restritas aos países asiáticos, acreditou-se que os genes que codificam tais enzimas tivessem sido disseminados a partir destes países, o que, embora seja difícil de ser mensurado, não se sustentou pelas evidências (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; MENDES *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2005).

A identificação destas enzimas inicialmente em isolados de *P. aeruginosa* corroborou a idéia de que espécies de *Pseudomonas* são um reservatório primário de genes determinantes de resistência aos antimicrobianos. Posteriormente, este fenômeno foi caracterizado através do estudo dos aparatos genéticos móveis e elementos adjacentes aos genes de MBL (MENDES *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2005). Como exemplo, Penteado e colaboradores (2009) caracterizaram um integron (In86) disposto em um plasmídeo carregando um alelo bla_{IMP-1} (além de genes determinantes de resistência a outros grupos de antimicrobianos) em 9 isolados de *Klebsiella pneumoniae* pertencentes a 2 hospitais a

cidade de São Paulo, Brasil. Este integron e outra sequência flanqueada a jusante eram idênticos a outro identificado anteriormente em um isolado de *P. putida* em um terceiro hospital da mesma cidade.

Os genes que codificam a subclasse IMP encontram-se quase sempre inseridos em cassetes gênicos de integrons classe 1, alguns são encontrados em classe 3. A subclasse VIM, que se mostrou inicialmente prevalente nos países da Comunidade Européia onde foram originalmente descritas, mas tornou-se igualmente endêmica e em outros continentes, está associada a cassetes gênicos em integrons classe 1. A combinação destes aparatos com os elementos genéticos onde se encontram inseridos (plasmídios e transposons) são considerados aparatos genéticos de alta mobilidade. A maioria destes integrons é disseminada através plasmídeos entre 120 e 180 kb, embora alguns sejam mobilizados através de transposons somente. A inserção de genes em cassetes gênicos que codificam resistências a outras classes de antimicrobianos (principalmente aminoglicosídeos) é frequente nestes integrons (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; WALSH *et al.*, 2005; GASPARETO, 2005; MENDES, 2005).

A terceira subclasse adquirida descrita, SPM-1, foi identificada em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado em 1999. Através do programa de vigilância epidemiológica SENTRY, esta enzima foi caracterizada e encontrada inserida em um plasmídio de um isolado que fora obtido na cidade de São Paulo, Brasil. Até o momento, esta enzima tem sido descrita apenas em *P. aeruginosa* e sua alta prevalência neste microrganismo se deve a uma expansão clonal pelo território brasileiro. A quarta subclasse, GIM-1, também foi identificada inserida em plasmídios a partir de isolados de *P. aeruginosa*, mas em cepas provenientes da Alemanha. Para ambas as subclasses, as descrições de novos casos permaneceram restritas às regiões originalmente identificadas, com exceção de recente relato de um isolado de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 identificado na Suíça, mas supõe-se que o paciente fora infectado durante sua permanência no Brasil (SALABI *et al.*, 2008 *apud* PICÃO *et al.*, 2009; MENDES, 2005; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; GALES *et al.*, 2003; TOLEMAN *et al.*, 2002).

No Brasil, embora o gene *bla*_{SPM-1} seja citado nas primeiras publicações (TOLEMAN *et al.*, 2002), estudos retrospectivos demonstraram que os genes da subclasse IMP já estavam presentes em cepas de *Acinetobacter* spp. circulantes neste país. Inclusive, o gene *bla*_{IMP-1} foi identificado em 54,8% das amostras de *Acinetobacter* spp. com resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos isoladas em um hospital da cidade de São Paulo no período entre 1993 e 2001.

Algumas descrições subsequentes da subclasse IMP a identificaram em isolados de *P. aeruginosa*, bem como em membros da família *Enterobacteriaceae*, mas principalmente em espécies de *Acinetobacter* spp (MENDES *et al.*, 2006). No entanto e embora ainda existam novos relatos de MBL desta subclasse em espécies de *Acinetobacter*, a realidade atual brasileira e mundial para determinantes de resistência aos carbapenêmicos em espécies de *Acinetobacter* está extensamente mais associada à disseminação de cepas que produzem carbapenemases do tipo OXA à MBL (CAMPANA, 2010). No Brasil, a MBL mais prevalente entre microrganismos membros da família *Enterobacteriaceae* é a subclasse VIM. Mas relatos brasileiros de microrganismos dessa família bacteriana produtores de MBL dessa subclasse ou de outra (IMP) são ainda raros, principalmente ocasionando surtos (PICÃO, 2010).

No mundo, são conhecidas atualmente nove subclasses de MBL adquiridas e disseminadas em patógenos de importância médica: as então já citadas, IMP e VIM, disseminadas em todos continentes; e as subclasses SPM e GIM, bem como as subclasses SIM, AIM, KHM e TBM que aparentam estar restritas a região onde foram inicialmente descritas. Ainda, a subclasse recentemente descrita, NDM, identificada em membros da família *Enterobacteriaceae* e já disseminada em quase todos os continentes (KUMARASAMY *et al.*, 2010; XAVIER, 2010; CAMPANA, 2010; PICÃO, 2010; SEKIGUCHI *et al.*, 2008; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; MENDES *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2005).

Não há padronizações preconizadas para a detecção de MBL pelos documentos utilizados pela maioria dos laboratórios clínicos do Brasil (ex., CLSI e EUCAST). Alguns testes fenotípicos estão descritos na literatura e todos se baseiam no emprego de compostos com propriedades inibitórias sobre as MBL (ex., EDTA e derivados do ácido tiolático, como o ácido 2-mercaptopropiônico – 2-MPA) (MENDES *et al.*, 2006). A maioria dos testes foi desenvolvida sobre metodologias pré-existentes, como a difusão em gel. Nestes casos, a difusão radial sobre um polímero (água), tanto dos agentes antimicrobianos (substratos da enzima MBL), quanto do composto inibidor impregnados em disco de papel, permite a formação de um perímetro que contém a presença de ambos. O princípio destes testes é a observação da restauração da atividade antimicrobiana para os agentes antimicrobianos empregados. Isto se dá através da soma das atuações ou sinergia entre o agente antimicrobiano e o inibidor de MBL, isto é, no perímetro onde há concentrações suficientes de ambos os compostos, o inibidor bloqueia a

atividade da enzima MBL enquanto o agente antimicrobiano, que outrora era inativado pela enzima, atua agora inibindo o crescimento bacteriano. A maioria dos testes fenotípicos descritos emprega a metodologia de disco aproximação (aproximação de um agente antimicrobiano, usualmente ceftazidima e/ou imipenem, ao inibidor; também conhecido como *Double-disk Sinergy Test* - DDST) ou então, discos combinados (*Combined Disk* – CD) (composto inibidor adicionado sobre um agente antimicrobiano, usualmente imipenem) ou ainda, tiras comerciais (Etest®) contendo, numa extremidade, concentrações seriadas (1:2) do agente antimicrobiano imipenem e noutra, concentrações seriadas (1:2) de imipenem com adição contínua de EDTA. Estes testes fenotípicos baseiam-se nos mesmos princípios de testes largamente utilizados em rotinas laboratoriais na detecção de outras betalactamases, como as ESBL (CLSI, 2011; PICÃO *et al.*, 2008; ARAKAWA *et al.*, 2000; JARLIER *et al.*, 1988).

Os primeiros métodos baseados nestes princípios para a detecção fenotípica de MBL foram publicados por Arakawa e colaboradores (2000) e onde, a partir deste, outros estudos ou até mesmo métodos comerciais, propuseram variações destes testes. A maioria dos testes é validada com cepas provenientes da própria região ou países onde foram desenvolvidos, as quais carregam genes que refletem a prevalência de MBL identificadas ali. Alguns destes ensaios apresentam boas sensibilidades e especificidades, porém, o teste desenvolvido por Picão e colaboradores (2008), além de apresentar excelente sensibilidade e especificidade (100% para ambas), foi validado com a maioria das cepas provenientes do Brasil (PICÃO *et al.*, 2008; TAM; PITOUT; GUTTMAN, 2008; SHIN *et al.*, 2008; SAMUELSEN *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2002; ARAKAWA *et al.*, 2000).

Há disponível no mercado uma série de equipamentos semi- ou totalmente automatizados para o desempenho de atividades de rotinas microbiológicas. Como parte de suas análises, estes equipamentos determinam a concentração inibitória mínima (CIM), a qual é a menor concentração de um dado agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de microrganismos e é capaz de avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* deste agente antimicrobiano contra isolados microbianos (CLSI, 2009c). A partir da obtenção das CIM, alguns destes sistemas automatizados podem aplicar um conjunto de regras que correlacionam os resultados das CIM com os fenótipos de resistência conhecidos de microrganismos inclusos em seus bancos de dados. A união destes dados objetiva a detecção de mecanismos de resistência.

Um estudo conduzido por Woodford e colaboradores (2010 *apud* PICÃO, 2010) comparou quatro desses equipamentos automatizados para rotinas microbiológicas, os quais representam os mais utilizados em laboratórios de todo o mundo, quanto as suas habilidades em detectar a produção de carbapenemases. O estudo contou com diversos isolados apresentando resistência ou suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos e incluiu isolados produtores de MBL, isolados produtores de outras carbapenemases e isolados resistentes aos betalactâmicos carbapenêmicos pela atuação de outros mecanismos. Todos os isolados clínicos eram membros da família *Enterobacteriaceae*. As sensibilidades variaram entre 78% e 100% e as especificidades entre 0% e 34%. O equipamento que teve a melhor sensibilidade (100%) obteve a pior especificidade (0%), enquanto que o equipamento que apresentou a melhor especificidade (34%) obteve, agora, a pior sensibilidade (78%) e justamente por ter falhado em detectar todos os isolados produtores de MBL. Segundo esta avaliação, embora úteis, esses equipamentos carecem melhorias na detecção e endereçamento das carbapenemases como mecanismos mediadores de resistência em carbapenêmicos.

Em outro estudo, realizado por Pasteran e colaboradores (2011) e agora envolvendo apenas um dos equipamentos avaliados no estudo anterior, o sistema Vitek® 2 (bioMérieux, França) que antes apresentou a pior resultado de sensibilidade (78%) foi novamente desafiado quanto a sua habilidade de prever a presença de carbapenemases. O princípio de detecção deste equipamento, à semelhança dos demais avaliados anteriormente, está baseado nos valores obtidos das CIM durante os ensaios, as quais são comparadas a um banco de dados que contém a distribuição média das CIM de cepas com fenótipos de resistência conhecidos. A partir desta comparação, um conjunto de regras é aplicado, conhecido como AES (*Advanced Expert System*), o qual categoriza a probabilidade do fenótipo testado. O sistema Vitek® 2 monitora a cinética do crescimento microbiano e calcula as CIM através de um algoritmo próprio, mas assim como os demais equipamentos automatizados disponíveis, não utiliza inibidores seletivos de MBL (como EDTA ou 2-MPA) para a avaliação dos fenótipos de resistência (PASTERAN *et al.*, 2011; SOLOAGA, 2010; JOYANES *et al.*, 2001). Segundo os autores desse estudo, o qual contou com isolados bacterianos apresentando características de suscetibilidade semelhantes ao estudo comparativo de Woodford e colaboradores (2010 *apud* PICÃO, 2010), o AES predisse a presença de carbapenemases em 42 (76%) dos 55 isolados membros da família *Enterobacteriaceae*, ou seja,

um resultado muito semelhante ao estudo anterior. E novamente, apenas 25% das enterobactérias produtoras de MBL foram identificadas. Contudo, a partir das CIM obtidas neste último estudo, os autores puderam estabelecer um fluxograma capaz de identificar a produção de carbapenemases nesses isolados e com sensibilidade de 98%, especificidade de 94%, valor preditivo positivo de 95% e negativo de 98%. Quando as CIM de uma cepa teste se enquadram nos critérios do fluxograma sugerido, este direciona o microbiologista a outros testes confirmatórios. Embora este estudo confirme a utilidade de tal sistema automatizado, ainda não há estudos avaliando as habilidades de detecção MBL ou outras carbapenemases em isolados de *P. aeruginosa* em qualquer equipamento automatizado para rotinas microbiológicas.

Apesar da inabilidade, através de seus próprios sistemas, em indexar corretamente a presença de MBL como mecanismo determinante de resistência aos carbapenêmicos, estes equipamentos são capazes de determinar as CIM de isolados de *P. aeruginosa* com uma acurácia adequada. Em suas análises, o sistema Vitek® 2 obteve em média 97,6% (64 – 100%) de concordância entre as CIM obtidas para 138 isolados de *P. aeruginosa* quando comparados com um método de microdiluição padrão, isto nas 885 combinações possíveis entre isolados e antimicrobianos (OTO-KARG *et al.*, 2009). Segundo Joyanes e colaboradores (2001), dentre 146 isolados de *P. aeruginosa* com diferentes perfis de suscetibilidade, a comparação das CIM obtidas para diversos agentes antimicrobianos pelo equipamento e o método padrão concordou em média 90,2% (84,2 – 98,6%) das vezes. Neste estudo, em isolados que apresentavam resistência simultânea aos betalactâmicos ceftazidima (CAZ) e ao betalactâmico carbapenêmico imipenem (IPM), houve em média 89,1% (80,9-100,0%) de concordância entre todos os antimicrobianos testados, mas 95,2% para CAZ e 90,5% para IPM. Em outro estudo que avaliou as CIM obtidas pelo sistema Vitek® 2 em 15 isolados de *P. aeruginosa* com resistência simultânea a CAZ e IPM, a concordância para ambos antimicrobianos foi de 100% e igualmente para outros dois antimicrobianos não betalactâmicos, gentamicina (GEN) e ciprofloxacina (CIP). Neste estudo, todos os isolados de *P. aeruginosa* produziam a subclasse de MBL, VIM-2. Para o antimicrobiano meropenem (MEM), outro betalactâmico carbapenêmico testado, foi de 93,3% e houve uma tendência a CIM mais elevadas para aztreonam (AZT) e CIM reduzidas para piperacilina/tazobactam (PTZ) (MAZZARIOL *et al.*, 2008).

Também são descritas uma série de padronizações moleculares para a detecção de MBL ou outras carbapenemases em diversos

microrganismos (CAMPANA, 2010; PICÃO, 2010; MENDES *et al.*, 2007).

2.3.1.4. Metalo- β -lactamases em isolados de *P. aeruginosa* recuperados no Brasil

No Brasil, três subclasses de MBL em isolados de *P. aeruginosa* têm sido descritas até o momento: SPM-1, algumas variantes alélicas da subclasse IMP e VIM-2 (PICÃO *et al.*, 2009).

Segundo os dados mundiais do programa de vigilância bacteriana SENTRY, entre os anos de 1998 e 2003 de um total de 95 microrganismos Gram-negativos obtidos e identificados como produtores de MBL através deste programa, 74 (77,9%) isolados pertenciam ao gênero *Pseudomonas* spp. (72 *P. aeruginosa* e apenas 2 *P. fluorescens*). 24 (32,4%) destes isolados eram provenientes do Brasil e pertenciam as subclasses e suas variantes IMP-1 (1; *P. fluorescens*), IMP-16 (1; *P. aeruginosa*) e SPM-1 (22; *P. aeruginosa*) (FRITSCHKE *et al.*, 2005).

Como exemplo da diversidade destas enzimas em isolados de *P. aeruginosa* brasileiros, Sader e colaboradores (2005a) recuperaram 183 isolados de *P. aeruginosa* a partir pacientes com infecções de corrente sanguínea (ICS) de um hospital de São Paulo, SP, entre 2000 e 2001. Deste total, 82 (44,8%) eram resistentes ao carbapenêmico imipenem (IPM) e em 43,9% (36/183) destes isolados resistentes (19,7% do total da amostragem), foi identificada a produção de MBL através de DDST. A tipagem molecular lhes agrupou em diversos ribogrupos, sem uma predominância visível. E a amplificação dos alelos gênicos destes isolados produtores de MBL demonstrou a presença da subclasse SPM-1 (55,6%; 20/36), VIM-2 (30,6%; 11/36) e IMP-1 (8,3%; 3/36). Dois isolados, embora identificados com produção presuntiva de MBL, não amplificaram produto algum (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}). A suscetibilidade apresentada por estes isolados produtores de MBL variou em torno de 30% para aztreonam (ATM), piperacilina/tazobactam (PTZ) e amicacina (AMK) e ficou abaixo de 15% para os demais agentes antimicrobianos testados, com exceção de Colistina (COL) que apresentou 100% de sensibilidade.

A subclasse SPM-1 é claramente predominante no Brasil e tem sido descrita neste país desde 2002. A presença desta enzima foi descrita principalmente em isolados da região Sudeste, nas cidades de São Paulo, Santo André, Sorocaba, Rio de Janeiro, mas ultimamente também em outras regiões do país, como nas cidades de Brasília, Goiânia, Salvador,

Fortaleza, Recife, São Luís, João Pessoa, Porto Alegre, Novo Hamburgo, Caxias do Sul, Londrina, Curitiba, Maringá, Blumenau (dados não publicados) e Florianópolis (SCHEFFER *et al.*, 2010; ZANOL; PICOLI; MORSCH, 2010; XAVIER, 2010; WIRTH *et al.*, 2009; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; MENDES *et al.*, 2006; SANTOS FILHO, 2002).

Magalhães, Lins e Magalhães (2005) analisaram 24 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a IPM e em 15 (62%) destes a presença de MBL foi identificada através de testes fenotípicos (DDST e/ou CD). Todos eram sensíveis à polimixina B e ATM. Dos 15 isolados produtores apenas 11 foram selecionados para avaliações genotípicas e todos amplificaram o alelo *bla*_{SPM-1} inserido em plasmídios. A jusante deste, uma região comum (*common regions*; CR4) incluindo uma sequência (*orf495*) que pode ser a responsável pela mobilização e expressão do gene *bla*_{SPM-1}. Portanto, os genes que codificam a subclasse SPM-1 não são encontrados em integrons, mas estes genes e os genes adjacentes a eles encontram-se usualmente inseridos em uma ilha de patogenicidade móvel situada em um plasmídeo de aproximadamente 180 kb. A região adjacente (*in tandem*) é conhecida como “*common region*” ou elementos CR (particularmente, CR4) e constituem os elementos genéticos transponíveis responsáveis pela mobilização dos genes de SPM-1 (WALSH *et al.*, 2005; POIREL *et al.*, 2004 *apud* MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005).

Contudo, a presença de integrons de classe 1, embora sem genes inseridos que codificam esta ou outra subclasse de MBL, mas contendo genes determinantes de resistência a outros grupos de antimicrobianos (principalmente aminoglicosídeos, mas também betalactamases) é comum ao menos em unidades hospitalares de tratamento intensivo (SEVERINO; MAGALHÃES, 2002). Nestes ambientes, integrons de classe 1 são encontrados com frequência de até 100% em isolados de *P. aeruginosa* produtoras de MBL conforme Carvalho e colaboradores (2006) e com frequência de até 42% em isolados não produtores, mas que apresentam fenótipo de multirresistência, conforme Fonseca e colaboradores (2005).

No Brasil, embora em alguns estudos esta não seja uma característica evidente para muitos isolados, foi demonstrado por Gales e colaboradores (2003) e posteriormente por outros autores de outros estados brasileiros que investigaram isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e produtores de SPM-1, que boa parte destes isolados pertencia a um mesmo ribogruppo (72-3) e perfil eletroforético (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE), isto é, um

clone denominado “clone SP”. A este clone pertencia o primeiro isolado de *P. aeruginosa* caracterizado como produtor de SPM-1 e passou a ser identificado em diversas regiões brasileiras.

O estudo de Gales e colaboradores (2003), que contou com a participação de 12 laboratórios ligados a hospitais dos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Distrito Federal, Bahia e Ceará, identificou 43 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao IPM durante 5 meses do ano de 2002 onde 39,5% (17 isolados) pertenciam ao mesmo ribogruppo, o qual somente não foi identificado em isolados de Minas Gerais. Dentre toda a amostragem, 15 isolados (35%) eram produtores de MBL da subclasse SPM-1 e todos pertenciam ao mesmo clone. Outro estudo (dados não publicados) realizado pelo mesmo grupo, contou com a participação de maior número de laboratórios brasileiros (25 centros médicos, inclusive Florianópolis através da participação do Laboratório Médico Santa Luzia). Dentre 206 isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos betalactâmicos carbapenêmicos obtidos entre 2001 e 2003, a produção de SPM-1 pôde ser identificada em 82 (40%) e 52 destes (52/82; 63,5%) pertenciam ao mesmo ribogruppo (72-3) e perfil eletroforético.

Estes dois estudos evidenciaram a presença deste clone em regiões brasileiras geograficamente não relacionadas, mas não em Florianópolis. Adicionalmente, 1,5% dos isolados (3/206) produziam IMP-1 e não pertenciam ao mesmo clone. E apesar da produção de MBL, 24,1 % dos isolados permaneceram suscetíveis a PTZ e 57,8% a ATM. A identificação de perfis de multirresistência também foi frequente, menos de 10% dos isolados se apresentaram suscetíveis à AMK, gentamicina (GEN) e ciprofloxacina (CIP), mas todos foram suscetíveis a COL.

Carvalho e colaboradores (2006) publicaram seu estudo que identificava 13 isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1, os quais pertenciam também a este clone. Esses isolados foram recuperados entre 2000 e 2001 de pacientes de um hospital da cidade do Rio de Janeiro (RJ) e representaram 20% (13/65) do total de *P. aeruginosa* resistentes ao IPM. Todos apresentaram ampliações para *bla*_{SPM-1}, bem como para um integron de classe 1 que possuía genes determinantes de resistência aos antimicrobianos aminoglicosídeos e outra betalactamase. A suscetibilidade a ATM foi de 76,9% e a PTZ, de 46,2%. Todos os demais betalactâmicos se apresentaram resistentes (ceftazidima [CAZ], cefepima [FEP] e meropenem [MEM]). Estes isolados ainda apresentaram 30,8% de sensibilidade a AMK. Todos os produtores de MBL foram resistentes a GEN e CIP.

Cipriano e colaboradores (2007) identificaram através dos perfis eletroforéticos obtidos, que 27 dos 108 isolados de *P. aeruginosa* coletados entre 2000 e 2003 em São Luís (MA) pertenciam ao clone SP. Todos expressavam SPM-1 e eram sensíveis somente a COL, com exceção de 2 isolados deste grupo que também se apresentaram suscetíveis a ATM.

O clone SP também foi identificado por Scheffer e colaboradores (2010) em isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 disseminados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), Florianópolis, SC. Em 29 isolados apresentando resistência aos betalactâmicos carbapenêmicos, a presença de MBL pôde ser observada em 7 (24%) destes através das metodologias fenotípicas (DDST e/ou CD). 6 destes isolados foram identificados como produtores de SPM-1 e todos pertenciam ao mesmo clone brasileiro identificado pelo seu padrão de PFGE. Outros 11 isolados foram agrupados a este perfil eletroforético, mas não produziam qualquer MBL. O isolado restante e pertencente a outro grupo eletroforético era produtor de outra subclasse, a IMP-16, já detectada anteriormente em Brasília, DF (MENDES *et al.*, 2004b). Todos os isolados positivos foram sensíveis à PTZ, além de polimixina B e apresentaram sensibilidade intermediária ao ATM. Outra informação relevante que pôde ser extraída deste estudo foi a observação do aumento da frequência de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos em isolados de *P. aeruginosa* no HU-UFSC, a qual passou de 13% para 44% entre 2003 e 2005.

A presença do clone SP em todo o extenso território brasileiro talvez se deva por este ser mais bem adaptado para disseminação entre indivíduos suscetíveis de ambientes nosocomiais. Esta hipótese explicaria sua expansão por áreas geograficamente não relacionadas e demonstra a necessidade de ações que previnam o avanço destes organismos. Este clone pode estar sendo disseminado via hospedeiros comunitários, fatores ambientais, ou ainda através de alguma fonte comum desconhecida, já que a correlação com pacientes de ambientes nosocomiais geograficamente não relacionados não pôde ser estabelecida (SCHEFFER *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2006; GALES *et al.*, 2003). A presença deste clone pôde ser descrita em outros países de diferentes continentes conforme Fonseca, Freitas e Vicente (2010), contudo sem evidenciação da presença da MBL SPM-1. Neste trabalho, outra ferramenta foi aplicada para a identificação da correlação dos isolados (*Multilocus Sequence Type* - MLST) e o resultado pôde ser comparado com outras sequências depositadas em um

banco global. O clone SP, ou a sequência ST 277, foi identificado em 27 isolados de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes do Rio de Janeiro, RJ, e São Luís, MA. Estes isolados eram sensíveis somente a colistina (COL) e todos produziam SPM-1. A mesma sequência de MLST (ST 277) foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* obtidos na Áustria, China e Austrália, mas a presença de SPM-1 não foi avaliada nestes isolados.

Segundo Zavascki e colaboradores (2005), de 135 isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, obtidos durante o ano de 2004 em um hospital de Porto Alegre, RS, 35 foram selecionados para a detecção de MBL e 27 (77,1%) isolados foram presumivelmente produtores da enzima através de DDST. Em 26 destes isolados a subclasse SPM-1 pôde ser verificada. De um isolado não se obteve produtos de amplificação, embora tenha se utilizado os iniciadores para *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. A relação entre os isolados produtores de SPM-1 demonstrou-se ser clonal, mas não foi comparada ao clone SP. O mesmo grupo de Porto Alegre avaliou 92 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a CAZ e/ou IPM em outros dois hospitais da mesma cidade entre 2003 e 2004. Martins e colaboradores (2007) obtiveram 33 (35,9%) isolados com produção presuntiva de MBL através de DDST, destes, 18 corresponderam à subclasse SPM-1 e 5 à IMP-1. 10 isolados não amplificaram produto algum (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}).

Ainda no Estado do Rio Grande do Sul, Gräf, Fuentefria e Corção (2008) avaliaram 46 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a IPM obtidos durante cinco meses do ano de 2007 a partir de um hospital da cidade de Passo Fundo. Através de testes fenotípicos (DDST e/ou CD), 37 isolados foram triados para a avaliação molecular. Destes, apenas 5 isolados foram identificados como produtores da subclasse SPM-1, embora os iniciadores para as três subclasses encontradas no Brasil (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}) tenham sido utilizados. Outro estudo conduzido por Wirth e colaboradores (2009) também identificaram a presença de MBL através de métodos fenotípicos (Etest®) em 8 de 31 (25,8%) isolados de *P. aeruginosa* resistentes a IPM recuperados de duas regiões distintas desse Estado (região metropolitana de Porto Alegre e região dos Vales dos Sinos). Apenas 6 isolados amplificaram para o alelo *bla*_{SPM-1} e os dois restantes, embora testados genotipicamente para este alelo e outros dois (*bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}), não obtiveram amplicons.

A observação de isolados de *P. aeruginosa* presumivelmente produtores de MBL através de testes fenotípicos, mas que não obtêm produtos de amplificação com iniciadores das três subclasses presentes

em outras descrições brasileiras, isto é, SPM-1, variantes alélicas de IMP-; e variantes alélicas de VIM-, sugerem a presença de outras subclasses de MBL, talvez ainda não caracterizadas, em isolados de *P. aeruginosa* no território brasileiro (MARTINS *et al.*, 2007). Contudo, em alguns destes estudos em que a detecção fenotípica da produção de MBL não correspondeu a amplicons de genes que as codificam, deve ser também considerado o fato que algumas das metodologias fenotípicas utilizadas foram metodologias anteriores as mais recentes modificações e validações encontradas na literatura. Para estudos que utilizaram o teste sugerido por Arakawa e colaboradores (2000), deve-se considerar que apenas três isolados de espécies de *Pseudomonas* (produtoras de IMP) foram utilizados para a validação do teste. Ainda, os efeitos inibitórios do crescimento bacteriano provocados pela utilização de EDTA podem produzir resultados falsos positivos, inclusive na metodologia comercial (Etest®) utilizada em alguns estudos para a pesquisa de isolados produtores de MBL (CHU *et al.*, 2005).

Como citado anteriormente, os genes das subclasses IMP e VIM encontram-se usualmente inseridos em integrons (WALSH *et al.*, 2005) e, apesar de menos prevalentes quando comparadas à disseminação da subclasse SPM-1, a identificação das subclasses IMP e VIM em isolados de *P. aeruginosa* constitui uma ameaça diferenciada, já que podem ser transferidas lateralmente. Isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos expressando as subclasses IMP e VIM têm sido descritos no Brasil desde 2004. Foram isoladas espécies de *Pseudomonas* contendo genes que codificam a subclasse IMP e suas variantes alélicas primeiramente no Distrito Federal e, então, nos estados de São Paulo, Bahia, Rio Grande do Sul e outros (XAVIER, 2010; MARTINS *et al.*, 2007; FRITSCHÉ *et al.*, 2005). Como já citado, um isolado de *P. aeruginosa* produtor de IMP-16 foi descrito em Florianópolis mais recentemente (SCHEFFER *et al.*, 2010).

Isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos expressando a subclasse VIM são também raramente descritos no Brasil. Em 2005 (a), o estudo já citado de Sader e colaboradores descreveu a presença da enzima VIM-2 em isolados desta espécie resistentes aos carbapenêmicos pertencentes à cidade de São Paulo. Outro isolado com estas mesmas características foi descrito no mesmo estado em 2006 (XAVIER, 2010).

A pertinência dos achados destas subclasses (IMP e VIM) se deve à alta mobilidade de seus genes. Como o relatado por um terceiro estudo do grupo de pesquisadores de São Paulo, SP, supracitado. Este trabalho avaliou 120 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a IPM,

correspondentes apenas aos 10 primeiros isolados mensais do ano de 2004 de um único hospital de São Paulo, SP (mesmo hospital avaliado por Sader e colaboradores [2005a]). Este estudo objetivou identificar a presença de elementos genéticos de alta mobilidade carreando genes de MBL, em detrimento de plasmídios de alto peso molecular e mobilidade restrita. Após a avaliação da atividade hidrolítica destes isolados sobre o carbapenêmico IPM, todos os 46 (38,1%; 46/120) isolados que possuíam atividade compatível com MBL corresponderam a ampliações de genes destas enzimas. 37 ampliações corresponderam ao alelo *bla*_{SPM-1} e 9 ao *bla*_{IMP-1}. Nestes últimos 9 isolados, a caracterização do elemento genético em que seus genes de MBL estavam inseridos, corresponderam a um integron de classe 1. Embora este estudo não tenha especificado a que clone pertenciam os isolados produtores de SPM-1, a tipagem molecular os relacionou com alta proximidade. Enquanto que os produtores de IMP-1 pertenciam a 5 perfis eletroforéticos, bem como ribogrupos distintos. A disseminação clonal de genes como os da subclasse SPM-1 pode ser mais bem combatida através de medidas de controle de infecção hospitalar, no entanto, para a dispersão de genes de MBL intra- e interespecies através de elementos de elevada mobilidade, como os integrons identificados neste estudo, as ações tomadas pelas comissões que se ocupam desse controle podem não ser eficazes (TAKANO *et al.*, 2005).

Esta probabilidade de transferência interespecies já foi confirmada, inclusive no Brasil pelo estudo já citado publicado por Penteadó e colaboradores (2009). Outras evidências, embora conduzidas *in vitro*, também dão suporte a este fato (SENDA *et al.*, 1996).

Embora as subclasses IMP e VIM sejam raramente descritas no Brasil, sua presença em isolados de *P. aeruginosa*, bem como em outros BGN-NF, é preocupante, uma vez que podem ser transmitidas para membros da família *Enterobacteriaceae*. Infecções causadas por estes microrganismos são muito mais frequentes em qualquer ambiente, conforme evidenciado por relatórios epidemiológicos (CAMPANA, 2010; PICÃO, 2010; XAVIER, 2010; WINN, Jr. *et al.*, 2006; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002;).

2.4. IMPACTO CLÍNICO DE ISOLADOS DE *P. AERUGINOSA* PRODUTORES DE MBL

O principal impacto clínico da presença de MBL em isolados de *P. aeruginosa* pode ser estabelecido pelo aumento da mortalidade de pacientes hospitalizados quando comparado às infecções causadas por

isolados desta espécie que não produzem esta enzima. Entre os fatores de risco que estão associados ao aumento dos índices de mortalidade, relacionam-se a severidade das infecções causadas por microrganismos produtores de MBL; seus frequentes perfis de multirresistência associados; e a demora da implementação de antibioticoterapia adequada (ZAVASCKI *et al.*, 2006a; SOULI *et al.*, 2008).

No período de 2004 e 2005 foram examinados 150 pacientes em dois hospitais de Porto Alegre, RS, com pneumonia adquirida em ambiente hospitalar causada por *P. aeruginosa*. Em 28% (42 de 150 isolados) das amostras detectou-se a presença de MBL. A mortalidade geral associada à pneumonia foi de 37,3% (56 de 150 pacientes), ou seja, quando englobados todos os pacientes infectados por *P. aeruginosa* produtoras e não produtoras de MBL. Enquanto que a mortalidade foi significativamente maior (57,1%; 24/42) em infecções causadas por isolados produtores de MBL, quando comparada com a mortalidade das infecções causadas pelos não produtores (29,6%; 32/108). E agregando um valor ainda maior ao impacto clínico da presença de MBL, a avaliação dos índices de mortalidade entre as pneumonias associadas à ventilação mecânica alcançou 60,0% (33 de 55) de mortalidade geral, ou seja, em todos os pacientes com esta morbidade. O índice foi significativamente maior (77,3%; 17/22) quando as infecções eram causadas por isolados produtores de MBL, comparado com (48,5%; 16/33) quando os mesmos não produziam esta enzima (ZAVASCKI *et al.*, 2006b). Em outro estudo objetivando a associação de índices de mortalidade elevados devido à presença de MBL, Marra e colaboradores (2006) relacionaram episódios de infecções da corrente sanguínea ocasionadas por isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL com índices de mortalidade de 71,4% dentro dos 14 primeiros dias após a recuperação destes microrganismos. O índice de mortalidade intra-hospital total entre os pacientes com estas infecções, isto é, sem o critério restritivo dos primeiros 14 dias, alcançou 85,7%. Em ambos os estudos, conclui-se que o principal fator associado à mortalidade era a terapia empírica inicial inapropriada.

De maneira geral, o impacto econômico e clínico gerado pela resistência bacteriana aos antimicrobianos é visível e facilmente mensurável. A seleção quase inevitável de microrganismos resistentes ou menos susceptíveis, especialmente isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL, pode ser relacionada à exposição prévia aos antimicrobianos betalactâmicos, particularmente carbapenêmicos e cefalosporinas. Esta exposição mostrou-se um importante fator de risco aos elevados índices de mortalidade ou severidade das infecções

causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes produtoras de MBL, bem como associada à aquisição de infecções por cepas multirresistentes mediada por outros mecanismos (AKINCIA *et al.*, 2005; ZAVASCKI *et al.*, 2006c; MARRA *et al.*, 2006; FALAGAS; KOPTERIDES, 2006).

Por outro lado, a seleção de cepas produtoras de MBL também pode estar associada à utilização prévia de outros antimicrobianos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Como anteriormente referendado, os genes mediadores de resistência a estes agentes antimicrobianos podem estar presentes nos mesmos elementos móveis que contém as MBL e/ou em outros elementos genéticos simultaneamente presentes no isolado. Ou ainda, através da seleção de isolados pela resistência cruzada entre os agentes antimicrobianos citados, já que para alguns mecanismos, mais de uma classe de antimicrobianos pode estar inclusa em seus escopos de atuação (LISTER *et al.*, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; SOULI *et al.*, 2008). Em um estudo conduzido com 85 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes obtidos de pacientes de unidades de tratamento intensivo, demonstrou-se que 63% dos isolados carregavam genes determinantes de resistências diversas associados a integrons de classe 1 (SEVERINO; MAGALHÃES, 2002), o que ocorre também em outros ambientes hospitalares (FONSECA *et al.*, 2005). Genes que codificam MBL das subclasses IMP e VIM estão usualmente inseridos em cassetes gênicos de tais elementos móveis. Também, integrons desta classe estão amplamente disseminados em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes que expressam MBL da subclasse SPM-1 (CARVALHO *et al.*, 2006; WALSH, 2006; TAKANO *et al.*, 2005).

Outros fatores de risco relevantes, levantados por estes estudos que avaliaram o valor nocivo da presença de MBL, foram o tempo de permanência estendido, com o aumento da probabilidade de novas e mais severas infecções e os consequentes custos adicionais; e a passagem dos pacientes pelas unidades de tratamento intensivo em instituições hospitalares identificadas como reservatórios destes microrganismos resistentes (AKINCIA *et al.*, 2005; ZAVASCKI, 2006ab; SOULI *et al.*, 2008).

Através destas últimas justificativas, isto é, sob o ponto de vista do impacto clínico da presença de *P. aeruginosa* em infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* e, tendo em vista a importância que esta espécie apresenta como patógeno hospitalares (GIAMARELLOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; GILLHAM *et al.*, 2009; MESAROS *et al.*, 2007; WINN *et al.*, 2006); por esta espécie ser intrinsecamente resistente a diferentes agentes antimicrobianos e por ser capaz de

adquirir e expressar novos genes determinantes de mecanismos de resistência, inclusive a antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos (STRATEVA; YORDANOV, 2009; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GIAMARELLOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; THOMSON; BONOMO, 2005); dada a relevância que os antimicrobianos carbapenêmicos possuem no tratamento empírico de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes e a subsequente dificuldade de tratamento de isolados de *P. aeruginosa* não susceptíveis a estes fármacos para estas situações (MIYAJIMA *et al.*, 2008; MASTORAKI *et al.*, 2008; GIAMARELLOU, KANELLAKOPOULOU, 2008; MESAROS *et al.*, 2007; ZAVASCKI *et al.*, 2006b; MARRA *et al.*, 2006); pela eficiência hidrolítica que as betalactamases do tipo MBL, as quais podem ser adquiridas por esta espécie, apresentam sobre todas as subclasses de betalactâmicos, particularmente sua predileção pelos betalactâmicos carbapenêmicos (LISTER *et al.*, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; MESAROS *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2005); por esta espécie ser considerada um reservatório primário de genes determinantes de resistência aos antimicrobianos (NORDMANN *et al.*, 2011a; WALSH *et al.*, 2005); tendo ainda em vista a capacidade de disseminação das MBL, seja em surtos clonais desta espécie ou em isolados microbianos Gram-negativos de diversos gêneros e espécies, inclusive membros da família *Enterobacteriaceae*, os quais, em última instância, são os principais patógenos humanos (NORDMANN *et al.*, 2011ab; SCHEFFER *et al.*, 2010; XAVIER, 2010; PENTEADO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2005; WALSH, 2006; GALES *et al.*, 2003; WINN, Jr. *et al.*, 2006; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002); a dificuldade de diagnóstico de isolados produtores destas enzimas, e consequentemente subestimação epidemiológica pelos laboratórios de rotina microbiológica dos serviços de saúde (PICÃO *et al.*, 2008; CHU *et al.*, 2005); a ausência de inibidores destas enzimas disponíveis para uso clínico (PAYNE *et al.*, 2002; NAGANO *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2006); dados os supracitados índices elevados de mortalidade associados a presença destas enzimas, o tempo de permanência intra-hospitalar aumentado e os custos adicionais envolvidos (SOULI *et al.*, 2008; ZAVASCKI *et al.*, 2006a; MARRA *et al.*, 2006); e a probabilidade de associação com perfis de multirresistência (CARVALHO *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2005; TAKANO *et al.*, 2005), faz-se necessária a investigação da ocorrência de MBL em isolados clínicos desta espécie bacteriana com perfis multirresistentes, especialmente resistentes aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos, obtidos em serviços

microbiológicos de saúde na região metropolitana de Florianópolis (SC), para que, nas instituições em que são encontrados, sejam desenhados novos estudos capazes de determinar a real prevalência destes isolados produtores de MBL e a partir destes, sejam implementadas ações capazes de impedir o avanço de surtos clonais de *P. aeruginosa* multirresistentes e o avanço da resistência aos antimicrobianos determinada por genes inseridos em elementos genéticos capazes de serem transferidos entre bactérias distintas (GIAMARELLOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; HELFAND; BONOMO, 2005).

3. METODOLOGIA

3.1. AMOSTRAGEM

Entre os meses de outubro de 2008 e dezembro de 2009, foram selecionados 42 isolados clínicos multirresistentes consecutivos e não repetidos de *Pseudomonas aeruginosa*. O tamanho e as características do grupo amostral utilizado neste estudo objetivaram apenas a identificação de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes que pudessem produzir metalo-enzimas determinando a resistência aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos, não permitindo, portanto, a avaliação de índices de prevalência.

Os isolados de *P. aeruginosa* obtidos para este estudo foram isolados de materiais clínicos coletados de pacientes atendidos em oito instituições distintas (hospitais públicos e privados, clínicas privadas e postos de coleta ambulatoriais) da região metropolitana de Florianópolis (SC), as quais foram encaminhadas para análises na rotina bacteriológica do Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL), situado nesta mesma cidade (Anexo A).

Após as análises microbiológicas dos serviços prestados pelo LMSL, os microrganismos passaram a integrar seu banco de cepas.

3.1.1. Identificação

Os isolados de *P. aeruginosa* foram caracterizados fenotipicamente ao nível de espécie através dos métodos bacteriológicos convencionais (WINN, Jr. *et al.*, 2006; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002) e/ou automatizados (cartão de identificação bacilos Gram-negativos – GN, VITEK[®] 2; bioMérieux, França).

3.1.2. Difusão em gel

A determinação da suscetibilidade à ocasião da identificação destes microrganismos foi realizada na rotina bacteriológica do LMSL através da metodologia de difusão em gel, particularmente disco difusão, segundo a padronização e os critérios interpretativos preconizados pelos documentos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2009a; CLSI, 2009b; CLSI, 2008).

Assim, discos de papel impregnados com os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, England) (Tabela 1) foram dispostos em uma placa de 150 mm de diâmetro contendo ágar de Muller-Hinton (MHA; bioMérieux, França) previamente inoculada com a cepa teste. O inóculo para esta metodologia consistiu de uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente $1-2.10^8$ UFC/ml (correspondente a avaliação visual do tubo 0,5 da escala de McFarland), a qual foi obtida a partir da suspensão em salina estéril de colônias características de *P. aeruginosa* diretamente do crescimento em AS (incubadora microbiológica, em ar atmosférico; $35 \pm 2^\circ\text{C}/18-24\text{h}$). A distribuição do inóculo padronizado em toda a superfície das placas contendo MHA foi realizada com o auxílio de uma haste de algodão estéril. Os testes foram incubados (incubadora microbiológica, em ar atmosférico; $35 \pm 2^\circ\text{C}/18-24\text{h}$) e o diâmetro dos halos de inibição foram medidos em milímetros. Os valores obtidos foram avaliados segundo os critérios estabelecidos para a interpretação de suscetibilidade de isolados de *P. aeruginosa* a cada antimicrobiano testado, determinando qualitativamente a sensibilidade (S), sensibilidade intermediária (I) ou resistência (R) a estes fármacos (CLSI, 2009a; CLSI, 2009b; CLSI, 2008). Estes critérios, bem como os antimicrobianos testados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Agentes antimicrobianos testados e critérios interpretativos aplicados para o teste de disco difusão em gel.

Agente Antimicrobiano	Concentração ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	Interpretação dos halos (mm)		
		S	I	R
Piperacilina/tazobactam	100/10	≥ 18	-	≤ 17
Aztreonam	30	≥ 22	16-21	≤ 15
Ceftazidima	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefepima	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Imipenem	10	≥ 16	14-15	≤ 13
Meropenem	10	≥ 16	14-15	≤ 13
Amicacina	30	≥ 17	15-16	≤ 14
Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Ciprofloxacina	5	≥ 21	16-20	≤ 15

Fonte: Modificado de CLSI (2009b) e CLSI (2008).

3.1.3. Critérios de seleção

Aqueles microrganismos que, durante os testes de suscetibilidade à ocasião de seus isolamentos, apresentaram-se resistentes aos agentes antimicrobianos carbapenêmicos imipenem (IPM) e meropenem (MEM), bem como a cefalosporina de 3ª geração ceftazidima (CAZ) e ainda, apresentaram um perfil de suscetibilidade multirresistente, foram segregados. Um perfil multirresistente foi definido como não suscetível a três ou mais classes distintas de antimicrobianos, incluindo-se entre elas, a classe dos carbapenêmicos e das cefalosporinas de 3ª geração (TAM *et al.*, 2010). A observação de resistência aos betalactâmicos IPM, MEM e CAZ condiz com o perfil de hidrólise de metalo- β -lactamases (TOLEMAN *et al.*, 2002).

3.1.4. Armazenamento

Os isolados selecionados foram subcultivados em ágar base para ágar sangue adicionado de 5% de sangue de carneiro (AS – HiMedia, Índia ou AS – bioMérieux, França) e suspensos em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI – *Brain and Heart Infusion*, Bacto™/BD. Sparks, MD, EUA) adicionado de 15% (v/v) de glicerol (Vetec Química Fina, 99,5%) e armazenados em congelador elétrico (U6785 – *New Brunswick Scientific*) a -80°C para a estabilização de suas características genéticas (PETTI; CARROLL; REIMER, 2007).

3.2. SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DE *P. AERUGINOSA* AOS ANTIMICROBIANOS

3.2.1. Cepas Bacterianas

3.2.1.1. Isolados de *P. aeruginosa*

Previamente à utilização nos testes, os isolados de *P. aeruginosa* preservados sob criogenia foram reativados através de um subcultivo AS ou caldo BHI. O controle da pureza das culturas também foi realizado em AS (CLSI, 2009a).

3.2.1.2. Cepas de referência

Para o controle de qualidade dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram utilizadas cepas provenientes da *American Type*

Culture and Collection (ATCC) - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Escherichia coli* ATCC® 35218 conforme os critérios de qualidade preconizados pelo documento suplementar M100-S21 do CLSI (CLSI, 2011).

Como controles positivos nos testes de detecção de metalo- β -lactamases (M β L) foram utilizadas cepas de *P. aeruginosa* bla_{SPM-1} e *P. aeruginosa* bla_{VIM-2}, ambas cedidas e molecularmente caracterizadas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC/ALERTA, UNIFESP/EPM (SP). Como controle negativo para este teste, foi utilizado a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

3.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) objetivou ratificar os resultados obtidos pela metodologia de difusão em gel e avaliar quantitativamente a suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos testados (CLSI, 2009c). A determinação da CIM foi realizada de forma automatizada para todos os antimicrobianos testados e também através da metodologia convencional para o aztreonam.

Os antimicrobianos testados para a determinação da suscetibilidade das cepas utilizadas neste estudo, foram aqueles contidos no cartão AST-N105 (Vitek 2 Compact®, bioMérieux, França), o qual se constitui de um conjunto de antimicrobianos que contempla as principais classes indicadas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* (CLSI, 2011). O cartão AST-N105, aliado ao sistema automatizado de identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos para rotinas microbiológicas, Vitek 2 Compact®, desempenha testes de suscetibilidade para, dentre outros antimicrobianos, os betalactâmicos PTZ, ATM, CAZ, FEP, IPM e MEM; os aminoglicosídeos AMK e GEN; a fluoroquinolona CIP; e a polimixina Colistina (COL; Polimixina E). Foram observados os critérios de seleção de agentes antimicrobianos primários e complementares para testes e notificação clínica, contidos no documento suplementar M100-S21 (2011) do CLSI. Conforme orientação do fabricante (bioMérieux, 2008), as suscetibilidades para o antimicrobiano aztreonam dos isolados deste estudo, foram também determinadas através de uma metodologia alternativa (microdiluição em caldo convencional).

3.2.2.1. Método automatizado

Esta metodologia foi realizada através do uso de cartões de avaliação de suscetibilidade AST-N105 do sistema de identificação e avaliação de testes de suscetibilidade de isolados clínicos Vitek 2 Compact® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Utilizou-se esta metodologia para definir a CIM de nove dos dez antimicrobianos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 – Antimicrobianos testados, concentrações empregadas e intervalos de CIM calculadas disponíveis no Cartão de Suscetibilidade para Gram-Negativos AST-N105 (Vitek 2 Compact®, bioMérieux, Marcy L'Etoile, França).

Agente Antimicrobiano	Concentrações ¹ (µg/ml)	Intervalo da CIM ² (µg/ml)	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Cefepima	2, 8, 32	1	64
Ceftazidima	1, 2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	0,5, 2, 4	0,25	4
Colistina	4, 16, 32	0,5	16
Gentamicina	4, 16, 32	1	16
Imipenem	2, 4, 16	1	16
Meropenem	0,5, 4, 16	0,25	16
Piperacilina/Tazobactam	4/4, 16/4, 32/4, 64/4	4	128

¹Concentrações de cada antimicrobiano no interior dos cartões AST-N105.

²Limites do intervalo das CIM estabelecido pela metodologia do sistema automatizado Vitek® 2.

Fonte: bioMérieux, 2008.

Esse sistema utiliza a metodologia de microdiluição em caldo, a qual é capaz de determinar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um isolado microbiano através da obtenção da CIM. A CIM foi considerada a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu o crescimento visível de cada microrganismo (CLSI, 2009c).

Para a realização dos testes, foi obtido um inóculo padronizado do microrganismo, através do uso de turbidímetro próprio (Densi-Check®), conforme as recomendações do fabricante. A suspensão de microrganismos foi introduzida automatizadamente em cartões AST-N105, os quais contêm três ou quatro concentrações distintas dos antimicrobianos indicados. O monitoramento da cinética do crescimento

microbiano foi automatizadamente realizado em cada concentração dos antimicrobianos através de leituras de absorbância. Subsequentemente, a cinética do crescimento da cepa nas concentrações de antimicrobianos indicadas foi calculada e comparada a um banco de dados de valores de cinética para cepas com CIM conhecidas, obtendo-se desta forma, o valor da CIM da cepa em teste dentro dos limites estabelecidos por esta metodologia. Estes valores foram todos disponibilizados pelo sistema (PASTERAN *et al.*, 2011; SOLOAGA, 2010; JOYANES *et al.*, 2001).

Adicionalmente, através da utilização do conjunto de regras de interpretação de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, o *Antimicrobial Expert System* (AES) disponibilizado pelo sistema, os resultados obtidos referentes às CIM foram então avaliados de acordo com alguns critérios, como: classe do antimicrobiano, mecanismos de resistência encontrados em *P. aeruginosa* e pontos de corte estipulados (Tabela 3). Essas regras são periodicamente atualizadas e a combinação das CIM obtidas, com a interpretação das regras e em comparação com perfis conhecidos, permitiu classificar os isolados como sensível (S), de sensibilidade intermediária (I) ou resistente (R) aos antimicrobianos testados, além de probabilizar a presença dos mecanismos de resistência envolvidos na determinação do perfil de suscetibilidade através da avaliação do fenótipo apresentado (PASTERAN *et al.*, 2011; SOLOAGA, 2010).

Tabela 3 – Critérios interpretativos usados para distinguir a susceptibilidade de estirpes de *P. aeruginosa*.

Agente Antimicrobiano	Interpretação da CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
Amicacina ¹	≤ 16	32	≥ 64
Aztreonam ¹	≤ 8	16	≥ 32
Ceftazidima ¹	≤ 8	16	≥ 32
Cefepima ¹	≤ 8	16	≥ 32
Ciprofloxacino ¹	≤ 1	2	≥ 4
Colistina ¹	≤ 2	4	≥ 8
Gentamicina ¹	≤ 4	8	≥ 16
Imipenem ¹	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem ¹	≤ 4	8	≥ 16
Piperacilina/Tazobactam ²	$\leq 16/4$	-	$> 16/4$

Fonte: ¹Tabela 2B-1 do documento suplementar CLSI M100-S21 (2011) e ²Tabela *Pseudomonas* sp. do documento EUCAST v1.1 (2010).

3.2.2.2. Método convencional

Esta metodologia foi utilizada para avaliação da suscetibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* ao antimicrobiano Aztreonam. Para isso, a partir da suspensão bacteriana do crescimento de cada isolado em caldo BHI (incubadora microbiológica, em ar atmosférico; $35 \pm 2^\circ\text{C}/24\text{h}$), obteve-se um inóculo padronizado após o ajuste desta suspensão. O ajuste foi calculado para que o inóculo contivesse aproximadamente 1.10^7 UFC/ml, tendo como base as leituras de absorbância de uma suspensão correspondente a 0,5 da escala de McFarland ($A = 0,08 - 0,11$). As leituras de absorbância da suspensão de cada isolado foram realizadas em leitora de microplacas (KCjunior™, Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, VT, U.S.A.) em 630 nm. 5 µl do inóculo foram dispensados em orifícios de uma placa de microdiluição (96 orifícios), a qual previamente continha 95 µl de dez concentrações seriadas (\log_2 ; 0,125 – 64 µg/ml) do agente antimicrobiano aztreonam (Azanem®; Biochimico®, Brasil), solubilizadas em caldo Muller-Hinton (Difco/BD; Sparks, MD, EUA). Após a incubação do teste (incubadora microbiológica, em ar atmosférico; $35 \pm 2^\circ\text{C}/24\text{h}$), a CIM foi considerada como sendo a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento da cepa em teste (CLSI, 2009c). Os testes foram realizados em duplicata e a interpretação dos resultados obedeceu aos mesmos critérios interpretativos dispostos na Tabela 3 (acima).

3.3. DETECÇÃO FENOTÍPICA DA PRESENÇA DE METALO- β -LACTAMASES

Para a detecção da produção de M β L nos isolados de *P. aeruginosa*, foi aplicado o Teste de Sinergismo de Disco Duplo (DDST – *Double Disk Sinergy Test*) utilizando o composto ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) como inibidor seletivo de metaloenzimas. O princípio desta detecção se baseia na alteração do sítio ativo de M β L causada pelo composto 2-MPA. Essas enzimas, uma vez bloqueadas pela ação do 2-MPA, deixarão de exercer suas ações catalíticas sobre a CAZ, um dos substratos das M β L. Desta forma é possível visualizar a restauração da atividade deste antimicrobiano através da inibição do crescimento bacteriano (PICÃO, 2008; ARAKAWA *et al.*, 2000; PAYNE *et al.*, 1997).

O princípio do DDST é a mesma utilizada para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos da metodologia de disco difusão em

gel, descrita anteriormente. Assim, baseia-se na difusão radial de ambos os compostos impregnados em discos de papel filtro, isto é, o inibidor 2-MPA e o agente antimicrobiano CAZ. A aproximação dos discos é uma maneira de permitir que o perímetro entre eles apresente concentrações dos dois compostos e é nesta região que ocorre o sinergismo das ações de ambos. Ou seja, nos isolados de *P. aeruginosa* em que a resistência a CAZ é mediada por hidrólise enzimática, o composto 2-MPA bloqueará seletivamente a catálise de M β L, mas não de outras betalactamases. Como consequência deste bloqueio, há a restauração da atividade antimicrobiana da CAZ, a qual inibirá o crescimento bacteriano nesta região de sinergia e este feito, por sua vez, é observado (Figura 4) (PICÃO *et al.*, 2008; ARAKAWA *et al.*, 2000; JARLIER *et al.*, 1988).

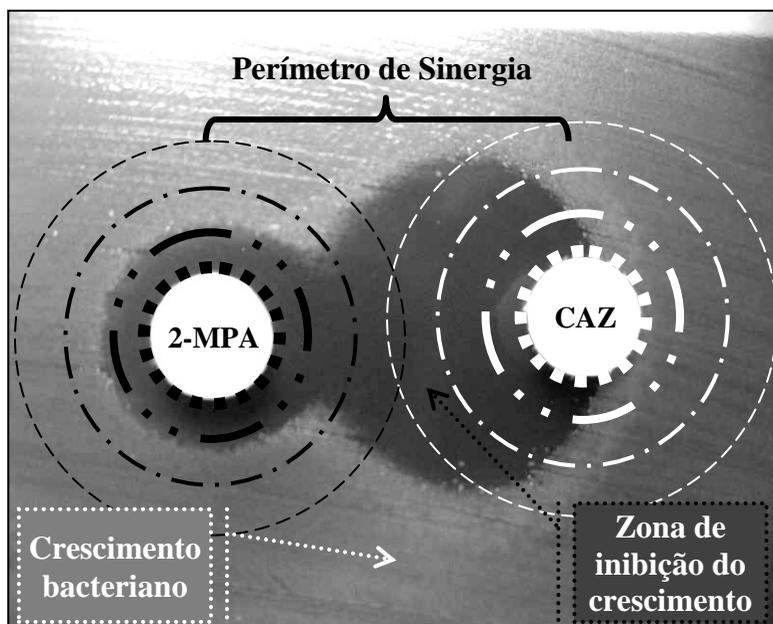


Figura 4 – Ilustração das atuações sinérgicas do composto inibidor 2-MPA e do agente antimicrobiano CAZ sobre a inibição do crescimento bacteriano em isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L nos DDST.

Círculos concêntricos pretos – Difusão radial do composto inibidor 2-MPA.
 Círculos concêntricos brancos – Difusão radial do agente antimicrobiano CAZ.
 DDST – *Double-Disk Sinergy Test*. 2-MPA – Ácido 2-mercaptopropiônico.
 CAZ – Ceftazidima.

Em cada teste, dois discos de papel filtro, um acrescido de 10 μ l (1:16; 0,6690 M) do composto 2-MPA (95,5%, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) e outro impregnado com 30 μ g de CAZ (Oxoid, Basingstoke, England), foram dispostos a uma distância entre eles de 2,0 cm sobre uma placa de 90 mm de diâmetro contendo MHA (Difco/BD; Sparks, MD, EUA) previamente inoculada com uma suspensão do microrganismo teste. A obtenção e padronização desta suspensão, bem como a incubação dos testes obedeceram às mesmas preconizações descritas para a metodologia de difusão em gel (PICÃO *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2007).

Os testes foram realizados em duplicata e o resultado foi considerado positivo quando se observou uma distorção (aumento direcional) do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de CAZ ou quando o sinergismo das ações destes agentes permitiu a observação do aparecimento de uma zona de inibição do crescimento bacteriano entre os dois discos (PICÃO, 2008).

3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A presença dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1} foi investigada nos isolados de *P. aeruginosa* através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os iniciadores: SPM-1 F CCTACAATCTAACGGCGACC e SPM-1 R TCGCCGTGTCCAGGTATAAC para a amplificação de um fragmento de 650 kb e os iniciadores IMP-1 F TGAGCAAGTTATCTGTATTC e IMP-1 R TTAGTTGCTTGGTTTTGATG para a amplificação de um fragmento de 740 kb (QUEENAN; BUSH, 2007).

Para isso, cada isolado armazenado sob criogenia foi subcultivado em AS em ar atmosférico a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24h e parte da massa celular de cada cultura foi adicionada a 500 μ l de água ultrapura estéril até a formação de uma suspensão de aspecto denso. As suspensões, acondicionadas em microtubos, foram homogeneizadas em agitador do tipo vortex e os microtubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após este período, os microtubos foram submetidos a banho de gelo por 5 minutos para promover a lise das células bacterianas e então, centrifugados por 10 minutos a 11000 rpm. O sobrenadante de cada microtubo, contendo o DNA extraído, foi transferido para outro microtubo e congelado a -20°C até o momento do uso (FRESCHI; CARVALHO; OLIVEIRA, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2004). Anteriormente à preservação, o sobrenadante teve sua concentração de DNA determinada (Nanodrop 2000c[®]; Thermo

Scientific) e então, o mesmo foi diluído em tampão Tris-EDTA (TE) a fim de obter-se a concentração final de 50 ng/μL.

As reações em cadeia da polimerase foram executadas pelos termocicladores PCR Express® (Thermo Hybaid) e MJ96G® (Biocycler). Para as reações, foram utilizados 2,0 μl de cada amostra de DNA extraído e 50 ng/μl de cada iniciador (1 μl), ambos adicionados à solução tampão 10X (TBE, 10 μM) (Fermentas), 10 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (0,625 μl de cada) (Ludwig Biotec), 3 mM de MgCl₂ (Fermentas), 1 U μl de Taq®-DNA polimerase (Fermentas) e água, totalizando 25 μl. As condições para a amplificação do alelo *bla*_{SPM-1} foram: desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos a 95°C por 1 min, 40°C por 1 min, 68°C por 1 min, e extensão final a 68°C por 5 min. E as condições seguidas para a amplificação do alelo *bla*_{SPM-1} foram: desnaturação e extensão final iguais ao anterior, porém 35 ciclos a 94°C por 1 min, 61°C por 1 min e 72°C por 1 min (SCHEFFER, 2008).

Os produtos das reações (10 μL) foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE e a 5V/cm por uma hora. Os géis foram corados pelo brometo de etídio a 0,5 μg/ml, fotografados utilizando transiluminador UV e comparados com seus respectivos controles e marcador de peso molecular (Ladder 100 pb – Ludwig Biotec) (SCHEFFER, 2008).

As cepas controle utilizadas para o processo de detecção dos genes de MβL foram *P. aeruginosa bla*_{SPM-1} e *P. aeruginosa bla*_{IMP-1}, ambas cedidas e molecularmente caracterizadas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC/ALERTA, UNIFESP/EPM (SP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESPÉCIMES CLÍNICOS

Foram selecionados para este estudo 42 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. Para a seleção destes isolados foram aplicados critérios que os incluíssem dentro de perfis de suscetibilidade compatíveis com isolados produtores de metalo- β -lactamases (M β L) e que os caracterizassem como multirresistentes. A seleção de isolados de *P. aeruginosa* simultaneamente resistentes aos betalactâmicos carbapenêmicos imipenem (IPM) e meropenem (MEM), além da cefalosporina de espectro estendido (3ª geração) ceftazidima (CAZ), é compatível com a presença de M β L, já que a caracterização bioquímica das três subclasses de M β L encontradas no Brasil (SPM-1, IMP- e VIM-) inclui em seus escopos de hidrólise os três agentes supracitados (SADER *et al.*, 2005a; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; TOLEMAN *et al.*, 2002). Para que estes isolados fossem enquadrados no segundo critério, isto é, apresentar um perfil de multirresistência, esses deveriam ser resistentes a pelo menos uma terceira e distinta classe de antimicrobianos. Para tanto, foi observado que todos se apresentaram resistentes ao menos a um dos seguintes agentes antimicrobianos: ureidopenicilina piperacilina combinada com o inibidor de betalactamases tazobactam (PTZ); monobactâmico aztreonam (ATM); cefalosporina de espectro estendido (4ª geração) cefepima (FEP); fluoroquinolona ciprofloxacina (CIP); aminoglicosídeos amicacina (AMK) e/ou gentamicina (GEN).

Os isolados caracterizados acima foram recuperados de materiais clínicos obtidos de diversos sítios anatômicos de pacientes oriundos de sete instituições públicas e privadas e de pacientes atendidos em caráter ambulatorial pelo Laboratório Médico Santa Luzia de Florianópolis, SC (LMSL). As distribuições dos isolados entre estes materiais estão apresentadas no Gráfico 1 e a procedência dos pacientes, isto é, as instituições ou ambientes onde se encontravam à ocasião da coleta do material clínico, está apresentada no Gráfico 2. De acordo com esta procedência, 92,9% (39/42) dos isolados foram recuperados de materiais clínicos coletados de pacientes em ambientes hospitalares, dos quais, 74,4% (29/39) encontravam-se em unidades de terapia intensiva (UTI), semi-intensiva (USI) ou UTI coronariana (COR) (Anexo A).

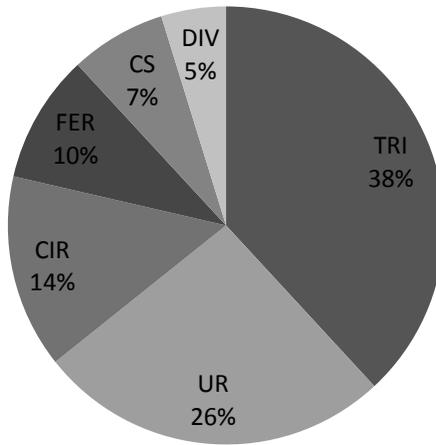


Gráfico 1 – Distribuição dos 42 isolados de *P. aeruginosa* entre os sítios anatômicos dos pacientes.

TRI – Trato Respiratório Inferior; UR – Trato Urinário; CIR – Sítios Cirúrgicos; FER – Feridas; CS – Corrente Sanguínea; DIV – Dispositivos Intra-Vasculares.

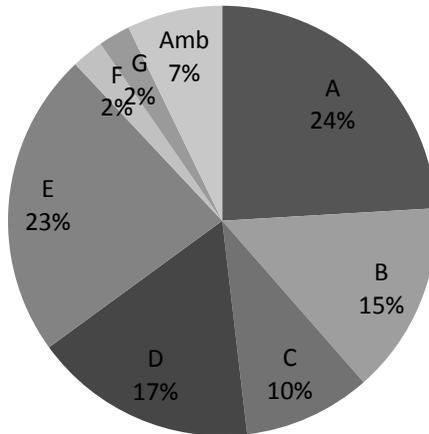


Gráfico 2 – Distribuição dos 42 isolados de *P. aeruginosa* segundo as instituições ou ambientes onde se encontravam os pacientes dos quais os espécimes biológicos foram obtidos.

A – Hospital Privado “A”, B – Hospital Público “B”, C – Hospital Privado “C”, D – Clínica Privada “D”, E – Clínica Privada “E”, F – Hospital Público “F”, G – Clínica Privada “G”, Amb – Ambiente ambulatorial.

Dos três isolados considerados de procedência ambulatorial (Anexo A: P08, P13 e P83), apenas em uma circunstância (P13) não foi possível associar com internação prévia em hospitais ou clínicas da região metropolitana de Florianópolis. O que não exclui esta possibilidade, já que a pesquisa se restringiu apenas às instituições atendidas pelos serviços de bacteriologia do LMSL. Esta pesquisa foi realizada através da observação do histórico de realização de exames, quando todos os acessos de entrada dos materiais clínicos dos pacientes foram avaliados no Sistema de Informação Laboratorial (LIS, Caché terminal, InterSystems Co., versão 5.0 - Build 720.0) deste laboratório.

Segundo essa pesquisa de acesso ao LMSL, o isolado P08 foi recuperado de um paciente que já fora internado na Instituição “G”. Deste mesmo paciente, outros isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes foram recuperados de diferentes sítios anatômicos, em diferentes datas e também quando o paciente esteve internado em outra instituição (Instituição “E”), mas não avaliados por este estudo. Todos os isolados apresentaram um perfil de suscetibilidade semelhante (Anexo B).

O isolado P13 foi o único obtido de um paciente que não possuía histórico de internação em hospitais e clínicas da região metropolitana de Florianópolis atendidos pelo LMSL. Portanto, foi considerado como de origem ambulatorial. Semelhantemente ao paciente do qual o isolado P08 foi recuperado, outros isolados de *P. aeruginosa* com perfil de suscetibilidade do isolado P13 foram anteriormente recuperados de materiais clínicos provenientes do mesmo paciente e durante um período de quatro anos (Anexo C), mas nenhum desses avaliados por este estudo.

O isolado P83 foi recuperado de material clínico de um paciente que já havia realizado diversos exames microbiológicos no LMSL. Alguns desses materiais clínicos submetidos a exames resultaram em recuperação bacteriana, enquanto que outros não. Outros dois isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados deste paciente, mas não avaliados por este estudo, enquanto o mesmo se encontrava internado na instituição “E”, no entanto, apresentavam um perfil de suscetibilidade diferenciado. Além disso, foi observada diversidade no tocante as espécies bacterianas encontradas e na susceptibilidade destas aos antimicrobianos (Anexo D).

4.2. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE M β L PELO TESTE DE SINERGISMO DE DISCO DUPLO – DDST

Dos 42 isolados de *P. aeruginosa* selecionados para este estudo, 28 (66,7%) apresentaram sinergismo entre o antimicrobiano CAZ e o inibidor ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (“+” e “i”, Quadro 4). Catorze (33,3%) não apresentaram qualquer sinergismo (“-”, Quadro 4). A interpretação e a proporção dos resultados positivos e negativos estão dispostas na Tabela 4. Vinte e quatro (57,14%; IC95%: 41,94 – 71,39) foram interpretados como positivos para a presença de M β L (Anexo F), 14 (33,33%; IC95%: 20,39 – 48,51) como negativos (Anexo G) e em 4 isolados (9,52%; IC95%: 3,10 – 21,39), apesar da presença de sinergismo, o resultado foi inconclusivo (Anexo H).

Isolado ¹	DDST ²	Isolado ¹	DDST ²	Isolado ¹	DDST ²
P01	-	P25	+	P63	+
P02	+	P26	+	P66	+
P03	-	P27	i	P68	-
P04	-	P30	-	P70	-
P07	i	P33	+	P73	+
P08	-	P36	+	P74	+
P13	-	P38	+	P79	+
P14	-	P43	+	P80	i
P16	-	P49	+	P82	+
P17	+	P50	+	P83	i
P18	-	P51	-	P84	+
P20	-	P52	+	P87	+
P22	+	P55	+	P88	+
P23	+	P59	+	P91	-

Quadro 4 – Resultados dos testes de sinergismo de disco duplo (DDST) nos 42 isolados de *P. aeruginosa*.

¹Isolados de *P. aeruginosa* avaliados neste estudo. ²DDST – *Double-disk Synergy Test*: “+” – Teste Positivo. “i” – Teste Positivo e Inconclusivo. “-” – Teste Negativo.

Segundo Picão e colaboradores (2008) este teste é 100% específico e sensível quando aplicado a isolados de *P. aeruginosa* produtores das subclasses de M β L encontradas no Brasil, isto é, SPM-1,

IMP- e VIM-. Igualmente, os valores preditivos positivos e negativos resultaram ambos em 100% em seu estudo. A validação do teste contou com 28 isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L das subclasses SPM-1 (10/28), IMP- (14/28; 10 IMP-1; 1 IMP-13; 1 IMP-16; 2 IMP-18), GIM-1 (1/28) e VIM- (3/28; 1 VIM-1; 1 VIM-2; 1 VIM-7) e 6 não produtores. A maioria dos isolados eram provenientes do Brasil.

Embora os DDST dos isolados P07, P27, P80 e P83 tenham apresentado sinergismo (“i”, no Quadro 4), isto é, houve uma distorção (aumento direcional) no halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de CAZ, a interpretação dos resultados, ou seja, o valor preditivo positivo da presença de M β L foi prejudicado e então, considerado inconclusivo, pois o teste foi padronizado por Picão e colaboradores (2008) a partir de cepas resistentes a este antimicrobiano. Portanto, apesar de observadas distorções no halo da CAZ, a presença de M β L não pôde ser indicada em 4 dos 28 isolados de *P. aeruginosa* com resultados positivos nos DDST, já que os mesmos se apresentaram sensíveis (P27, P80 e P83) ou com sensibilidade intermediária (P07) à CAZ.

Tabela 4 – Resultado dos Testes de Sinergismo de Disco Duplo para os 42 isolados de *P. aeruginosa* selecionados e interpretação dos resultados obtidos.

DDST (η) ¹	Proporção (%) ²	IC95% ²
Positivo (24/42)	57,14	41,94 - 71,39
Negativo (14/42)	33,33	20,39 - 48,51
Inconclusivo (4/42)	9,52	3,10 - 21,39

¹DDST – *Double-disk Sinergy Test* (número de isolados com este resultado/número total de isolados estudados). ²Proporções e Intervalo de Confiança (IC95%) calculados pelo *OpenEpi, Version 2, open source calculator* – *Proportion* em <<http://www.openepi.com/Proportion/Proportion.htm>>.

Os controles de DDST positivo e negativo, bem como exemplos de resultados positivos, positivos inconclusivos e negativos estão apresentados na Figura 5.

Os resultados dos testes considerados positivos, isto é, naqueles isolados onde se identificou a produção presuntiva de M β L, encontram-se distribuídos e apresentados no Gráfico 3 segundo as instituições onde se encontravam os pacientes dos quais os isolados clínicos foram recuperados. Neste gráfico, é possível observar que, dentre os isolados de *P. aeruginosa* selecionados para este estudo, apenas não se pôde identificar a presença de M β L nos isolados das instituições “C” e “G”. Assim como, estas enzimas não foram evidenciadas nos isolados

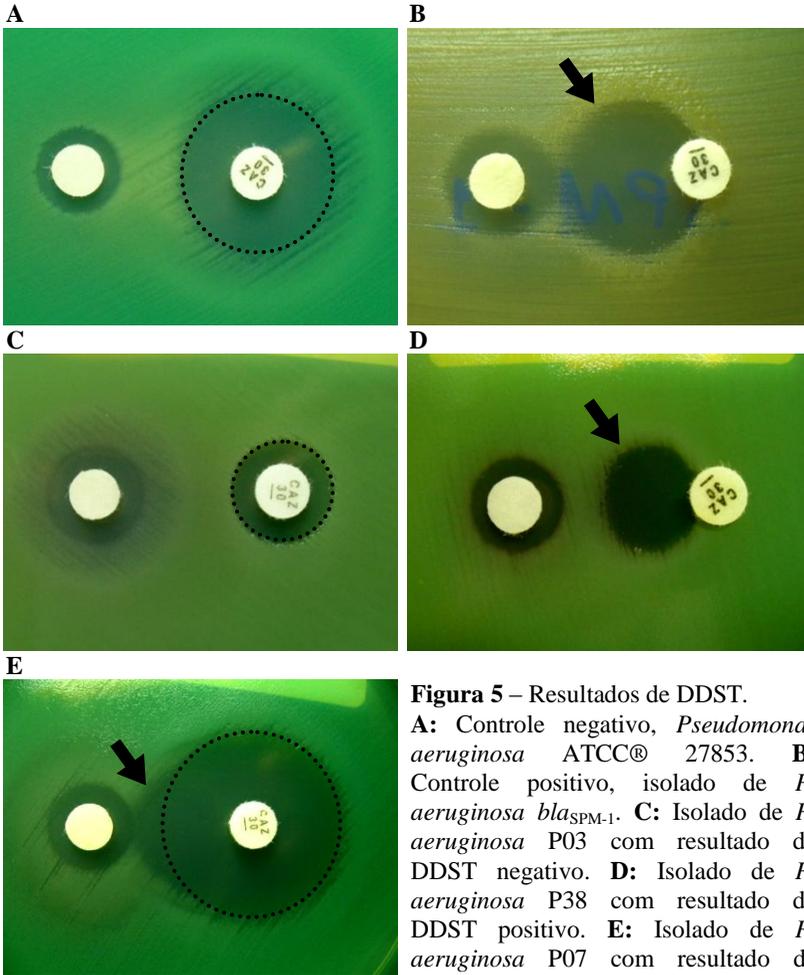


Figura 5 – Resultados de DDST.

A: Controle negativo, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853. **B:** Controle positivo, isolado de *P. aeruginosa* bla_{SPM-1}. **C:** Isolado de *P. aeruginosa* P03 com resultado de DDST negativo. **D:** Isolado de *P. aeruginosa* P38 com resultado de DDST positivo. **E:** Isolado de *P. aeruginosa* P07 com resultado de DDST inconclusivo.

DDST: *Double-Disk Synergy Test*. **Discos em branco:** discos de papel filtro contendo 10 µl de uma solução de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA 0,669M; 1:16 2-MPA 95%; Sigma, Alemanha). **Discos CAZ 30:** discos de papel filtro impregnados com 30 µg do agente antimicrobiano ceftazidima (CAZ). **Círculos pontilhados:** limites definidos ou continuação virtual do limite dos halos inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de CAZ devido a sua atividade antimicrobiana. **Setas:** indicação do aparecimento de uma zona de inibição do crescimento bacteriano (B e D) ou da distorção (aumento direcionado) do limite do halo de inibição do crescimento ao redor do disco de CAZ (E) atribuídos às atuações sinérgicas entre CAZ e o inibidor 2-MPA.

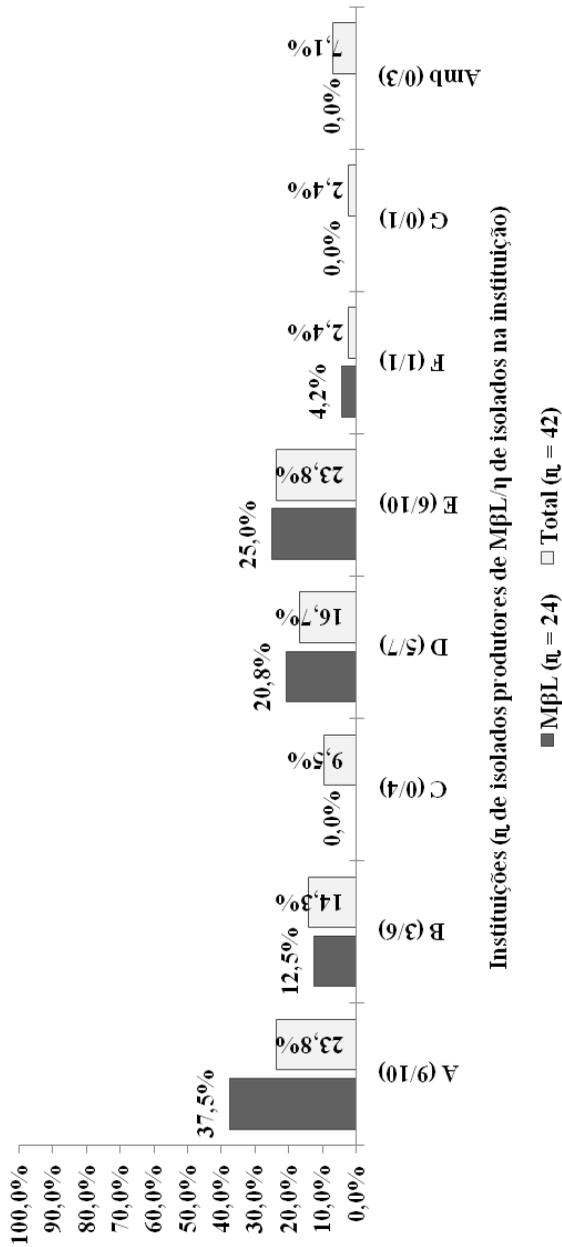


Gráfico 3 – Distribuição dos 24 isolados de *P. aeruginosa* produtoras de MBL entre as instituições onde se encontravam os pacientes dos quais os espécimes clínicos foram recuperados e representatividade do número de isolados analisados de cada instituição entre a amostragem total.
 A – Hospital Privado “A”, B – Hospital Público “B”, C – Hospital Público “C”, D – Clínica Privada “D”, E – Clínica Privada “E”, F – Hospital Público “F”, G – Clínica Privada “G”, Amb – Ambulatório.

recuperados de pacientes em caráter ambulatorial. Na instituição “A”, a presença de M β L foi observada em 9 dos 10 isolados selecionados. A frequência de isolados de *P. aeruginosa* suscetíveis nessa instituição, particularmente para os carbapenêmicos IPM e MEM, foi igual ou inferior a 60% no período de março a dezembro de 2010 (Anexo Y). Isto sugere uma prevalência elevada desta enzima como mediadora de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos nesta instituição, mesmo no ano seguinte à obtenção dos isolados selecionados para este estudo (julho a novembro de 2009; Anexo A).

A distribuição destes isolados segundo o sítio anatômico de onde foram recuperados e segundo a localização interna nas instituições onde se encontravam os pacientes, estão apresentados nos Gráficos 4 e 5, respectivamente. Pelo Gráfico 4, a recuperação de isolados produtores de M β L não parece estar associada a infecções de sítios específicos, já que sua distribuição assemelha-se à distribuição dos mesmos sítios anatômicos dos isolados da amostragem total. Já a recuperação de isolados produtores de M β L em relação às unidades hospitalares das instituições onde se encontravam internados os pacientes, demonstra a recuperação aumentada de isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* em UTI e outras unidades de cuidado intensivo de pacientes (Gráfico 5). Esta frequência aumentada também é observada em outros trabalhos (FRAIMOW; TSIGRELIS, 2011; TAM *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2003; SEVERINO; MAGALHÃES, 2002;).

Apesar do intuito de se utilizar o sistema Vitek® 2 apenas como uma ferramenta para a obtenção das CIM dos isolados selecionados para este estudo, o mesmo apresentou excelente concordância com os DDST predizendo a presença de M β L. E, embora não se tenham observado os critérios mínimos exigidos para estudos de caráter comparativos entre as duas metodologias, mas se valendo das sensibilidade e especificidade do método DDST escolhido, o sistema Vitek® 2 identificou corretamente 24 dos 24 isolados presumivelmente produtores de M β L como “produtores de carbapenemase (metalo- ou oxa-carbapenemases)”. Dos 14 isolados negativos pelo DDST, em 11, o sistema Vitek® 2 indicou a presença de mecanismos diversos, ou seja, outros que carbapenemases como determinantes das resistências aos betalactâmicos carbapenêmicos associados a ainda outros mecanismos determinantes de resistência aos demais agentes betalactâmicos. Em 3 dos 14 isolados não produtores de M β L segundo os DDST, o equipamento automatizado indicou a presença de carbapenemases, as quais poderiam se constituir, além de M β L, de serino- ou oxa-carbapenemases (não investigadas) também

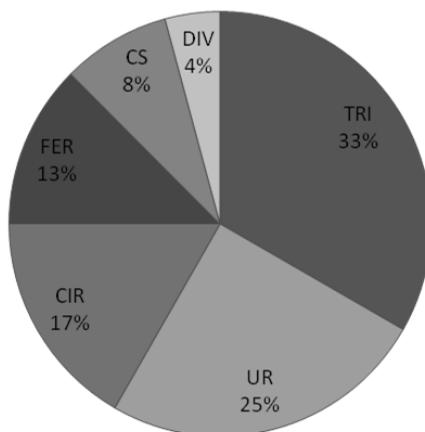


Gráfico 4 – Distribuição dos 24 isolados produtores de MβL segundo os sítios anatômicos de onde foram recuperados.

TRI – Trato Respiratório Inferior, UR – Trato Urinário, CIR – Sítios Cirúrgicos, FER – Feridas, CS – Corrente Sanguínea, DIV – Dispositivos Intra-Vasculares.

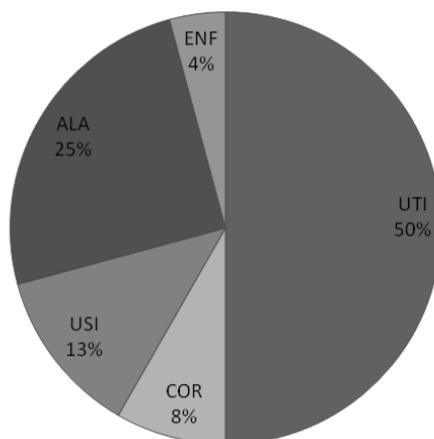


Gráfico 5 – Distribuição dos 24 isolados produtores de MβL segundo as unidades hospitalares nas instituições onde se encontravam os pacientes dos quais os isolados foram recuperados.

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo, COR – UTI Coronariana, USI – Unidade Semi-Intensiva, ENF – Enfermaria, ALA – Ala Hospitalar (Quartos/apartamentos).

encontradas em isolados de *P. aeruginosa*, no entanto, com prevalência muito inferior às M β L (ZAVASCKI *et al.*, 2010 *apud* XAVIER, 2010; PICÃO, 2009; PEREZ *et al.*, 2007). Desta forma, quando comparado ao DDST, a acurácia diagnóstica apresentada pelo sistema Vitek® 2 ao prever a presença de M β L foi de 92,11%, com sensibilidade de 100,00% (IC95%: 86,20 – 100,00) e valor preditivo negativo de 100,00% (IC95%: 74,12 – 100,00). A especificidade e o valor preditivo positivo foram de 78,57 (IC95%: 52,41 – 94,33) e 88,89 (IC95%: 71,94 – 96,15) (cálculos efetuados através do dispositivo *on-line*, *OpenEpi – Diagnostic ou Screening Test Evaluation* - Anexo I). Portanto, este sistema automatizado, embora ainda subutilizado como ferramenta de identificação de carbapenemases em isolados de *P. aeruginosa*, poderá se constituir de excelente aplicabilidade para a identificação de isolados multirresistentes que expressam carbapenemases como mecanismos determinantes de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos. As representações gráficas de alguns resultados gerados pelo sistema Vitek® 2 estão disponibilizadas no Anexo J.

4.3. COMPARAÇÕES ENTRE AS SUSCETIBILIDADES ENCONTRADAS PELAS METODOLOGIAS AUTOMATIZADA E DISCO DIFUSÃO EM GEL

Os resultados das CIM obtidas através da incubação e leitura automatizadas dos cartões de suscetibilidade para Gram-negativos do sistema VITEK® 2, AST-N105, estão resumidamente disponibilizados na Tabela 5. Um exemplo de resultado das CIM obtidas para o isolado P22 emitido pelo processador usado está apresentado no Anexo E.

Embora todos os isolados tenham se apresentado inicialmente resistentes à CAZ durante sua seleção para este estudo, apenas 33 (78,6%; 33/42) permaneceram resistentes em relação a este antimicrobiano quando re-avaliados pela metodologia automatizada. Os demais isolados se apresentaram com suscetibilidade reduzida (14,3%; 6/42) ou foram até sensíveis (7,1%; 3/42). Esta diferença pode ser observada em isolados de *P. aeruginosa* e não reflete necessariamente discrepâncias entre as metodologias aplicadas, mas sim, o resultado da complexa estrutura de regulação de mecanismos de resistência que afetam este e outros antimicrobianos em isolados desta espécie, especialmente do grupo dos betalactâmicos. Assim, a expressão controlada de bombas de efluxo, como os sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY-OprM e de betalactamases cromossômicas de

Tabela 5 – CIM obtidas de 42 isolados de *P. aeruginosa* pelo método automatizado, expressas em µg/ml e interpretadas segundo os critérios preconizados.

Isolado ¹	PTZ ²	CAZ ²	FEP ²	IPM ²	MER ²	AMK ²	GEN ²	CIP ²	COL ²
P01	≥128R	16I ≥ 64R	4I	8I	≥ 64R	≥16R		≥4R	2S
P02	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P03	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≤ 2S	≤ 1S	0,5S	2S
P04	≥128R	≥ 64R	32R	≥16R	≥16R	8S	8I	≥4R	2S
P07	≥128R	16I	16I	≥16R	≥16R	4S	4S	≥4R	1S
P08	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P13	≥128R	16I	8S	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P14	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P16	≥128R	16I	8S	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P17	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P18	≥128R	≥ 64R	32R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P20	≥128R	≥ 64R	16I	≥16R	≥16R	16S	4S	≤ 0,25S	2S
P22	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P23	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P25	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P26	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P27	16S	2S	2S	≥16R	8I	8S	4S	≤ 0,25S	1S
P30	16S	16I	2S	≤ 1S	1S	≤ 2S	4S	≥4R	≤0,5S
P33	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P36	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P38	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P43	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P49	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P50	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P51	≥128R	16I	32R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P52	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P55	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P59	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P63	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P66	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	16S	≥16R	≥4R	2S

Isolado ¹	PTZ ²	CAZ ²	FEP ²	IPM ²	MER ²	AMK ²	GEN ²	CIP ²	COL ²
P68	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P70	≥128R	32R	32R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P73	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P74	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P79	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P80	32R	2S	8S	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P81	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	16S	≥16R	≥4R	2S
P82	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P83	32R	4S	8S	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P84	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	16S	≥16R	≥4R	2S
P87	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P88	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P89	≥128R	≥ 64R	≥ 64R	≥16R	≥16R	≥ 64R	≥16R	≥4R	2S
P91	≥128R	32R	8S	≥16R	≥16R	≤2S	2S	1S	2S

¹Isolados de *P. aeruginosa* avaliados por este estudo. ²Antimicrobianos testados, resultados de CIM expressas em µg/ml e perfil de suscetibilidade: PTZ – Piperacilina/Tazobactam, CAZ – Ceftazidima, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem, AMK – Amicacina, GEN – Gentamicina, CIP – Ciprofloxacina, COL – Colistina. R – Resistente. I – Intermediário. S – Sensível.

Fonte: Laudos laboratoriais gerados pelo software produzido pela Vitek 2 Technology™ e integrado ao sistema de incubação e leitura, Vitek 2 System®, versão: 04.02, junho de 2009; AST, versão: 04.01.4.1.16, fevereiro de 2009; AES Expert, versão: 1.9.0, fevereiro de 2009; Knowledge Base, versão: 04.02, dezembro de 2010 (*View and Mantain Isolate Results: Laboratory Report*).

espectro ampliado (AmpC) pode reverter um perfil, anteriormente resistente à CAZ, a sensível. A descontinuidade da exposição a este ou a outros betalactâmicos e até mesmo a agentes antimicrobianos de classes distintas, pode levar a supressão de genes que codificam estes mecanismos. Portanto, uma vez que, antes de re-avaliadas as suscetibilidades dos isolados deste estudo através da microdiluição em caldo, os isolados foram preservados e subcultivados na ausência de quaisquer agentes antimicrobianos, esta prática pode ter permitido que estes mecanismos de resistência tenham sido reprimidos (TAM *et al.*, 2010; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; WALSH, 2008; HAMMANI

et al., 2008; DOI *et al.*, 2007; MESAROS *et al.*, 2006; THOMSON; BONOMO, 2005).

Semelhantemente à CAZ, embora todos os isolados tenham se apresentado inicialmente resistentes aos carbapenêmicos, apenas 95,2% (40/42) dos isolados permaneceram resistentes ao IPM por esta metodologia. 2,4% (1/42) apresentaram-se com sensibilidade intermediária e 2,4% (1/42) sensíveis. Também para MEM, apenas 92,9% (39/42) dos isolados permaneceram resistentes, 4,8% (2/42) apresentaram-se com suscetibilidade reduzida e 2,4% (1/42) foram considerados sensíveis. Mecanismos que interferem na permeabilidade através da membrana externa e na concentração intracelular destes fármacos, particularmente o sistema de efluxo MexEF-OprN, o qual quando os genes que o codificam apresentam expressão aumentada, co-regulam a expressão diminuída de porinas (OprD) e apenas na presença de seus substratos (carbapenêmicos e fluoroquinolonas), podem ter sido suprimidos pela manipulação laboratorial das cepas deste estudo. No entanto, mais de 90% dos isolados permaneceram resistentes aos carbapenêmicos, enquanto que à CAZ, apenas 78,6%. Esta diferença sugere que, embora os mecanismos envolvidos possam ser os mesmos (impermeabilidade/concentração intracelular ou cooperação de mecanismos), mutações nos genes que codificam estes mecanismos ou nas regiões promotoras destes genes, podem ser responsáveis pela persistência de perfis resistentes, em detrimento de mecanismos naturalmente suprimíveis (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; HAMMANI *et al.*, 2008).

Tendo o conhecimento deste fato, isto é, que o uso de antimicrobianos betalactâmicos, assim como de outras classes (ex., fluoroquinolonas e aminoglicosídeos), pode levar a desrepressão de genes que codifiquem mecanismos de resistência aos antimicrobianos empregados ou ainda, resistência cruzada através destes ou de outros mecanismos entre classes distintas (ex., acúmulo de mutações e sistemas de efluxo com mais de um substrato), o documento M100-S21 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dispõe nos comentários gerais da tabela 2B-1 (Critérios interpretativos para isolados de *P. aeruginosa*) que isolados de:

“*P. aeruginosa* podem desenvolver resistência durante terapias prolongadas a todos os antimicrobianos. Portanto, isolados que são inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes entre três a quatro dias após o início da terapia.”

4.4. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DOS PERFIS DE SUSCETIBILIDADE DA AMOSTRAGEM

Os resultados das CIM obtidas para o antimicrobiano ATM estão disponibilizados na Tabela 6.

Tabela 6 – CIM obtidas de 42 isolados de *P. aeruginosa* pelo método convencional, expressas em µg/ml e categorizadas segundo os critérios interpretativos preconizados.

Isolado ¹	ATM ²	Isolado ¹	ATM ²	Isolado ¹	ATM ²
P01	≥ 64 R	P26	4 S	P68	16 I
P02	16 I	P27	8 S	P70	8 S
P03	32 R	P30	16 I	P73	8 S
P04	16 I	P33	32 R	P74	8 S
P07	32 R	P36	16 I	P79	4 S
P08	16 I	P38	16 I	P80	8 S
P13	8 S	P25	2 S	P82	8 S
P14	16 I	P43	8 S	P83	8 S
P16	32 R	P49	16 I	P84	8 S
P17	16 I	P50	8 S	P87	16 I
P18	32 R	P51	32 R	P88	8 S
P20	16 I	P52	8 S	P91	16 I
P22	16 I	P55	16 I	P91	16 I
P23	4 S	P59	16 I		
P25	2 S	P66	16 I		

¹Isolados de *P. aeruginosa* avaliados neste estudo. ²Antimicrobiano testado, resultados de CIM expressas em µg/ml e perfil de suscetibilidade: ATM – Aztreonam. R – Resistente. S – Sensível. I – Intermediário.

Nicolau e colaboradores (2010 *apud* XAVIER, 2010) realizaram um levantamento de dados de suscetibilidades aos antimicrobianos betalactâmicos de estudos disponibilizados na literatura científica e observaram que é possível prever o perfil geral de suscetibilidade mais frequentemente encontrado para isolados de *P. aeruginosa* produtores de MβL. Assim, o perfil mais comumente reconhecido foi aquele em que se observou resistência ou sensibilidade intermediária para antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos (IPM e/ou MEM),

cefalosporinas e penicilinas (CAZ, FEP e/ou PTZ) e sensibilidade ao ATM, embora os próprios autores reconheçam que a suscetibilidade a este último possa variar em isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L. Os autores afirmam que este perfil de suscetibilidade é sugestivo da presença de M β L e que testes adicionais poderiam ser utilizados para confirmar esta hipótese.

A suscetibilidade dos isolados estudados aos antimicrobianos betalactâmicos testados estão apresentadas no Gráfico 6.

Pelo Gráfico 6, mais de 90% dos isolados de *P. aeruginosa* deste estudo são resistentes a PTZ, IPM e MEM e quase 80% são resistentes às cefalosporinas CAZ e FEP. Também é possível observar que mais de 80% dos isolados desta amostragem se apresentaram ou sensíveis (40,5%) ou com suscetibilidades reduzidas (42,9%) ao ATM. Outros estudos com isolados brasileiros também apresentaram sensibilidades semelhantes ao ATM (10,6 – 76,9%) em amostragens com características compatíveis a deste estudo (DOI *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2006; MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005; ZAVASCKI *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2003). Além disso, a frequência de sensibilidade ou sensibilidade intermediária (83,3%; 35/42) ao ATM neste conjunto amostral, corrobora a idéia de uma frequência alta de M β L (57,14%; 24/42), já que, ao contrário de CAZ, FEP, IPM e MEM, estas enzimas não hidrolisam o antimicrobiano ATM com eficiência (WALSH *et al.*, 2005; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; TOLEMAN *et al.*, 2002).

Este fato, isto é, por um lado uma frequência elevada (73,8%; 31/42) de resistência a PTZ, CAZ, FEP, IPM e MEM e de outro, frequência elevada (83,4%; 35/42) de isolados sensíveis ou com sensibilidade intermediária ao ATM, é proposto por Nicolau e colaboradores (2010 *apud* XAVIER, 2010) como sendo um indicativo de isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L. Na amostragem em estudo, 83,3% (35/42) dos isolados apresentaram o perfil sugerido pelos autores para a produção de M β L. No entanto, somente em 24 (24/42; 57,14%) destes isolados foi observada a produção de M β L através dos DDST. Por outro lado, se exigido que os isolados também apresentassem suscetibilidade ao ATM, apenas 13 isolados da amostragem se enquadrariam. E, embora nesta situação, 12 dos 13 isolados produzissem M β L, outros 12 isolados, também produtores desta enzima, apresentaram resistência ao ATM e não se enquadraram ao perfil proposto. Devido a esta diferença encontrada, isto é, por um lado 11 isolados expressando o fenótipo indicado, mas não produtores de M β L e por outro, 12 isolados produtores e que não se enquadraram

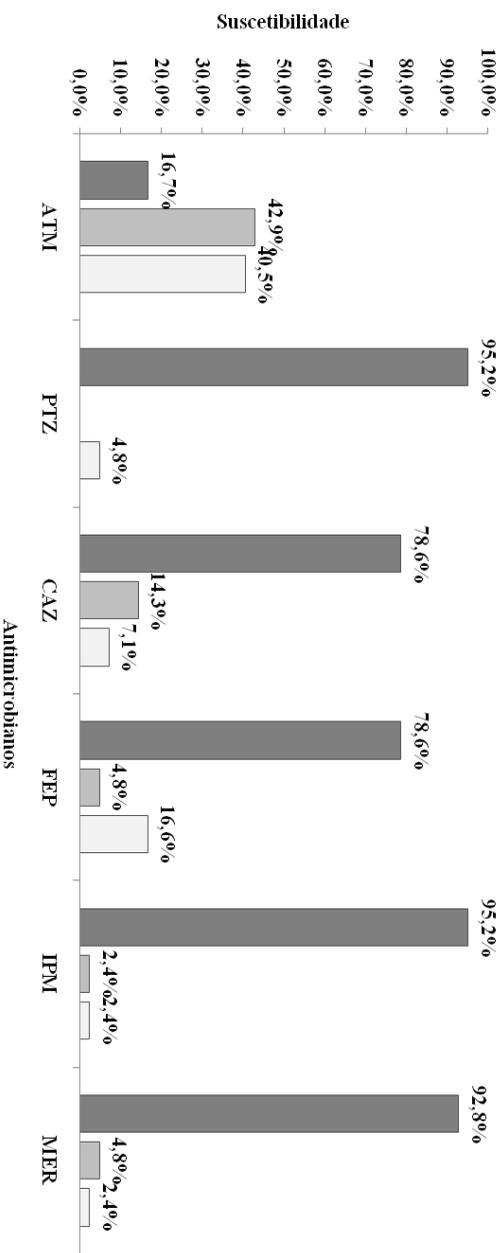


Gráfico 6 – Susceptibilidade dos 42 isolados de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos betalactâmicos.
 ATM – Aztreonam, PTZ – Piperacilina/Tazobactam, CAZ – Cefazidima, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem.

ao perfil sugerido, é importante avaliar quais outros mecanismos poderiam estar envolvidos na expressão de fenótipos que são condizentes ao perfil proposto e também, desconsiderar a falta de suscetibilidade ao ATM como critério excludente para a presença de M β L.

Para tanto, 4 dos 35 isolados com o perfil mencionado apresentavam suscetibilidades variadas para as cefalosporinas CAZ e FEP, o que reduz para 31 (31/42; 73,8%) o número de isolados que se apresentaram simultaneamente resistentes a PTZ, CAZ, FEP, IPM e MEM. Pois 39 apresentaram-se resistentes simultaneamente a PTZ, IPM e MEM, mas apenas 33 destes demonstram ser também resistentes à CAZ e somente 31 foram resistentes a PTZ, IPM, MEM, CAZ e FEP, simultaneamente. Esta frequência (73,8%; 31/42) de perfis simultaneamente resistentes a estes cinco betalactâmicos, embora ainda superior, se aproxima mais da frequência encontrada para os isolados produtores de M β L (57,14%; 24/42). Essa constatação apóia esses últimos dados, já que a inativação destes cinco fármacos, especialmente CAZ, FEP, IPM e MEM, está inclusa no perfil hidrolítico de M β L encontradas no Brasil (WALSH *et al.*, 2005; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; TOLEMAN *et al.*, 2002).

No entanto, ainda outros 7 isolados apresentaram esse mesmo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos citados. Por isso, a distribuição das CIM entre os perfis de suscetibilidade para os antimicrobianos betalactâmicos testados estão apresentadas no Gráfico 7 e suas avaliações podem auxiliar na diferenciação dos mecanismos envolvidos para as resistências observadas. De fato, em 4 destes 7 isolados os mecanismos envolvidos puderam ser estimados (vide seção 4.4.1).

Como se pode observar para IPM e MEM, mais de 90% das CIM obtidas foram iguais ou superiores ao limite máximo demonstrável pela metodologia aplicada (CIM \geq 16 μ g/ml) o que torna difícil utilizar a observação dessas suscetibilidades como critério para distinguir mecanismos mediadores de resistência. É importante salientar que o sistema Vitek® 2 é destinado para o uso clínico, portanto, os limites superiores e inferiores dos intervalos de CIM oferecidos pela metodologia, compreende apenas as CIM necessárias para distinguir os isolados dentre as categorias de sensibilidade, sensibilidade intermediária ou resistência. Entretanto, para os antimicrobianos CAZ e FEP, duas concentrações são disponibilizadas para a categoria de resistência (CIM = 32 μ g/ml e CIM \geq 64 μ g/ml), bem como para PTZ, onde são disponibilizadas três concentrações (CIM = 32/4 μ g/ml, CIM =

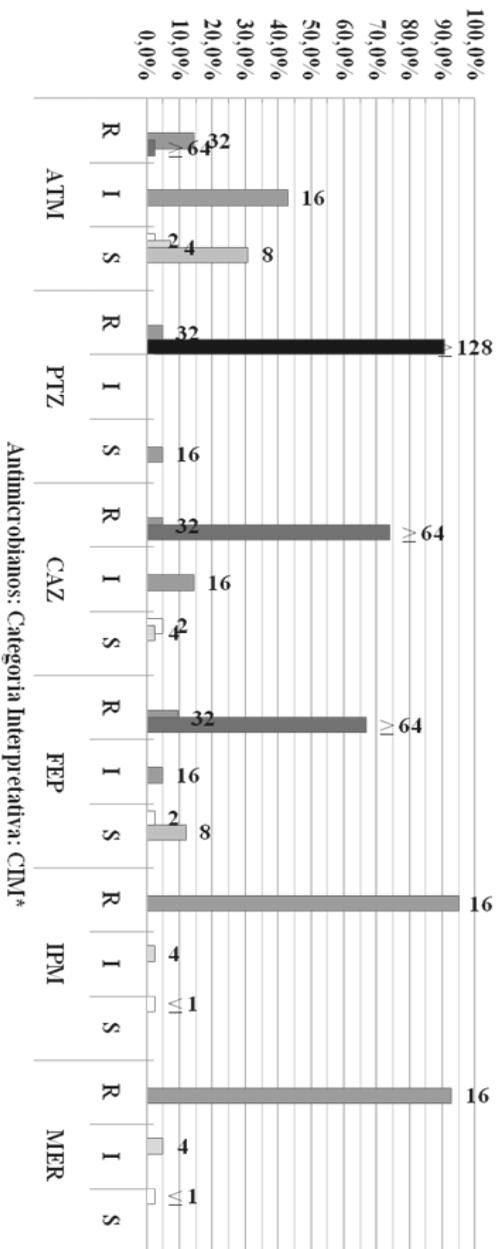


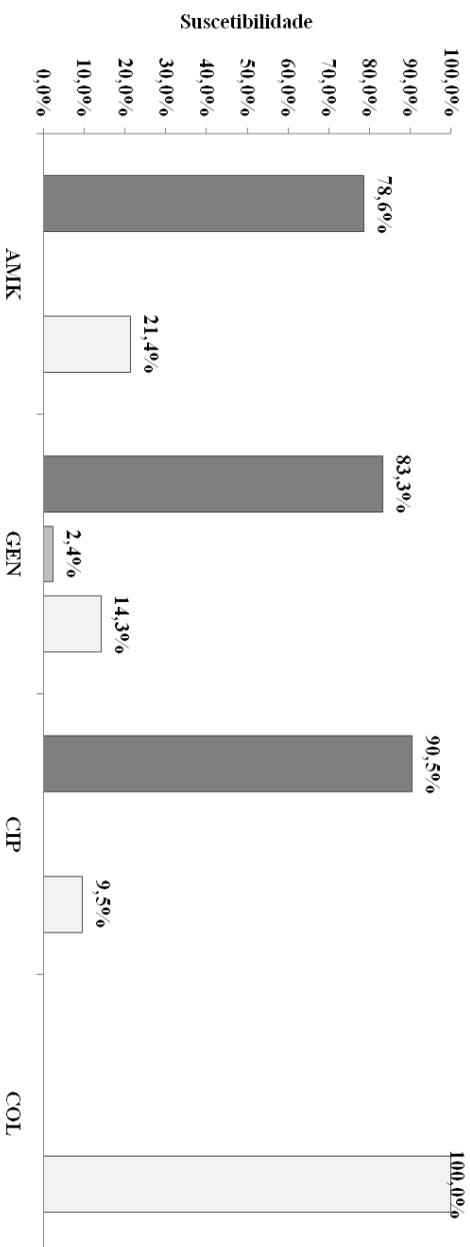
Gráfico 7 – Distribuição das CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos testados nos 42 isolados de *P. aeruginosa*.

CIM expressas em µg/ml. ATM – Aztreonam, CAZ – Cefazidina, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem *(CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), MEM – Meropenem *(CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), PTZ – Piperacilina/Tazobactam. R – Resistente, I – Intermediário, S – Sensível.

64/4 µg/ml e CIM \geq 128/4 µg/ml), sendo que o ponto de corte da categoria sensível é CIM \leq 16/4 µg/ml. Estas concentrações podem ser úteis na diferenciação de mecanismos mediadores de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, pois quando M β L são as principais mediadoras de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, estas lhes conferem resistência com CIM usualmente nos limites máximos oferecidos por esta metodologia ou frequentemente, acima deles (CARVALHO *et al.*, 2006; ZAVASCKI *et al.*, 2005; WALSH *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2003; TOLEMAN *et al.*, 2002).

Utilizando esses argumentos, isto é, a distinção de mecanismos determinantes de resistência através da avaliação dos perfis de suscetibilidade com resistências simultâneas aos antimicrobianos aliadas aos valores das CIM obtidas, é importante observar que, por exemplo, embora a frequência de resistência às cefalosporinas de espectro estendido FEP e CAZ fossem iguais (33/42; 78,3%), tanto os perfis de suscetibilidade quanto os valores das CIM obtidas variaram entre elas (Tabela 5, acima). Mecanismos que afetam CAZ podem afetar FEP, contudo há mecanismos encontrados em isolados de *P. aeruginosa* que às distinguem como seus substratos, como o sistema MexXY-OprM e a betalactamase OXA-31, os quais possuem predileção à FEP. De maneira equivalente, CAZ é um substrato de maior afinidade do que FEP para determinadas betalactamases encontradas em isolados de *P. aeruginosa*, inclusive para os tipos intrínsecos (AmpC), mas também para as adquiridas PER-1, VEB-1, OXA-10 e OXA-2 (HOCQUET *et al.*, 2006 *apud* XAVIER, 2010; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; AUBERT *et al.*, 2001).

Quanto aos representantes das demais classes de antimicrobianos testadas, ou seja, os não-betalactâmicos, 78,6% (33/42) dos isolados apresentaram-se resistentes a AMK, 83,3% (35/42) foram resistentes ao segundo antimicrobiano aminoglicosídico, GEN e 6 isolados sensíveis a GEN também o foram à AMK. Para CIP, única representante das fluoroquinolonas testada neste trabalho, 38 dos 42 (90,5%) isolados apresentaram-se resistentes. Todos os isolados de *P. aeruginosa* avaliados neste estudo apresentaram-se sensíveis a COL (Gráfico 8). Estes dados concordam com os descritos na literatura para as suscetibilidades de isolados dessa espécie de amostragens com características semelhantes (FONSECA; FREITAS; VICENTE, 2010; MASTORAKI *et al.*, 2008; CIPRIANO *et al.*, 2007; GALES *et al.*, 2003).



No Gráfico 9 estão apresentadas as distribuições das CIM para esses agentes antimicrobianos e como se pode observar, as CIM obtidas para os isolados resistentes aos aminoglicosídeos (aproximadamente 80% para ambos os agentes, AMK e GEN) estiveram no limite máximo determinado pela metodologia aplicada. E semelhantemente, o foram para mais de 90% das CIM referentes à CIP. Procurando racionalizar sobre os mecanismos determinantes de resistência a ambas as classes acima, valores de CIM elevadas sugerem que a resistência a estes fármacos é mediada mais por mecanismos gerados através do acúmulo de mutações ou modificações no sítio alvo do que por mecanismos associados à diminuição da permeabilidade celular ou diminuição da concentração intracelular destes agentes antimicrobianos. Desta forma, CIM mais elevadas para CIP são observadas quando ocorrem mutações sucessivas nos genes que codificam as Topoisomerases II e IV, alvo farmacêutico das fluoroquinolonas. E quanto aos aminoglicosídeos, são observadas quando o mecanismo que media a resistência se constitui das AME's, proteção do alvo através de metilações (RmtD) ou mutações no sítio alvo (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; HAMMANI *et al.*, 2008; MESAROS *et al.*, 2007; DOI *et al.*, 2007).

Cerca de 78% (33/42) dos isolados de *P. aeruginosa* deste estudo apresentaram-se simultaneamente resistentes AMK, GEN e CIP. Este aspecto, quando combinado à resistência observada aos antimicrobianos betalactâmicos, reflete na possibilidade de uso de poucos agentes antimicrobianos eficazes. No presente estudo foram encontrados altos índices de perfis de resistência (64,3%; 27/42), onde os isolados foram sensíveis ou com sensibilidade intermediária somente a COL e ATM. Após a re-avaliação das suscetibilidades através da metodologia automatizada, somente 2 isolados (P27 e P30; 4,8%) divergiram do perfil de multirresistência estabelecido como critério de seleção dos microrganismos para o estudo, isto é, resistentes a três ou mais classes distintas de antimicrobianos, o que se deve justamente por se apresentarem com um perfil de sensibilidade aos betalactâmicos.

Portanto, para a amostragem avaliada neste trabalho, com exceção da suscetibilidade esperada de isolados de *P. aeruginosa* à COL (100,0%, 42/42) (MIYAJIMA *et al.*, 2008; HELFAND, BONOMO, 2005; MARRA *et al.*, 2006; SADER *et al.*, 2005ab) e a suscetibilidade ou suscetibilidade reduzida encontrada para ATM (83,4%; 35/42), 27 dos 42 (64,3%) isolados avaliados se apresentaram resistentes a todos os demais agentes antimicrobianos testados.

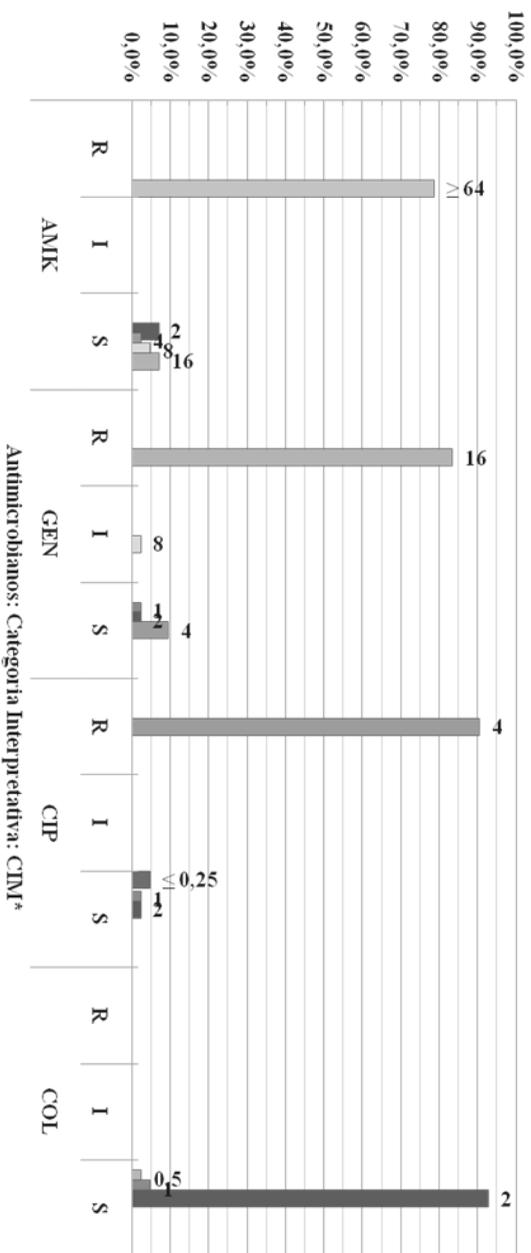


Gráfico 9 – Distribuição das CIM obtidas para as demais classes de antimicrobianos testadas nos 42 isolados de *P. aeruginosa*.

CIM expressas em µg/ml. AMK - Amicacina, GEN – Gentamicina *(CIM 1: CIM ≤ 1 µg/ml; CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), CIP – Ciprofloxacina *(CIM 4: CIM ≥ 4 µg/ml), COL - Colistina. R – Resistente, I – Intermediário, S – Sensível.

Este fato demonstra a limitação terapêutica que se deve a infecções causadas por esta espécie também na região metropolitana de Florianópolis. A multirresistência demonstrada neste estudo concorda com outros trabalhos (35 – 71%) em que isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados de ambientes nosocomiais brasileiros. E a multirresistência, nestes casos, pode ser devida a aspectos multifatoriais não inter-relacionados, como a cooperação de mecanismos de resistência. Ainda, deve ser enfatizado que a presença de integrons classe 1 carreando cassetes gênicos com genes determinantes de resistência a classes distintas de antimicrobianos já foi demonstrada em estudos desta natureza (TAM *et al.*, 2010; DOI *et al.*, 2007; ZAVASCKI *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2003; GALES *et al.*, 2003; SEVERINO; MAGALHÃES, 2002).

É importante ressaltar o fato que, em isolados multirresistentes, mesmo que estes se apresentem suscetíveis ao ATM, este fármaco não se constitui uma escolha terapêutica adequada. Isolados inicialmente sensíveis ao ATM podem ter seus perfis de suscetibilidade alterados a partir da instituição da terapia, devido, principalmente, à presença intrínseca de betalactamases cromossomais (AmpC), as quais podem ser induzidas; mas também à presença inconspícua de sistemas de efluxo, especialmente MexCD-OprJ, o qual é hiperexpresso somente na presença de seus substratos, além de outros mecanismos de difícil detecção (outros sistemas de efluxo e grande diversidade de betalactamases adquiridas) (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; GISKE *et al.*, 2008b). Apenas as polimixinas (COL ou polimixina B) estão indicadas para o tratamento empírico de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, especialmente àqueles produtores de M β L. Doripenem, o antimicrobiano betalactâmico carbapenêmico mais recentemente disponibilizado para a prática médica, embora não tenha sido testado para os isolados deste trabalho e tenha apresentado atividade antimicrobiana superior aos demais carbapenêmicos em alguns estudos, não mantém esta capacidade frente a quaisquer carbapenemases (CASTANHEIRA; JONES; LIVERMORE, 2009; GIAMARELLOU; KANELLAKOPOULOU, 2008; MIYAJIMA *et al.*, 2008; HELFAND; BONOMO, 2005). Embora sejam raros, já são descritos isolados *P. aeruginosa* resistentes ou com sensibilidade reduzida à colistina ou polimixina B (LANDMAN *et al.*, 2005). Os autores desse estudo relatam que 5% dos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram esse perfil de suscetibilidade durante um estudo contendo 527 isolados desta espécie provindos de 11 hospitais de Nova Iorque (NY, EUA).

4.4.1. Comparações das suscetibilidades aos antimicrobianos betalactâmicos entre isolados de *P. aeruginosa* produtores e não produtores de M β L

De maneira geral, a amostragem deste trabalho apresentou suscetibilidade aos antimicrobianos betalactâmicos inferior entre os isolados de *P. aeruginosa* identificados como produtores de M β L comparavelmente aos não produtores (Gráfico 10). Com exceção de ATM, ao qual se observou frequência maior de suscetibilidade.

As CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L foram sempre elevadas (Gráfico 11). Para todos os isolados (24/24) deste grupo, as CIM obtidas para os betalactâmicos, com exceção do ATM, foram iguais ou superiores à maior concentração testada. As suscetibilidades ao ATM descritas na literatura para amostragens com estas características, isto é, apresentando prevalências elevadas de isolados produtores de M β L (34,9 – 77,1%), variam entre 20% e 100% (SADER *et al.*, 2005a; ZAVASCKI *et al.*, 2005; MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005; CARVALHO *et al.*, 2004; GALES *et al.*, 2003). Como podem ser observadas no Gráfico 11, as CIM obtidas para ATM, nos isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L, estiveram, na sua quase totalidade, dispostas em categorias sensíveis ou de sensibilidade intermediária. Apenas um isolado se apresentou resistente (P33; 1/24, 4,2%; CIM = 32 μ g/ml). Entre os demais isolados testados contra o ATM, 11 (45,8%) apresentaram suscetibilidade reduzida e 12 (50,0%) foram sensíveis. No entanto, alguns estudos têm revelado que em amostragens com características semelhantes à deste trabalho (ocorrência elevada de isolados produtores de M β L e perfis de multirresistência) a suscetibilidade ao ATM pode ser baixa ou até mesmo nula. Esta característica está sendo descrita até mesmo para isolados pertencentes ao clone SP, o qual se encontra disseminado pelo território brasileiro e, em suas primeiras descrições, apresentavam-se 100% sensíveis ao ATM (FONSECA; FREITAS; VICENTE, 2010; MASTORAKI *et al.*, 2008; CIPRIANO *et al.*, 2007). Como já discutido, a resistência a este fármaco está associada à produção de grande variedade de outras betalactamases adquiridas ou, mais comumente, à hiperprodução das betalactamases cromossômicas (AmpC) intrínsecas à *P. aeruginosa*, associadas ou não a mecanismos que diminuem a permeabilidade/concentração intracelular de ATM (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; HAMMANI *et al.*, 2008).

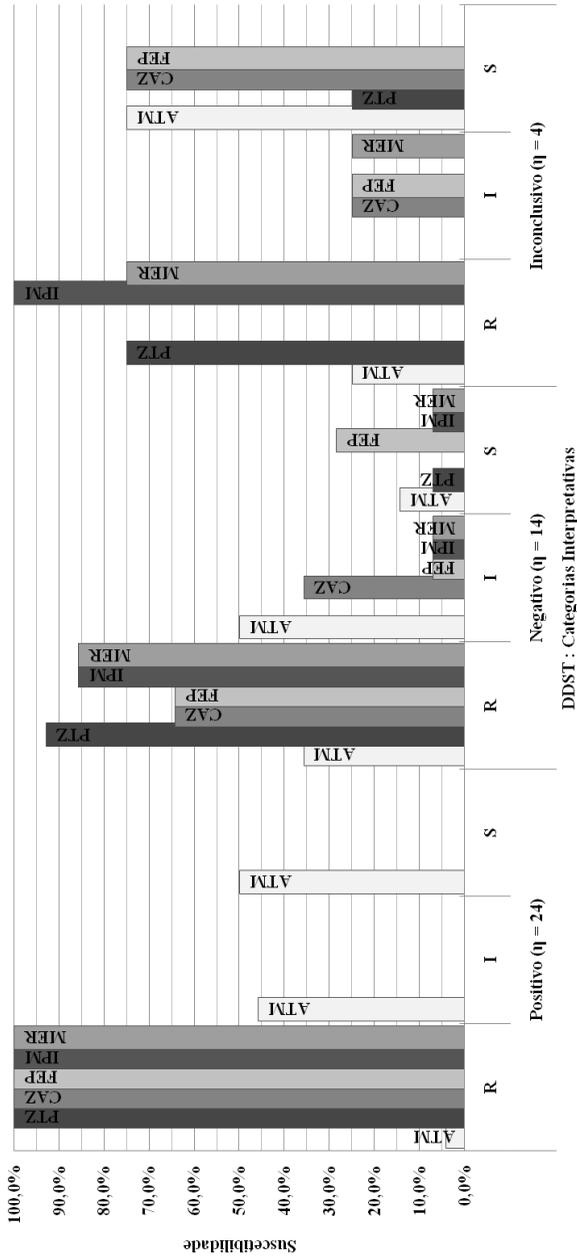


Gráfico 10 – Suscetibilidade dos 42 isolados de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos betalactâmicos agrupados segundo seus resultados nos DDST.

PTZ – Piperacilina/Tazobactam, CAZ – Cefepima, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem, ATM – Aztreonam.

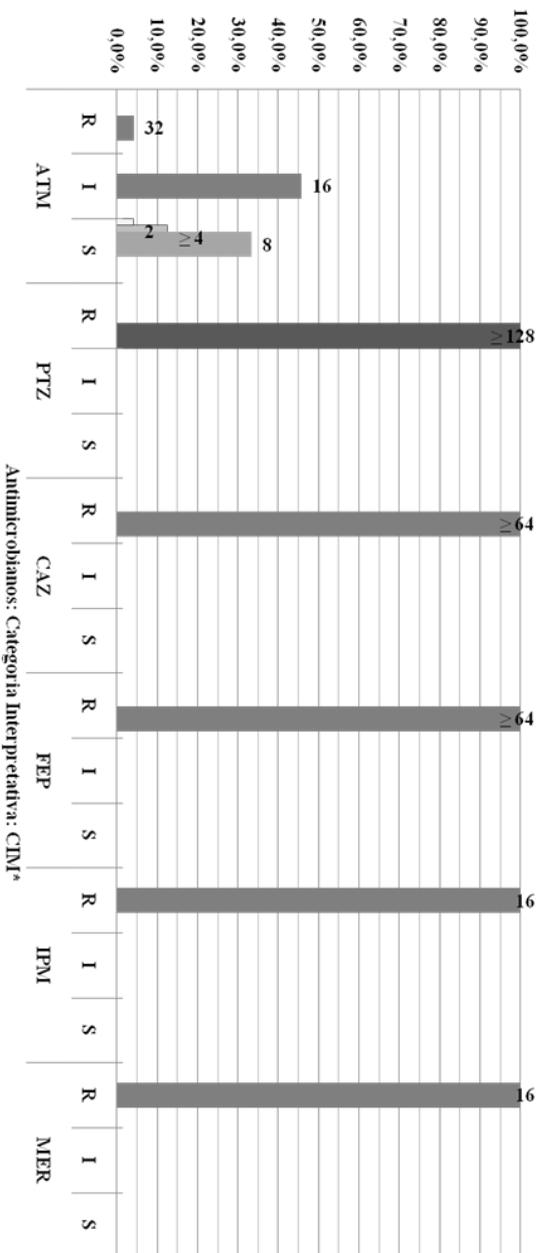


Gráfico 11 – Distribuição das CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos nos 24 isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram DDST positivos (^{+, +²}), CIM expressas em µg/ml. ATM – Aztreonam, CAZ – Cefazidina, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem *(CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), MEM – Meropenem *(CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), PTZ – Piperacilina/Tazobactam. R – Resistente, I – Intermediário, S – Sensível.

Dentre os 14 isolados de *P. aeruginosa* onde os DDST foram negativos, as suscetibilidades para os antimicrobianos betalactâmicos testados foram variadas. Apesar de não ter sido observada a presença de M β L, a resistência para IPM e MEM manteve-se elevada (85,7% para ambos os carbapenêmicos). Mas conforme pode ser observado no Gráfico 10, especialmente para as cefalosporinas CAZ e FEP, apenas 64,3% (9/14) dos isolados foram resistentes à CAZ (7/9, CIM \geq 64 μ g/ml; 2/9, CIM = 32 μ g/ml; Tabela 5, acima). Também, 64,3% (9/14) foram resistentes à FEP (5/9, CIM \geq 64 μ g/ml; 4/9, CIM = 32 μ g/ml). Para os antimicrobianos PTZ e ATM, 92,9% (13/14, CIM \geq 128 μ g/ml) e 35,7% (5/14; 1/5, CIM \geq 64 μ g/ml e 4/5, CIM = 32 μ g/ml) apresentaram-se resistentes, respectivamente.

Semelhantemente ao grupo dos isolados produtores de M β L, as CIM observadas para IPM e MEM (12/14 e 12/14) foram iguais ou superiores a 16 μ g/ml, ou seja, o valor máximo detectado pela metodologia utilizada (Gráfico 12). No entanto e distintamente aos isolados produtores de M β L, quando considerada a resistência simultânea de CAZ e carbapenêmicos, apenas 9 dos 14 isolados apresentaram-se resistentes e ainda, 2 deles com valores de CIM que os enquadram como de resistência moderada. Igualmente, quando se analisa a resistência simultânea de carbapenêmicos e FEP, apenas 9 são resistentes a ambos, sendo que 4 desses foram considerados de resistência moderada. Entre os 14 isolados negativos para os DDST, 7 foram simultaneamente resistentes a CAZ, FEP, IPM e MEM. Por fim, em todos estes isolados destacados (P03, P04, P08, P14, P18, P68 e P70; Tabela 5, acima), os quais foram também resistentes à PTZ, as CIM obtidas para CAZ e/ou FEP foram elevadas para quatro deles, P03, P08, P14 e P68, não sendo possível, portanto, distinguir seus mecanismos determinantes de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos apenas pelo fenótipo apresentado. Ainda, dentre os 7 isolados destacados, 5 (P08, P14, P18, P68 e P70) foram resistentes também a AMK, GEN e CIP e 2 ao ATM.

Esses perfis de multirresistência aos betalactâmicos, isto é, resistentes a penicilinas com inibidores de betalactamases (PTZ), às cefalosporinas de espectro estendido (CAZ e FEP) e carbapenêmicos (IPM e MEM), associadas à ausência de sinergismo nos DDST, podem ser explicados pela presença de outras carbapenemases que não M β L, como GES-2 e -5; KPC-1 e -2; OXA-24/40; e OXA-50; a associação de vários mecanismos determinantes de resistência, isto é, presença de ESBL adquirida ou hiperprodução da betalactamase cromossomal (AmpC) associadas a mecanismos que envolvem a diminuição da

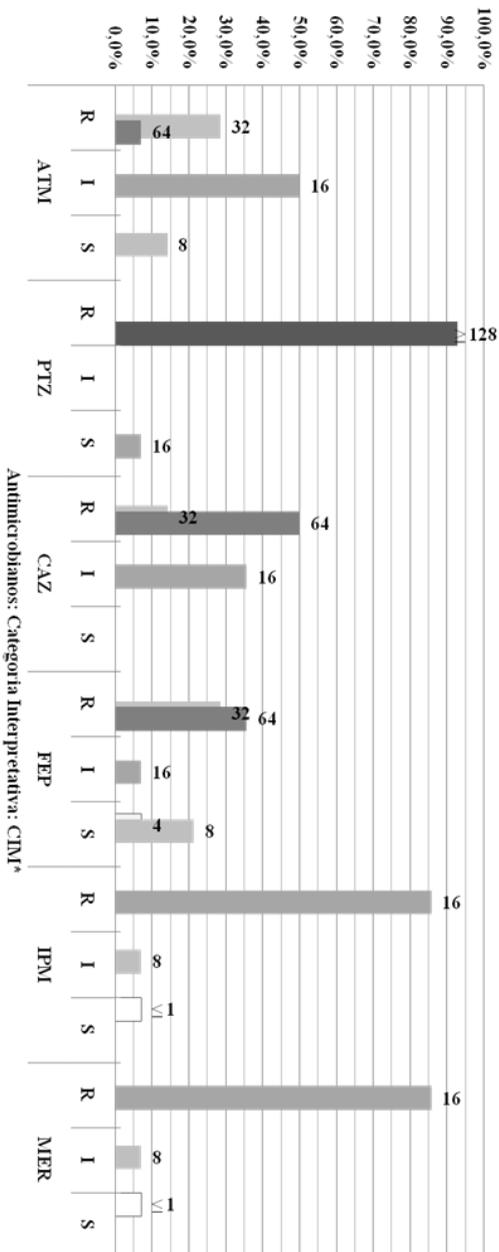


Gráfico 12 – Distribuição das CIM obtidas para os antimicrobianos betalactâmicos nos 14 isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram DDST negativos (¹⁵⁻¹⁷).

CIM expressas em µg/ml. ATM – Aztreonam, CAZ – Cefazidina, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem *(CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), MEM – Meropenem *(CIM 16: CIM ≥ 16 µg/ml), PTZ – Piperacilina/Tazobactam. R – Resistente, I – Intermediário, S – Sensível.

permeabilidade (especialmente aos carbapenêmicos) e/ou diminuição da concentração intracelular dos antimicrobianos; ou até mesmo, pela presença de M β L que não foram adequadamente identificadas pela metodologia de DDST utilizada. Essa última hipótese é sugerida, uma vez que dentre os quatro isolados que apresentaram CIM elevadas (P03, P08, P14 e P68), o sistema Vitek® 2 indicou a possibilidade de expressão de carbapenemases em três deles (P08, P14 e P68). Portanto, com exceção dos isolados P03, P08, P14 e P68, a resistência aos betalactâmicos no grupo dos isolados com resultados de DDST negativos pode ser deduzida pela expressão de mecanismos diversos à presença de M β L (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; WALSH, 2008; HAMMANI *et al.*, 2008; QUEENAM; BUSH, 2007; MESAROS *et al.*, 2007; THOMSON; BONOMO, 2005).

Naqueles isolados onde os DDST foram inconclusivos e, portanto, a presença de M β L não pode ser indicada, as suscetibilidades aos antimicrobianos betalactâmicos foram variadas à semelhança dos isolados que apresentaram testes de sinergismo negativos. Curiosamente, o sistema Vitek® 2 não indicou a possibilidade de expressão de carbapenemases em nenhum deles, pelo contrário, probabilizou que apenas expressassem mecanismos associados à diminuição da permeabilidade e/ou penicilinases adquiridas (ex., tipo PSE-; betalactamases de espectro restrito não inibidas por tazobactam). De fato, destes isolados, apenas o isolado P07 apresentou suscetibilidade reduzida às cefalosporinas de espectro estendido e resistência simultânea a PTZ e ATM, os demais (P27, P80 e P83) foram sensíveis a um ou a ambos, embora todos os quatro se apresentassem resistentes ou com suscetibilidade reduzida a IPM e/ou MEM. Conforme observado na literatura, estes perfis estão mais relacionados com a presença de mecanismos que diminuem a permeabilidade celular aos carbapenêmicos, particularmente diminuição ou perda de porinas (OprD) e/ou a expressão combinada do sistema de efluxo MexEF-OprN, os quais possuem predileção a estes fármacos em detrimento de cefalosporinas e outros betalactâmicos. Para o isolado P07, a expressão de outros sistemas de efluxo (de espectro de ação ampliado) poderia ser a explicação para a sua resistência mais abrangente aos betalactâmicos (STRATEVA; YORDANOV, 2009; DOI *et al.*, 2007; MASTORAKI *et al.*, 2008; MESAROS *et al.*, 2007). Portanto, seguindo as informações fornecidas pelo sistema Vitek® 2 e os dados disponíveis na literatura, poderia ser sugerido que os quatro isolados que apresentaram resultados

inconclusivos pelos DDST, fossem considerados como não produtores de M β L com razoável segurança.

Quando comparadas as frequências de isolados resistentes entre os dois grupos, ou seja, entre os isolados considerados produtores de M β L (24/42) e os isolados considerados como não produtores (18/42; incluindo aqueles que anteriormente foram considerados inconclusivos), há uma associação positiva entre a produção de M β L e as frequências aumentadas de resistência a CAZ, FEP e MEM (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparação das frequências de isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos betalactâmicos testados segundo os resultados das CIM e associação estatística positiva ($\rho < 0,05$) entre a presença de M β L e a frequência de isolados resistentes.

DDST ¹	ATM ²	PTZ ³	CAZ ⁴	FEP ⁵	IPM ⁶	MER ⁷
Positivo ($\eta = 24$)	4,2%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Negativo ($\eta = 18$)	33,3%	88,9%	50,0%	50,0%	88,9%	83,3%
ρ^8	<i>0,0127⁹</i>	0,0889	<i><0,001[*]</i>	<i><0,001[*]</i>	0,0889	<i>0,0355[*]</i>
RR¹⁰	0,1364	1,125	2 [*]	2 [*]	1,125	1,2

¹DDST – *Double-disk Sinergy Test* (número de isolados com este resultado).

²ATM – Aztreonam. ³PTZ – Piperacilina/Tazobactam. ⁴CAZ – Ceftazidima.

⁵FEP – Cefepima. ⁶IPM – Imipenem. ⁷MER – Meropenem. ⁸ ρ – Valor de ρ (p -value [1-tail]; Mid-P exact) calculado pelo *OpenEpi, Version 2, open source calculator—TwoByTwo*: valores significativos estão destacados com formatação itálica.

⁹Associação negativa entre a presença de M β L e frequência de isolados resistentes. ^{*}Associação positiva entre a presença de M β L e frequência de isolados resistentes. ¹⁰*Risk Ratio (Taylor Series)* (cálculos realizados pelo mesmo processador): risco estimado da associação da presença de M β L e frequências de isolados resistentes entre os dois grupos de isolados. Valores significativos estão destacados com formatação itálica. ^{*}Associação positiva entre a presença de M β L e frequência de isolados resistentes.

Particularmente para isolados resistentes a CAZ e FEP, a produção de M β L está associada a um risco 2 vezes superior (IC95%: 1,26 – 3,174) comparavelmente ao grupo dos isolados não produtores. No entanto e provavelmente pelas características e fragilidade da amostragem, pois a mesma contém um número pequeno de isolados, esta associação não foi evidente para PTZ e IPM. Para o antimicrobiano ATM ocorreu uma associação negativa entre a presença de M β L e a suscetibilidade reduzida a este, o que é coerente, já que estas enzimas não o hidrolisam com eficiência (WALSH *et al.*, 2005; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; TOLEMAN *et al.*, 2002). Entretanto, em

um estudo conduzido por Zavascki e colaboradores (2007), o qual contou com 245 isolados de *P. aeruginosa* e dos quais, 94 (38,4%) eram produtores de M β L, houve associação positiva entre a presença de M β L e frequências de resistência aumentada para todos os antimicrobianos betalactâmicos testados (os mesmos agentes deste trabalho), inclusive para ATM ($\rho = 0,03$; RR = 1,53, IC95%: 1,06 – 2,19).

4.4.2. Comparações das suscetibilidades aos antimicrobianos não betalactâmicos entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores e não produtores de M β L

Semelhantemente às frequências observadas de isolados resistentes aos antimicrobianos betalactâmicos, o grupo dos isolados produtores de M β L apresentou suscetibilidades inferiores aos agentes antimicrobianos das demais classes testadas comparavelmente àqueles não produtores (Gráfico 13).

Dentre os 24 isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L, apenas 2 isolados (8,3%) foram sensíveis à AMK (CIM = 16 μ g/ml). Todos os isolados (24/24) foram resistentes à GEN e CIP. E quando se observam as suscetibilidades a estes três fármacos para o grupo dos isolados não produtores de M β L, 9 (64,3%) dos 14 isolados foram simultaneamente resistentes à AMK, GEN e CIP (Tabela 5, acima). Ainda, 3 isolados (21,4%; P03, P20 e P91) se apresentaram sensíveis a estes fármacos. Os quatro isolados com resultados inconclusivos nos DDST apresentaram suscetibilidades, à semelhança dos isolados do grupo com resultados de DDST negativos, igualmente variadas e 2 isolados foram simultaneamente resistentes a AMK, GEN e CIP.

Embora o grupo dos isolados considerados como não produtores de M β L (incluindo os isolados anteriormente considerados inconclusivos) tenha apresentado altos índices de resistência a AMK e GEN (para ambos os antimicrobianos, 61,1%; 11/18) e CIP (77,8%; 14/18), mesmo assim houve associação estatisticamente significativa nas frequências de isolados resistentes e produtores de M β L (Tabela 8). O risco estimado desta associação foi 1,5 vezes superior (IC95%: 1,018 – 2,21) para os isolados resistentes à AMK, 1,636 vezes superior (IC95%: 1,132 – 2,365) para GEN e 1,286 vezes superior (IC95%: 1,004 – 1,646) para CIP. Associações positivas entre a presença de M β L e resistência aumentada à AMK ($\rho < 0,001$; RR = 2,72, IC95%: 2,11 – 3,53) e CIP ($\rho < 0,001$; RR = 2,82, IC95%: 2,27 – 3,51), também foram observadas no estudo de Zavascki e colaboradores (2007). O agente antimicrobiano GEN não foi avaliado.

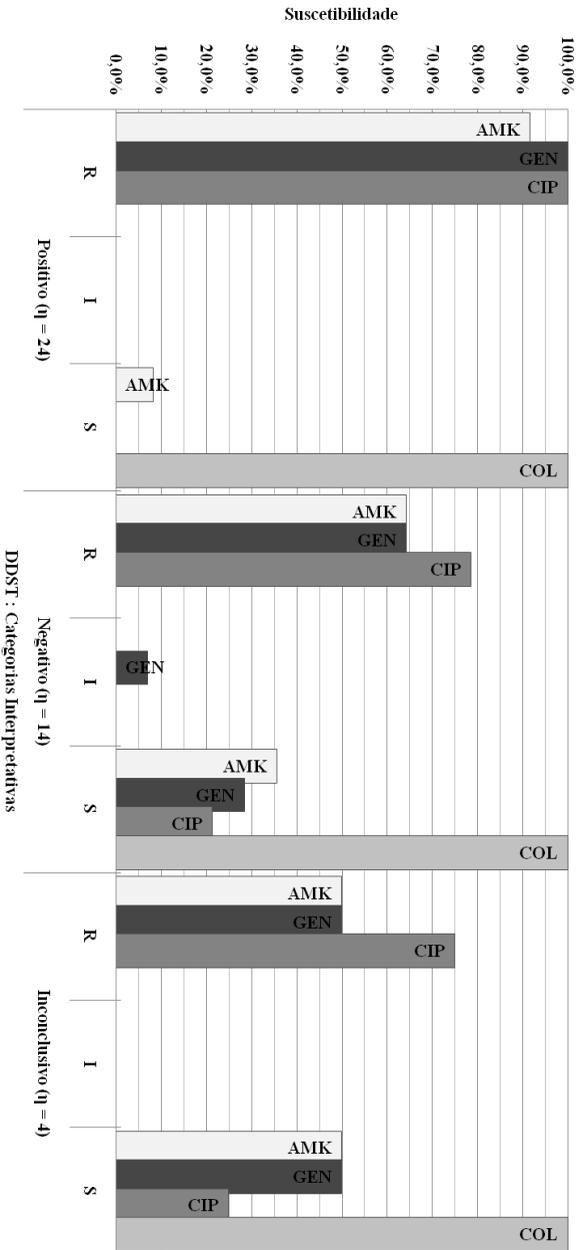


Gráfico 13 – Suscetibilidade dos 42 isolados de *P. aeruginosa* aos representantes das demais classes de antimicrobianos testados (aminoglicosídeos, fluorquinolonas e polimixinas) agrupados segundo seus resultados nos DDST. AMK – Amicacina. GEN – Gentamicina. CIP – Ciprofloxacina. COL – Colistina.

Tabela 8 – Comparação das suscetibilidades dos isolados de *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos das demais classes terapêuticas testadas (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas) segundo os resultados de DDST e associação estatística positiva ($p < 0,05$) da presença de M β L e frequência de isolados resistentes.

DDST ¹	AMK ²	GEN ³	CIP ⁴	COL ⁵
Positivo ($\eta = 24$)	91,7%	100,0%	100,0%	0,0%
Negativo ($\eta = 18$)	61,1%	61,1%	77,8%	0,0%
ρ^6	<i>0,0123*</i>	<i><0,001*</i>	<i>0,0137*</i>	<i>-⁷</i>
RR⁸	<i>1,5*</i>	<i>1,636*</i>	<i>1,286*</i>	<i>-⁷</i>

¹DDST – *Double-disk Sinergy Test* (número de isolados com este resultado). ²AMK - Amicacina. ³GEN - Gentamicina. ⁴CIP - Ciprofloxacina. ⁵COL – Colistina. ⁶ ρ – Valor de ρ (*p-value [1-tail]; Mid-P exact*) calculado pelo *OpenEpi, Version 2, open source calculator—TwobyTwo*: valores significativos estão destacados com formatação itálica. *Associação positiva entre a presença de M β L e frequência de isolados resistentes. ⁷Sem associação entre a presença de M β L e perfil de suscetibilidade. ⁸*Risk Ratio (Taylor Series)* (cálculos realizados pelo mesmo processador): risco estimado da associação da presença de M β L e frequências de isolados resistentes entre os dois grupos de isolados. Valores significativos estão destacados com formatação itálica; *Associação positiva entre a presença de M β L e frequência de isolados resistentes.

Ainda que M β L não interfiram diretamente com a atividade de quaisquer desses antimicrobianos testados, a presença de integrons de classe 1, os quais podem conter genes determinantes de resistência aminoglicosídeos, foi verificada em unidades hospitalares de tratamento intensivo (SEVERINO; MAGALHÃES, 2002). Nestes ambientes, integrons de classe 1 são encontrados com frequência de até 100% em isolados de *P. aeruginosa* produtoras de M β L conforme Carvalho e colaboradores (2006) e com frequência de até 42% em isolados não produtores, mas que apresentam fenótipo de multirresistência, conforme Fonseca e colaboradores (2005).

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE MULTIRRESISTÊNCIA E A PRESENÇA DE METALO- β -LACTAMASES

Comparando a suscetibilidade entre os isolados, foi possível distinguir um grupo de 27 isolados com sensibilidade, no máximo, a dois antimicrobianos (64,3%; 27/42). Esses, foram subdivididos em 3 grupos: I – isolados sensíveis somente à COL (4,8%; 2/42); II – isolados

sensíveis à COL e com suscetibilidade reduzida ao ATM (30,9%; 13/42) e; III – isolados sensíveis a COL e ATM (28,6%; 12/42). A Tabela 9 apresenta a distribuição dos 27 isolados dentro dos três perfis estabelecidos acima.

Tabela 9 – Perfil de suscetibilidade segundo a produção de MβL dos 27 isolados mais resistentes deste estudo.

Perfil de Suscetibilidade ¹	%	η de Isolados	DDST ²	Isolado(s)
I	4,8	2	+	P33
			-	P18
II	31,0	13	+	P02, P17, P22, P36, P38, P49, P55, P59, P63, P87
			-	P08, P14, P68
III	28,6	12	+	P23, P25, P26, P43, P50, P52, P73, P74, P79, P82, P88
			-	P70

¹I: Isolados de *P. aeruginosa* sensíveis somente à colistina (COL); II: Isolados de *P. aeruginosa* sensíveis à COL e ao aztreonam (ATM); III: Isolados de *P. aeruginosa* sensíveis à COL e com suscetibilidade reduzida ao ATM. ²*Double-Disk Sinergy Test*.

Como já mencionado, a presença de MβL não foi um critério indispensável aos isolados que apresentaram altas frequências de resistência, porém, foi possível associar positivamente a presença desta enzima aos isolados com os perfis mais resistentes desta amostragem. Os valores obtidos para esta associação foram de $p = 0,00001274$ (p -value [1-tail]; *OpenEpi*, Version 2, open source calculator—*TwoByTwo*). Ainda nesse sentido, os riscos estimados para a associação entre MβL e um dos três perfis multirresistentes mencionados acima foi de 91,67% (IC95% = 73,00 – 98,84), a uma razão 3,3 vezes superior (IC95% = 1,552 – 7,018) ao risco obtido para os isolados não produtores desta enzima (Anexo K). Assim, 81,48% (22/27; IC95%: 63,62 – 92,88) desses isolados foram produtores de MβL. Ou ainda, os produtores dessa enzima corresponderam a 63,3% (11/15) dos isolados quando estes eram sensíveis somente à COL ou apresentavam suscetibilidade reduzida ao ATM (perfis I e II) e 91,7% (11/12) quando apresentavam suscetibilidade a ambos os antimicrobianos (perfil III).

Estes índices estão de acordo com a descrição de Zavascki e colaboradores (2007), na qual, a presença de MβL também pôde ser

associada a esses perfis de multirresistência. Nesse estudo, 80,5% (33/41) dos isolados de *P. aeruginosa* sensíveis somente à polimixina B (compatível à COL) eram produtores de M β L ou o eram em 95,7% dos casos quando sensíveis também ao ATM. Em outro estudo onde a associação de M β L com esses perfis de multirresistência pôde ser identificada, foi observado que, de 108 isolados de *P. aeruginosa*, 99 foram enquadrados como multirresistentes e do total, 42,6% (46/108) foram sensíveis somente a COL. Vinte e sete (58,7%; 27/46) dos isolados com este último perfil produziam M β L (CIPRIANO *et al.*, 2007). Já no estudo de Scheffer e colaboradores (2010), o qual foi conduzido com 23 (79,3%) isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*, de uma amostragem de 29 isolados resistentes aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos, apenas dois isolados apresentaram um dos três perfis multirresistentes destacados acima e somente um isolado produzia M β L.

4.5.1. Avaliação dos critérios de seleção da amostragem e a presença indicativa de M β L

Revisando a literatura sobre a incidência de M β L em isolados de *P. aeruginosa*, observa-se que os critérios utilizados pelos autores para a seleção de suas amostragens são bastante variáveis. Em alguns trabalhos, os isolados selecionados apresentaram resistência somente à CAZ, em outros, resistência ou suscetibilidade reduzida a IPM e MEM e ainda, resistência aos três antimicrobianos citados (SCHEFFER *et al.*, 2010; GRÄF; FUENTEFRIA; CORÇÃO, 2008; MARTINS *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2006; MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005; SADER *et al.*, 2005a; ZAVASCKI *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2003).

Na fase inicial deste estudo foi utilizado como critério para a seleção dos isolados de *P. aeruginosa* com possibilidade de produção de M β L, a resistência simultânea a IPM, MEM e CAZ como característica do perfil de hidrólise destas enzimas determinada pelo teste de difusão em gel à ocasião da identificação dos isolados (WALSH *et al.*, 2005; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; TOLEMAN *et al.*, 2002). No entanto, alguns isolados que estavam preservados sob criogenia e que, posteriormente foram subcultivados para a avaliação de suas suscetibilidades através das CIM obtidas pelo sistema Vitek® 2, tiveram seus perfis de suscetibilidade alterados, particularmente em relação aos antimicrobianos betalactâmicos. Esses isolados, apesar de não se enquadrarem mais nos critérios adotados para a seleção da amostragem,

não foram excluídos de suas análises posteriores. Assim, de acordo com o critério adotado no presente estudo, dentro dos 42 isolados selecionados pelo teste de difusão, 9 seriam excluídos, ou seja, restariam 33 isolados que mantiveram sua resistência à CAZ, IPM e MEM. Avaliando-se a amostragem total, dos 42 isolados de *P. aeruginosa*, 57,14% (24/42; IC95%: 41,94 - 71,39; $p = 0,4971$; onde o valor de p [*I-tail*] foi estimado pela correção *Mid-P Exact* do processador *on-line OpenEpi Version 2, open source calculator--PersonTime2* e valores de p significativos são inferiores a 0,05) foram produtores de M β L segundo os DDST. Enquanto que, dos 33 isolados que persistiram com o perfil inicial de resistência após a determinação das CIM, 72,72% (24/33; IC95% = 55,81 – 85,8; $p = 0,0351$) foram produtores desta enzima. A correlação positiva entre os resultados da CIM e a produção de M β L pelos DDST, não significa necessariamente que os métodos dilucionais são uma técnica mais confiável que o teste de difusão em gel, mas sim, sugere que estes microrganismos possam ter deixado de expressar mecanismos determinantes de resistência a esses antimicrobianos, especialmente, mecanismos intrínsecos à *P. aeruginosa*.

Nicolau e colaboradores (2010 *apud* XAVIER, 2010), preconizaram que isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L são organismos não sensíveis a IPM, MEM, CAZ, FEP e PTZ e sensíveis à ATM. Segundo este critério, os autores detectariam a presença de M β L em 12 de 13 isolados selecionados. Contudo, outros 12 isolados não sensíveis à ATM também apresentaram produção desta enzima, descredenciando a adoção deste critério para esta amostragem.

Ainda analisando a amostragem por nós estudada, foi possível constatar que somente nos casos onde foi considerada a resistência persistente à CAZ é que se pôde observar uma correlação significativa entre os isolados detentores desses perfis de suscetibilidade e a produção de M β L. Ou seja, se fosse considerada apenas a resistência à CAZ, a proporção seria a mesma observada para os isolados simultaneamente resistentes a IPM, MEM e CAZ (72,72%; 24/33; $p = 0,0351$). Mas, se considerados apenas os isolados resistentes ou apresentando suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos carbapenêmicos, a proporção de isolados produtores de M β L seria de 58,54% (24/41; IC95% = 43,12 – 72,78; $p = 0,4322$), demonstrando a importância de utilizar a resistência a CAZ como marcador na pesquisa epidemiologia de M β L em isolados de *P. aeruginosa*.

Após esta constatação e objetivando melhorar os critérios de seleção para essa pesquisa epidemiológica, ao ser considerada a resistência também à FEP, a proporção de isolados produtores de M β L

elevou-se para 77,42% (24/31; IC95%: 60,36 – 89,55; $\rho = 0,0105$) em isolados simultaneamente resistentes a IPM, MEM, CAZ e FEP e este novo critério foi mais seletivo para predizer a presença desta enzima.

Ainda pode ser sugerido que, a esse novo perfil de resistência, seja incluído outro critério relativo ao nível de resistência, ou seja, a observação de CIM elevadas para os antimicrobianos destacados, especialmente para CAZ e FEP. No presente estudo, se considerarmos esse perfil de suscetibilidade e o nível de resistência, a presença de M β L somente não seria corretamente indicada em 4 isolados (P03, P08, P14 e P68), obtendo um valor de $\rho < 0,001$ a uma proporção de 85,71% (24/28; IC95%: 69,05 – 95,29). Esta combinação adicional é um dos critérios utilizados pelo sistema Vitek® 2 ao comparar o fenótipo integral de resistência de um isolado testado (CIM obtidas para todos os antimicrobianos testados) ao seu banco de dados de fenótipos conhecidos (PASTERAN *et al.*, 2011; SOLOAGA, 2010). Desses 4 isolados, também 3 (P08, P14 e P68) não foram discriminados pelo sistema Vitek® 2 como não produtores de M β L, mas o sistema indicou a possibilidade da presença desta ou outra carbapenemase.

Por fim, o reconhecimento desse fenótipo ou perfil de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, ou seja, um isolado de *P. aeruginosa* simultaneamente resistente a IPM, MEM, CAZ e FEP estando esse perfil associado à CIM elevadas para esses mesmos antimicrobianos, pode ser utilizado como um critério mais apurado na seleção amostral de isolados dessa espécie para pesquisa da produção de M β L como principal mecanismo mediador de resistência aos carbapenêmicos, ou ainda, como o perfil de suscetibilidade típico da presença dessas enzimas.

4.6. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS SEGUNDO A PRESENÇA DE GENES CODIFICADORES DE METALO- β -LACTAMASES

Dos 42 isolados de *P. aeruginosa*, 35 foram estudados quanto a presença dos alelos gênicos *blas*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1}, uma vez que 7 isolados (P17, P22, P23, P25, P33, P36, P66) perderam a viabilidade antes da realização dos testes moleculares. O gene da subclasse IMP (alelo *bla*_{IMP-1}) foi detectado em apenas um isolado (P16), enquanto que a presença do gene codificador da enzima SPM-1 pôde ser verificada em 18 isolados (Quadro 5).

Isolado ¹	DDST ²	PCR ³	Isolado ¹	DDST ²	PCR ³
P01	-	-	P51	-	-
P02	+	<i>bla</i> _{SPM-1}	P52	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P03	-	-	P55	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P04	-	-	P59	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P07	-	-	P63	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P08	-	-	P68	-	-
P13	-	-	P70	-	-
P14	-	<i>bla</i> _{SPM-1}	P73	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P16	-	<i>bla</i> _{IMP-1}	P74	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P18	-	-	P79	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P20	-	-	P80	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
P26	+	-	P82	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P27	-	-	P83	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
P30	-	-	P84	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P38	+	<i>bla</i> _{SPM-1}	P87	+	-
P43	+	<i>bla</i> _{SPM-1}	P88	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
P49	+	<i>bla</i> _{SPM-1}	P91	-	-
P50	+	<i>bla</i> _{SPM-1}			

Quadro 5 – Correlação entre os resultados das PCR e dos DDST para 35 isolados de *P. aeruginosa* estudados.

¹Isolados de *P. aeruginosa*. ²Double-Disk Synergy Test. ³Polimerase Chain Reaction. “+” – DDST positivo; “-” – DDST ou PCR negativos; “*bla*_{SPM-1}” – Alelo gênico amplificado (fragmento de 650 kb).

Dos isolados que tiveram a presença de MβL confirmada molecularmente, 15 (78,95%; IC95%: 56,68 – 92,93) tiveram esta informação predita pela detecção fenotípica de MβL através dos DDST e, adicionalmente, outro isolado (P14) foi probabilizado como produtor desta ou outra carbapenemase pelo sistema Vitek® 2.

Em dois isolados, P26 e P87, onde os testes fenotípicos combinados identificaram a produção de MβL, isto é, tanto a observação de sinergismo nos DDST, quanto à apresentação do perfil de suscetibilidade típico, não houve amplificação de qualquer produto. O que pode ser devido, entre outros fatores, à perda espontânea de material genético previamente à realização das reações em cadeia da polimerase (PCR) ou à presença de outras MβL não contempladas pelos dois pares de iniciadores utilizados para a detecção dos genes destas enzimas (MARTINS *et al.*, 2007). Em outros quatro isolados, P14, P16, P80 e P83, pelo contrário, houve a detecção de genes correspondentes às MβL pertencentes à subclasse SPM-1 e IMP-1 sem qualquer sinergismo ou

com resultados inconclusivos nos DDST. De tais isolados, P14 e P16 foram considerados negativos pelo DDST, embora o isolado P14 tenha apresentado um perfil de suscetibilidade consistente com a produção de M β L. O isolado P16, o único isolado em que foi detectada a presença da subclasse IMP-1, não houve qualquer indicação fenotípica que pudesse identificá-lo como produtor dessa enzima, isto é, nem sinergismo no DDST, nem um perfil de suscetibilidade típico. Os outros dois isolados (P80 e P83) foram considerados inconclusivos pelos testes fenotípicos, já que, apesar de algum sinergismo nos DDST, não apresentaram nem resistência a CAZ, quesito da padronização do teste de DDST aplicado, nem perfil de suscetibilidade compatível com a produção de M β L.

A presença dos alelos *blas_{SPM-1}* e *bla_{IMP-1}* *per se* nos isolados P16, P80 e P83, os quais, embora tenham se apresentado resistentes aos carbapenêmicos, não condisse com o perfil de suscetibilidade típico de isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L, já que os três isolados foram sensíveis à FEP e apenas um (P16) apresentou sensibilidade reduzida à CAZ. A resistência aos carbapenêmicos pode ser devida a outros mecanismos que não necessariamente à produção de M β L (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009; GISKE *et al.*, 2008b; WALSH, 2008; HAMMANI *et al.*, 2008; DOI *et al.*, 2007). Situações semelhantes já foram descritas na literatura para ambos os genes, embora os isolados em que foram detectados apresentassem sensibilidade à IPM. A ausência da produção destas enzimas pode ser devido a incompatibilidades de expressão plasmidial, onde se encontram os genes da subclasse SPM-1, ou devido à promoção insuficiente do gene, no caso do gene da subclasse IMP-1, o qual está usualmente associado a integrons de classe 1. Todavia, isolados sensíveis podem funcionar como reservatórios silenciosos desse mecanismo de resistência, podendo vir a ser expressos em ambientes genéticos mais favoráveis (PENTEADO *et al.*, 2009; PELLEGRINO *et al.*, 2008; SADER *et al.*, 2005a).

Por fim, houve concordância entre os resultados genotípicos e os DDST em 29 (82,86%; IC95%: 67,72 – 92,75) dos 35 isolados de *P. aeruginosa* estudados.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste estudo permitiram concluir que as M β L são o mecanismo responsável pela resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, bem como a outros betalactâmicos, em mais da metade dos isolados selecionados. Também, que a avaliação fenotípica através de um único teste rotineiro, aliado à observação das suscetibilidades a antimicrobianos betalactâmicos considerados como marcadores de um perfil de suscetibilidade típico, pode resultar em detecções precisas deste mecanismo de resistência. Assim:

- A amostragem estudada foi caracteristicamente composta por microrganismos multirresistentes. Aproximadamente 90% dos isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos imipenem (IPM) e meropenem (MEM), bem como à penicilina combinada com inibidor de betalactamases, piperacilina/tazobactam e à fluoroquinolona ciprofloxacina; 80% foram resistentes às cefalosporinas ceftazidima (CAZ) e cefepima (FEP) e aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina; e todos foram sensíveis à colistina.
- A proporção de isolados considerados produtores de M β L através dos DDST foi de aproximadamente 73% quando os mesmos apresentam resistências simultâneas a IMP, MEM e CAZ, demonstrando que este critério foi mais seletivo para prever a presença de M β L. Quando os valores encontrados para as CIM foram elevados e os isolados ainda apresentavam resistência à FEP, foi possível agregar um valor ainda mais significativo à associação entre a produção de M β L e esse perfil de suscetibilidade. Aproximadamente 86% (24/28) dos isolados com este fenótipo produziam essa enzima, demonstrando que este foi o fenótipo característico em isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L .
- Dos trinta e cinco isolados estudados através de PCR, verificou-se que os genes *blas*_{PM-1} e *bla*_{IMP-1} estavam presentes em quinze de dezenove isolados previamente indicados como produtores desta enzima pelos DDST.
- Os isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L apresentaram suscetibilidade significativamente inferior aos antimicrobianos betalactâmicos CAZ, FEP e MEM, bem como aos antimicrobianos não betalactâmicos AMK, GEN e CIP, quando

comparados aos isolados não produtores dessa enzima através dos DDST.

- Aproximadamente 82% (22/27) dos isolados sensíveis a, no máximo, COL e ATM produziam MβL segundo a detecção dos DDST, o que associou positivamente a presença dessa enzima aos isolados mais resistentes deste estudo. Esta associação sugere que a aquisição de genes que codificam MβL em isolados de *P. aeruginosa* pode ocorrer através da aquisição de uma construção gênica extracromossomal comum a outros genes determinantes de resistência. Por exemplo, um plasmídeo que contenha a ambos, isto é, o gene da MβL associado ou não a genes determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos.
- A avaliação das suscetibilidades da amostragem selecionada e a demonstração da presença de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes em ambientes de caráter hospitalar e ambulatorial contribuiu para a epidemiologia catarinense, particularmente para a região metropolitana de Florianópolis.
- O sistema Vitek® 2, por ter apresentado excelente correlação com os DDST, poderá futuramente representar uma ferramenta muito útil na identificação de isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* que expressam carbapenemases como mecanismos determinantes de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos carbapenêmicos.
- Mais de 80% dos isolados (20/24) de *P. aeruginosa* considerados produtores de MβL foram recuperados a partir de pacientes provenientes de 3 dos 7 ambientes analisados. As instituições A, D e E poderiam ser incluídas como objetos de futuros estudos epidemiológicos nesse sentido.

REFERÊNCIAS

ABBANAT, D.; MORROW, B.; BUSH, K. **New agents in development for the treatment of bacterial infections.** *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8:582–592.

AKINCIA, E. *et al.* **Risk factors for ICU-acquired imipenem-resistant Gram-negative bacterial infections.** *Journal of Hospital Infection*, 2005, 59:317–323.

ANDRADE, S. S. *et al.* **Influence of disk preparation on detection of metallo- β -lactamases-producing isolates by the combined disk assay.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45:2058-2060.

ANDRADE, S.S. *et al.* **Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001).** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52:140–141.

AOKI, H.; OKUHARA, O. **Natural β -lactam antibiotics.** *Annual Reviews Microbiology*, 1980, 34:159-181.

ARAKAWA, Y. *et al.* **Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38:40-3.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. **Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge.** *New England Journal of Medicine*, 2009, 360:439-443.

AUBERT, D. *et al.* **Oxacilinase-Mediated Resistance to Cefepime and Susceptibility to Ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, jun. 2001, 45(6):1615-1620.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. **Uma revisão sobre metalo- β -lactamases.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2008, 44(4):577-599.

bioMérieux (2008). **VITEK® 2 Gram Negative Susceptibility Card – AST-N105**, REF 22262-P1ML1.

BOS, M.P.; ROBERT, V.; TOMMASSEN, J. **Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane.** *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61:191–214.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS).** DATASUS: Início > Informações de Saúde > Epidemiológicas e Morbidade. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niSC.def>; Data de acesso: 2 de fevereiro de 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. **A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure,** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, p. 1211–1233.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. **Updated Functional Classification of β -Lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2010, 54(3):969–976.

CAMPANA, E. H. **A Resistência Antimicrobiana em *Acinetobacter spp.*: A pesquisa a serviço da prática clínica.** In: *Resistência bacteriana: do teste de sensibilidade à biologia molecular.* LEMC. São Paulo, 2010.

CARVALHO, A.P.A. *et al.* **Characterization of an Epidemic Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1 Metallo- β -Lactamase in a Hospital Located in Rio de Janeiro, Brazil.** *Microbial Drug Resistance*, 2006, 12(2):103-108.

CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; LIVERMORE, D.M. **Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 63:426–433.

CASTANHEIRA, M. *et al.* **Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, dez. 2004, 48(12):4654–4661.

CHU, Y.W. *et al.* **EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem–EDTA disk method.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, 26:338–341.

CIPRIANO, R. *et al.* **Coexistence of Epidemic Colistin-Only-Sensitive Clones of *Pseudomonas aeruginosa*, Including the *bla*_{SPM} Clone, Spread in Hospitals in a Brazilian Amazon City.** *Microbial Drug Resistance*, 2007, 13(2): 142-146.

CLSI (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement.** CLSI document M100-S21. Wayne, PA.

CLSI (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement (June 2010 update).** CLSI publication M100-S20-U. Wayne, PA.

CLSI (2009a). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M2-A10.** Wayne, PA.

CLSI (2009b). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19.** Wayne, PA.

CLSI (2009c). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition. CLSI document M7-A8.** Wayne, PA.

CLSI (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18.** Wayne, PA.

COATES, A.; HU, Y. **Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections.** British Journal of Pharmacology, 2007, 152:1147–1154.

DANCER S. J., SHEARS P., PLATT D. J. **Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic.** Journal of Applied Microbiology, 1997, 82(5):597–609.

DOI, Y. *et al.* **High Prevalence of Metallo- β -Lactamase and 16S rRNA Methylase Coproduction among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Brazil.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(9):3388–3390.

DONADIO, S. **Targets and assays for discovering novel antibacterial agents.** Journal of Biotechnology, 2002, 99:175-185.

ENK, R. A. V. **Why Antibiotics Don't Work: Antibiotic Resistance Mechanisms**. Bronson Healthcare Group, Kalamazoo, 2005. Disponível em: <<http://www.asmaudio.org/200511/200511.pdf>>.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Clinical Breakpoint Table. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Versão 1.1, 2010.

Etest® MBL. For **In Vitro Detection of Metallo-Beta-Lactamases**. bioMérieux Clinical Diagnostics. Disponível em <http://www.abbiotest.com/pdf/pi/75001546.PDF>; data de acesso, 26 de março de 2011.

FALAGAS, M.E.; KOPTERIDES, P. **Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature**. Journal of Hospital Infection, 2006, 64:7-15.

FONSECA, E.L. *et al.* **Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil**. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2005, 44:303–309.

FONSECA, E.L.; FREITAS, F.S.; VICENTE, A.C.P. **The Colistin-Only-Sensitive Brazilian *Pseudomonas aeruginosa* Clone SP**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(6):2743.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Host-microorganism Interactions**. In: BAILEY & SOCOTT'S Diagnostic Microbiology, Ed. Mosby, 11th ed., Missouri, 2002.

FRAIMOW, H.S.; TSIGRELIS, C. **Management of Specific Resistant Pathogens**. Critical Care Clinic, 2011, 27:163–205.

FRANCO, M.R.G. **Detecção de Metallo- β -lactamases em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecções sistêmicas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.** Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FRESCHI, C.R., CARVALHO, L.F.O.S., OLIVEIRA, C.J.B. **Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by Polymerase Chain reaction (PCR).** Brazilian Journal of Microbiology, 2005, 36:363-67.

FRITSCHÉ, T.R. *et al.* **Emerging Metallo-b-Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Clinical Infectious Diseases, 2005, 41:S276-8.

GALES, A. *et al.* **Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52:699-702.

GARCIA, A. S. **Patrones de sensibilidad a antibióticos em aislados clínicos de *Escherichia coli* produtoras de betalactamasas de espectro extendido e su relación com la expresión de porinas.** Tese (doutorado). Universidad de Granada, Granada, 2007.

GASPARETO, P. B. **Pesquisa de genes de Metallo- β -Lactamases em *Pseudomonas aeruginosas* isoladas em três hospitais universitários de Porto Alegre.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

GIAKKOUPÍ, P. *et al.* **VIM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals.** Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(8):3893-3896.

GIAMARELLOU, H., KANELLAKOPOULOU, K. **Current Therapies for Pseudomonas Aeruginosa.** Critical Care Clinics, 2008, 24:261–278.

GILLHAM, M.I. *et al.* **Variable antibiotic susceptibility in populations of Pseudomonas aeruginosa infecting patients with bronchiectasis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, 63:728–732.

GISKE, C.G. *et al.* (a). **Minireview: Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, p. 813–821.

GISKE, C.G. *et al.* (b). **Alterations of Porin, Pumps, and Penicillin-Binding Proteins in Carbapenem Resistant Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa.** Microbial Drug Resistance, 2008, 14(1):23–30.

GHUYSEN, J.M.; GOFFIN, C. **Lack of Cell Wall Peptidoglycan versus Penicillin Sensitivity: New Insights into the Chlamydial Anomaly.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Oct. 1999, 43:2339–2344.

GRÄF, T., FUENTEFRIA, D.B., CORÇÃO, G. **Occurrence of multiresistant strains of Pseudomonas aeruginosa producing metallo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} in clinical samples.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, mai-jun, 2008, 41(3):306–308.

HAMMANI, S. *et al.* **Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from a Tunisian hospital,** 2008, Pathologie Biologie, doi:10.1016/j.patbio.2008.09.001.

HARBOTTLE *et al.*, **Genetics of antimicrobial resistance**. *Animal Biotechnology*, 2006, 17: 111–124.

HARMSSEN, M. *et al.* **An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal**. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2010, 59: 253–268.

HELFAND, M.S.; BONOMO, R.A. **Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens**. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, 5:452–458.

INGLATERRA. *Department of Health Advisory Committee on Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infection. Advice on carbapenemases producers: recognition, infection control and treatment*. ARHAI, 2011. Disponível em <http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1294740725984> Acesso em 3 de março de 2011.

JACOBY, G. A. **Minireview – β -Lactamase Nomenclature**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, abr. 2006, 50(4):1123–1129.

JARLIER, V. *et al.* **Extended Broad-Spectrum β -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer β -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns**. *Clinical Infectious Diseases*, 1988, 10(4):867-878.

JOYANES, P. *et al.* **Evaluation of the VITEK 2 System for the Identification and Susceptibility Testing of Three Species of Nonfermenting Gram-Negative Rods Frequently Isolated from Clinical Samples**. *Journal of Clinical Microbiology*, set. 2001, 39(9):3247–3253.

KAMINSKAIA, N.V.; SINGLER, B.; LIPPARD, S.J. **Intermediate in β -Lactam Hydrolysis Catalyzed by a Dinuclear Zinc(II) Complex: Relevance to the Mechanism of Metallo- β -lactamase.** Journal of American Chemical Society. 2001, 123(27):6555-6563.

KIM, S.Y. *et al.* **Convenient Test Using a Combination of Chelating Agents for Detection of Metallo- β -Lactamases in the Clinical Laboratory.** Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(9):2798–2801.

KUMARASAMY, K. K. *et al.* **Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study.** Lancet Infection Diseases, 2010, 10: 597–602.

LANDMAN, D. *et al.* **Polymyxins Revisited.** Clinical Microbiology Reviews, 2008, 21(3):449–465.

LANDMAN, D. *et al.* **Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 55(6):954–957.

LOCKHART, S.R. *et al.* **Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacilli Causing Infections in Intensive Care Unit Patients in the United States between 1993 and 2004.** Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45:3352–3359.

LINDSAY, J.A.; HOLDEN, M.T.G. **Staphylococcus aureus: superbug, super genome?** TRENDS in Microbiology, Aug. 2004, 8:378-385.

LEE, K. *et al.* **Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. And**

***Acinetobacter* spp.** Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(10):4623-4629.

LEVY, S.B. **Antibiotic resistance—the problem intensifies.** Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57:1446– 1450.

LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. **Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms.** Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(4):582-610.

LIVERMORE, D.M. **Defining an extended-spectrum b-lactamase,** Clinical Microbiology Infection, 2008, 14 (Suppl. 1):3–10.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. **The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.** Trends in Microbiology, 2006, 14(9):413-420.

LIVERMORE, D. M. **Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology and Impact.** Clinical Infectious Diseases, 2003; 36(Suppl 1):S11–23

LIVINGSTONE, D., *et al.* **Mechanisms of resistance to carbapenems.** J. Antimicrob. Chemotherapy, 1995, 35:1–5.

LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. **The role of the medicinal chemist in drug discovery – Then and now.** Nature Reviews: Drug Discovery, 2004, 3: 853-862.

MACEDO, M. de L. de A. P. *et al.* **Mecanismos de resistência e detecção das β -lactamases,** UNOPAR Científica, 2005, 7(1):59-63.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10^a ed., Prentice Hall, São Paulo, 2004.

MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ, G. *et al.* **Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions**. FEMS Microbiology Letters, 2004, 235:1–8.

MAGALHÃES, V.; LINS, A.K.; MAGALHÃES, M. **Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated in Hospitals in Recife, PE, Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology, 2005, 36:123-125.

MARRA, A. R. *et al.* **Bloodstream Infections with Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(1):388–390.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. **Extended-spectrum b-lactamases and the permeability barrier**. Clinical Microbiology Infection, 2008; 14 (Supl. 1): 82–89.

MARTINEZ, J.L. **The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria**. Proceedings of the Royal Society B, 2009, 276:2521–2530.

MARTINS, A.F. *et al.* **Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil**. Infection, 2007; 35(6):457–460.

MASTORAKI, A. *et al.* ***Pseudomonas aeruginosa* susceptible only to colistin in Intensive Care Unit patients**. Surgical Infections, 2008, 9(2):153-160.

MAZZARIOL, A. *et al.* **Performance of Vitek 2 in Antimicrobial susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Different Mechanisms of β -Lactam Resistance.** Journal of Clinical Microbiology, jun. 2008, 46(6):2095–2098.

MAZEL, D., DAVIES, J. **Antibiotic resistance in microbes.** Cellular Molecular Life Science, 1999, 56: 742–754.

MENDES, R.E. *et al.* **Rapid Detection and Identification of Metallo- β -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis.** Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(2):544–547.

MENDES, R. E. *et al.* **Metallo- β -lactamases.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2006, 42(2):103-113.

MENDES, R. E. **Caracterização dos elementos genéticos móveis responsáveis pela disseminação de genes associados à resistência bacteriana em *Pseudomonas* spp. isoladas na América Latina.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.

MENDES, R.E. *et al.* **The emergence of VIM-2 in Latin American Hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** ECCMID, 2004a, Pôster P1872.

MENDES, R.E. *et al.* **Integron Carrying a Novel Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{IMP-16}, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004b, 48(12):4693–4702.

MEROUEH, S.O. *et al.* **Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan.** PNAS, mar. 2006, 103(12):4404–4409.

MESAROS N. *et al.* ***Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium.** *Clinical Microbiology Infection* 2007; 13: 560–578.

MIYAJIMA, Y. *et al.* **In vitro and in vivo potency of polymyxin B against IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 32:437–440.

MOALI, C. *et al.* **Analysis of the Importance of the Metallo- β -Lactamase Active Site Loop in Substrate Binding and Catalysis.** *Chemistry & Biology*, abr. 2003, 10:319–329.

MOIR, D. T. *et al.* **Genomics and Antimicrobial Drug Discovery.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 1999, p. 439–446

MOLAND, E. S. *et al.* **Newer β -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part II.** *Clinical Microbiology Newsletter*, 2008, 30(11):79-85.

NAGANO, R. *et al.* **Carbapenem Derivatives as Potential Inhibitors of various β -lactamases, including Class B Metallo- β -Lactamases,** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct. 1999, 43(10):2497–2503.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4th ed., NY:W. H. Freeman & Co, 2004.

NOGUEIRA, C.A.M. *et al.* **Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano.** *Revista Panamericana de Infectología*, 2004, 6(2):35-8.

NORDMANN, P. *et al.* (a). **Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of**

infections caused by Gram-negative bacteria? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 28 de janeiro de 2011, Advance Access published, doi:10.1093/jac/dkq520. Disponível em <jac.oxfordjournals.org>. Acesso em 8 de fevereiro de 2011.

NORDMANN, P. *et al.* (b). **How to detect NDM-1 producers.** Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(2): 718–721.

NORDMANN, P. **Mechanism of resistance to betalactam in *Pseudomonas aeruginosa*.** Annues France Anes Réanimat, 22:527-30, 2003.

OPLUSTIL, C.P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 3ª Ed., São Paulo:Sarvier, 2010.

O'SHEA, R.; MOSER, H.E. **Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery.** Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51(10):Perspective.

OTO-KARG, I. *et al.* **Validation of Vitek 2 Nonfermenting Gram-Negative Cards and Vitek 2 Version 4.02 Software for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Nonfermenting Gram-Negative Rods from Patients with Cystic Fibrosis.** Journal of Clinical Microbiology, out. 2009, 47(10):3283–3288.

PAGÈS, J.; JAMES, C.E.; WINTERHALTER, M. **The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria.** Nature Reviews: microbiology, Dec. 2008, 6:893-903.

PASTERAN, F. *et al.* **Can We Use Imipenem and Meropenem Vitek 2 MICs for Detection of Suspected KPC and Other-Carbapenemase Producers among Species of *Enterobacteriaceae*?** Journal of Clinical Microbiology, fev. 2011, 49(2):697–701.

PAYNE, D. J. *et al.* **Identification of a Series of Tricyclic Natural Products as Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Metallo- β -Lactamases**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, jun. 2002, 46(6):1880–1886.

PAYNE, D. J. *et al.* **Inhibition of Metallo- β -Lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 1:135-140.

PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* **A carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain carrying the *bla*_{SPM} gene**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 61:214–216.

PENTEADO, A. P. *et al.* **Dissemination of *bla*_{IMP-1}-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr23***. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 63(1):87–91.

PEREZ, F. *et al.* **Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct. 2007, 51(10):3471-3484.

PETTI, C. A.; CARROLL, K.C.; REIMER, L.G. **Procedures for the Storage of Microorganisms**. *In: Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, v. 1, Washington:ASM Press, 2007.

PICÃO, R.C. **Resistência bacteriana em Enterobactérias: A pesquisa a serviço da prática clínica**. *In: Resistência bacteriana: do teste de sensibilidade à biologia molecular*. LEMC. São Paulo, 2010.

PICÃO, R.C. *et al.* **Metallo- β -Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-Producing Isolates**. *Journal of Clinical Microbiology*, jun. 2008, 46(6):2028-2037.

PICÃO, R.C. *et al.* **Diversity of β -Lactamases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Causing Bloodstream Infections in Brazil.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(9):3908–3913.

PICÃO, R.C. **Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.** Tese (doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

POLLINI, S. *et al.* ***Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Caused by an Epidemic Metallo- β -Lactamase-Producing Clone with an Heterogeneous Carbapenem Resistance Phenotype.** *Clinical Microbiology and Infection*, Artigo aceito em 26 de dezembro de 2010, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03466.x

POOLE, K. **Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria.** *Current Opinion Investigation Drugs*, 2003, 4:128–139.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**, 5th Edition, NY:The McGraw–Hill Companies, 2002.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. **Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases.** *Clinical Microbiology Reviews*, jul. 2007, p. 440-458.

RICE, L.B.; BONOMO, R.A. **Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents.** *In: Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, v. 1, Washington:ASM Press, 2007.

REVELL, K.D. *et al.* **N-thiolated b-lactams: Studies on the mode of action and identification of a primary cellular target in *Staphylococcus aureus*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15:2453–2467.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**, São Paulo:Atheneu, 2005.

SADER, H.S. *et al.* (a) **IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital.** *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, 11(1):63-82.

SADER, H. S. *et al.* (b) **Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program**, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, 25:57–61.

SAMPAIO, J.L.M.S. **Mecanismos de ação dos antibióticos.** *In: Antibióticos na Prática Médica*, 6ª ed., São Paulo: Sarvier, 2007.

SAMUELSEN, O. *et al.* **Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61: 827–830

SANTOS FILHO, L. **Determinação da produção de metallo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2002, 38(4):291-296.

SCHEFFER, M.C. *et al.* **Disseminação Intrahospitalar de *Pseudomonas aeruginosa* em Hospital Universitário de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2010, 43(4):367-371.

SCHEFFER, M.C. **Genotipagem e Pesquisa de Metallo-beta-Lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

Resistentes aos carbapenêmicos. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SEKIGUCHI, J.I. *et al.* **KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii*.** Clinical Isolate Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 53(11):4194–4197.

SENDA, K. *et al.* **Multifocal Outbreaks of Metallo-b-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Resistant to Broad-Spectrum β -Lactams, including Carbapenems.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(2):349–353.

SEVERINO, P.; MAGALHÃES, V.D. **The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil.** Research in Microbiology, 2002, 153: 221–226.

SHIN, K.S. *et al.* **Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008, 62:102–105

SILVEIRA, G.P. *et al.* **Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana.** Química Nova, 2006, 29(4):844-855.

SOLOAGA, R. **Susceptibility Test Kit Analysis.** In: 1º Encontro de Usuários Vitek. São Paulo, SP, jun. 2010.

SOULI, M. *et al.* **Clinical Experience of Serious Infections Caused by Enterobacteriaceae Producing VIM-1 Metallo- β -Lactamase in a Greek University Hospital.** Clinical Infectious Diseases, mar. 2008; 46:847–854.

SOUZA, S.M., MONACHA, F.D., SMÂNIA, A.Jr. **Antibacterial activity of coumarins.** *Z. Naturforsch.* 60c, 2005, p. 693-700.

STEIN, D.C. **Principles of Bacterial Pathogenesis.** *In:* Principles of Medical Biology, Volume 9A, Microbiology, 1997.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. ***Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance.** *Journal of Medical Microbiology* 2009, 58:1133–1148.

SWARTZ, M. N. **Minireview: Impact of Antimicrobial Agents and Chemotherapy from 1972 to 1998.** *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, p. 2009–2016, August 2000.

TACCONELLI, E. *et al.* **Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61:26–38.

TAKANO, A.P.R. *et al.* **Contemporary assessment on prevalence of Metallo- β -Lactamases encoding genes in a Brazilian tertiary care university hospital.** *ICAAC*, 2005, Pôster C2-100.

TAM, V.H. *et al.* **Prevalence, Resistance Mechanisms, and Susceptibility of Multidrug-Resistant Bloodstream Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, mar. 2010, 54(3):1160–1164.

TAM, J.; PITOUT, J.D.D.; GUTTMAN, D.S. **New and Sensitive Assay for Determining *Pseudomonas aeruginosa* Metallo-Beta-Lactamase Resistance to Imipenem.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(5):1870–1872.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 2009.

THOMSON, J.M.; BONOMO, R.A. **The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!** Current Opinion in Microbiology, 2005, 8:518–524.

TODER, D.S. ***Pseudomonas aeruginosa*: um patógeno ubíquo**. In: Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas, 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

TOLEMAN, M.A. *et al.* **Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 50:673–679.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. **The natural products and the modern medicinal chemistry**. Química Nova, 2006, 29(2):33-40.

WALSH, C. **Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance**. Nature, Ago. 2000, 406:775-781.

WALSH, T.R. **Clinically significant carbapenemases: an update**. Current Opinion in Infectious Diseases 2008, 21:367–371.

WALSH, T.R. **Combinatorial genetic evolution of multiresistance**. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9:476–482.

WALSH, T.R. *et al.* **Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm?** Clinical Microbiology Reviews, abr. 2005, p. 306–325.

WALSH, F.M.; AMYES, S.G.B.; **Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens.** *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7:439–444.

WATANABE, M. *et al.* **Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1991, 35(1):147–151.

WINN, Jr., W.C. *et al.* **Introduction to Microbiology: Part I.** *In: Koneman's, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed., Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

WIRTH, F.W. *et al.* **Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2009, 13(3):170-172.

XAVIER, D.E. ***Pseudomonas aeruginosa*.** *In: Resistência bacteriana: do teste de sensibilidade à biologia molecular.* Anais eletrônicos. LEMC. São Paulo, 2010.

XU, D. *et al.* **Catalytic Mechanism of Class B2 Metallo- β -lactamase,** *The Journal of Biological Chemistry*, mar. 2006, 281(13):8740–8747.

YAMAGUCHI, Y. *et al.* **Probing the Role of Asp-120(81) of Metallo- β -lactamase (IMP-1) by Site-directed Mutagenesis, Kinetic Studies, and X-ray Crystallography,** *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(21):20824–20832.

YONG, D. *et al.* **Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.** *Journal of Clinical Microbiology*, out. 2002, 40(10):3798–3801.

ZANOL, F.M.; PICOLI, S.U.; MORSCH, F. **Detecção fenotípica de metalo-beta-lactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul.** Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial, 2010, 46(4):309-314.

ZAVASCKI, A.P. *et al.* **High prevalence of metallo- β -lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital.** Epidemiology Infection, 2007, 135:343–345.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* (a). **The influence of metallo-b-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58: 387–392.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* (b). **Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study.** Critical Care, 2006, 10(4): R114 (doi:10.1186/cc5006). Disponível em: <<http://ccforum.com/content/10/4/R114>>, Licensee BioMed Central Ltd.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* (c). **Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase in two tertiary-care teaching hospitals.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58:882–885.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* **Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-b-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56:1148–1151.

ANEXOS

Anexo A – Lista dos 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes estudados segundo suas procedências, sítios de coleta e datas de recuperação.

Isolado¹	Instituição²	Local³	Sítio⁴	Data Coleta
P01	C	UTI	TRI	12/11/2008
P02	D	UTI	TRI	01/01/2009
P03	B	UTI	ITU	01/01/2009
P04	D	UTI	DIV	10/12/2008
P07	G	EMERG	TRI	04/12/2008
P08	Amb	DOMIC	TRI	22/10/2008
P13	Amb	AMB	CIR	31/10/2008
P14	E	UTI	TRI	26/01/2009
P16	D	UTI	ICS	31/01/2009
P17	D	UTI	TRI	14/02/2009
P18	C	UTI	TRI	02/02/2009
P20	E	UTI	TRI	15/02/2009
P22	D	UTI	FER	19/02/2009
P23	D	UTI	TRI	03/03/2009
P25	B	USI	ITU	04/03/2009
P26	D	UTI	ITU	08/03/2009
P27	B	UTI	ITU	26/03/2009
P30	E	UTI	CIR	03/05/2009
P33	B	USI	TRI	28/05/2009
P36	B	USI	TRI	15/06/2009
P38	F	ENF	FER	18/06/2009
P43	E	UTI	CIR	16/07/2009
P49	E	UTI	TRI	23/07/2009
P50	E	UTI	DIV	27/07/2009
P51	A	ALA	TRI	29/07/2009
P52	A	ALA	CIR	30/07/2009
P55	E	UTI	FER	21/08/2009
P59	A	COR	FER	23/08/2009

Isolado¹	Instituição²	Local³	Sítio⁴	Data Coleta
P63	A	UTI	ICS	05/09/2009
P66	A	COR	TRI	24/08/2009
P68	C	UTI	TRI	25/11/2008
P70	C	UTI	ITU	22/11/2008
P73	A	ALA	ITU	16/09/2009
P74	A	ALA	CIR	11/10/2009
P79	E	UTI	TRI	17/11/2009
P80	E	UTI	ITU	20/11/2009
P82	A	ALA	ITU	19/11/2009
P83	Amb	AMB	ITU	24/11/2009
P84	A	ALA	ICS	26/11/2009
P87	A	ALA	ITU	30/11/2009
P88	E	UTI	ITU	29/11/2009
P91	B	CC	CIR	11/12/2009

¹Isolados de *P. aeruginosa*. ²A – Hospital Privado “A”, B – Hospital Público “B”, C – Hospital Privado “C”, D – Clínica Privada “D”, E – Clínica Privada “E”, F – Hospital Público “F”, G – Clínica Privada “G”, Amb – Ambulatório. ³UTI – Unidade de Tratamento Intensivo, EMERG – Emergência (Pronto atendimento e unidade de internação), DOMIC – Coleta Domiciliar (Coleta ambulatorial), AMB – Ambulatorial (Amostra entregue na recepção), USI – Unidade Semi-Intensiva, ENF – Enfermaria, ALA – Ala Hospitalar (Quartos/apartamentos), COR – UTI Coronariana, CC – Centro Cirúrgico. ⁴TRI – Trato Respiratório Inferior, ITU – Infecções do Trato Urinário, CIR – Sítios Cirúrgicos, FER – Feridas, ICS – Infecções da Corrente Sanguínea, DIV – Dispositivos Intra-Vasculares.

Fonte: Banco de cepas do Laboratório Médico Santa Luzia.

Anexo B – Histórico de recuperação de *P. aeruginosa* multirresistentes a partir de espécimes clínicos obtidos do mesmo paciente em que foi obtido o isolado P08.

Isolado ¹	Microrganismo	Data de Coleta	Instituição ²	Sítio ³	Perfil de Suscetibilidade ⁴		
					CAZ	IPM	MEM
*	<i>P. aeruginosa</i>	15/10/2009	Amb	TRI	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	24/11/2008	Amb	TRI	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	31/10/2008	Amb	FER	R	R	R
P08	<i>P. aeruginosa</i>	22/10/2008	Amb	TRI	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	18/09/2008	G	ITU	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	02/09/2008	G	ITU	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	02/09/2008	G	TRI	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	22/08/2008	E	DIV	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	19/08/2008	E	TRI	R	R	R

¹P08: isolado de *P. aeruginosa* avaliado por este estudo; *Isolados de *P. aeruginosa* não incluídos no estudo. ²E – Clínica Privada “E”, G – Clínica Privada “G”, Amb – Ambiente ambulatorial. ³TRI – Trato Respiratório Inferior, ITU – Infecções Urinárias, FER – Feridas, DIV – Dispositivos Intra-Vasculares. ⁴Teste realizado através da metodologia de disco difusão em gel pela rotina microbiológica do LMSL à ocasião do isolamento. Antimicrobianos indicados: CAZ – Ceftazidima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem. Perfil de suscetibilidade: R - Resistente.

Fonte: LIS/LMSL.

Anexo C – Histórico de recuperação de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes a partir de espécimes clínicos obtidos do mesmo paciente em que foi obtido o isolado P13.

Isolado ¹	Microrganismo	Data de Coleta	Instituição ²	Sítio ³	Perfil de Suscetibilidade ⁴		
					CAZ	IPM	MEM
P13	<i>P. aeruginosa</i>	31/10/2008	Amb	CIR	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	29/08/2007	Amb	CIR	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	06/06/2007	Amb	CIR	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	03/07/2006	Amb	ITU	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	24/03/2006	Amb	CIR	R	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	16/01/2005	Amb	CIR	R	R	R

¹P13: isolado de *P. aeruginosa* avaliado por este estudo; *Isolados de *P. aeruginosa* não incluídos no estudo. ²Amb – Ambiente ambulatorial. ³CIR – Sítios Cirúrgicos, ITU – Infecções do Trato Urinário. ⁴Teste realizado através da metodologia de disco difusão em gel pela rotina microbiológica do LMSL à ocasião do isolamento. Antimicrobianos indicados: CAZ – Ceftazidima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem. Perfil de suscetibilidade: R - Resistente.

Fonte: LIS/LMSL.

Anexo D – Histórico de recuperação de *P. aeruginosa* multirresistentes a partir de espécimes clínicos obtidos do mesmo paciente em que foi obtido o isolado P83.

Isolado ¹	Microrganismo	Data de Coleta	Instituição ²	Sítio ³	Perfil de Suscetibilidade ⁴		
					CAZ	IPM	MEM
-	Ausente	07/01/2011	Amb	ITU	-	-	-
-	Ausente	09/11/2010	Amb	ITU	-	-	-
-	Ausente	25/10/2010	Amb	ITU	-	-	-
-	Ausente	19/07/2010	Amb	ITU	-	-	-
*	<i>E. coli</i>	13/04/2010	Amb	ITU	S	S	S
P83	<i>P. aeruginosa</i>	24/11/2009	Amb	ITU	R	R	R
-	Ausente	04/11/2009	Amb	ITU	-	-	-
*	<i>P. aeruginosa</i>	03/08/2009	E	TRI	S	R	R
*	<i>P. aeruginosa</i>	20/07/2009	E	TRI	S	R	R
*	<i>P. mirabilis</i>	27/08/2009	Amb	ITU	S	S	S

¹P83: isolado de *P. aeruginosa* avaliado por este estudo; *Isolados de *P. aeruginosa* e outras espécies bacterianas não incluídos no estudo. Ausente – Ausência de crescimento de microrganismos; *E. coli* – *Escherichia coli*; *P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*; *P. mirabilis* – *Proteus mirabilis*. ²Amb – Ambiente ambulatorial, E – Clínica Privada. ³ITU – Infecções do Trato Urinário, TRI – Trato Respiratório Inferior. ⁴Teste realizado através da metodologia de difusão em gel pela rotina microbiológica do LMSL à ocasião do isolamento. Antimicrobianos indicados: CAZ – Ceftazidima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem. Perfil de suscetibilidade: R – Resistente, S – Sensível.

Fonte: LIS/LMSL.

Anexo E – Pré-visualização do laudo contendo as CIM do isolado P22 (Isolado de *P. aeruginosa* avaliado por este estudo).

Identification Information	
Selected Organism	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Entered: Feb 1, 2011 12:46 GMT-03:00 By: System	
Analysis Messages: The following antibiotic(s) are not claimed: ESBL,	

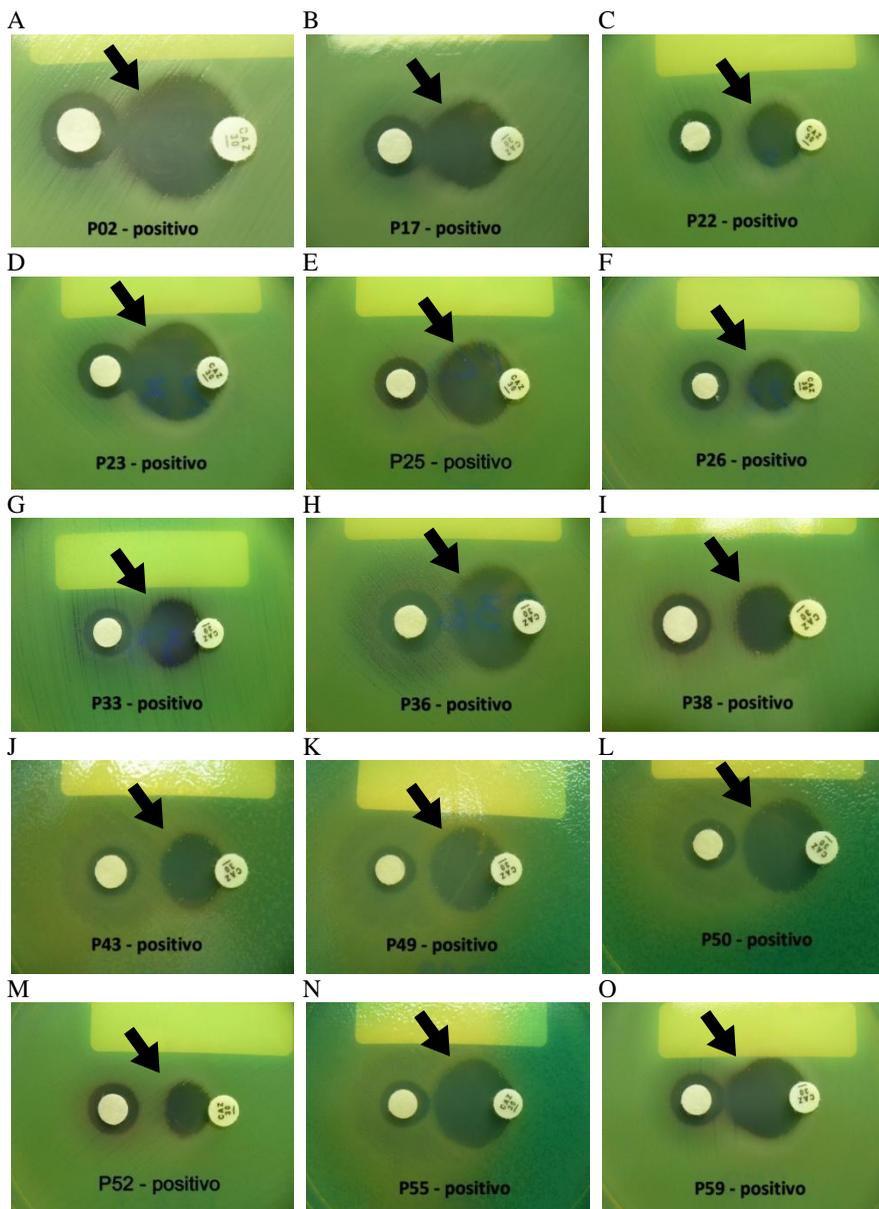
Susceptibility Information	Card: AST-N105	Lot Number: 415189610	Expires: Feb 22, 2012 12:00 GMT-03:00		
	Completed: Feb 2, 2011 00:05 GMT-03:00	Status: Final	Analysis Time: 11.25 hours		
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
ESBL			Actreonom	16	I
Ampicillin	>= 32	R	Ertapenem		
Ampicillin/Sulbactam	>= 32	R	Imipenem	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Meropenem	>= 16	R
Cefalotin	>= 64	R	Amikacin	>= 64	R
Cefoxitin	>= 64	R	Gentamicin	>= 16	R
Cefotaxime	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Tigecycline	>= 8	R
Cefepime	>= 64	R	Colistin	2	S

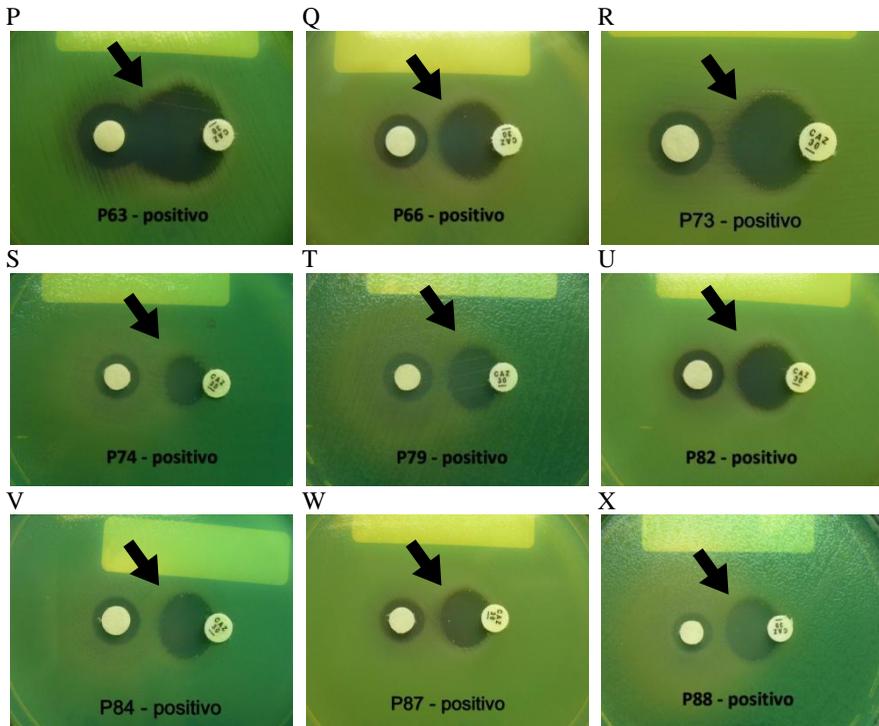
+ = Deduced drug * = AES modified ** = User modified

AES Findings:	Last Modified: Dec 14, 2010 12:28 GMT-03:00	Parameter Set: Global+Natural Resistance, Atualizado ANVISA 2010
Confidence Level:	Consistent	

Fonte: Laudos laboratoriais gerados pelo software produzido pela Vitek 2 Technology™ e integrado ao sistema de incubação e leitura, Vitek 2 System®, versão: 04.02, junho de 2009; AST, versão: 04.01.4.1.16, fevereiro de 2009; AES *Expert*, versão: 1.9.0, fevereiro de 2009; *Knowledge Base*, versão: 04.02, dezembro de 2010 (*View and Mantain Isolate Results: Laboratory Report*).

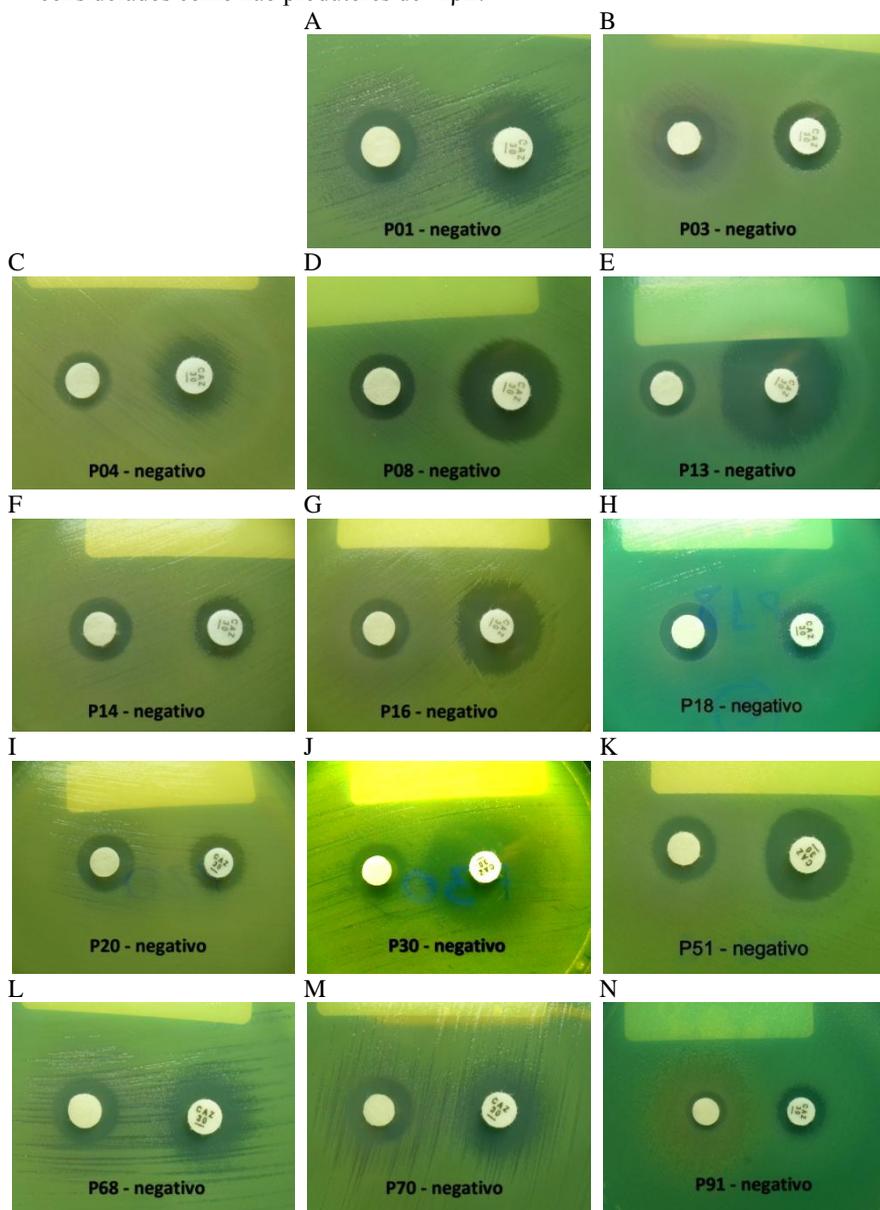
Anexo F – Resultados de DDST positivos dos 24 isolados de *P. aeruginosa* considerados como produtores de M β L.





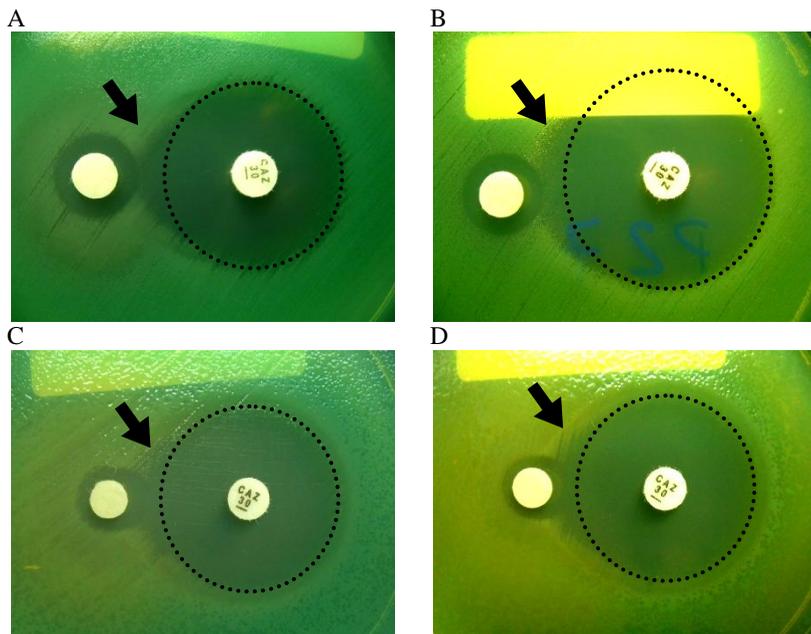
Discos em branco: 10 μ l de 2-MPA (1:16, 0,6690 M; 95,0%, Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA). **CAZ 30:** Discos de papel filtro com 30 μ g de Cefazidima (Oxoid, Basingstoke, England). **Setas:** aparecimento de uma zona de inibição do crescimento bacteriano no interior do perımetro de sinergia. **A-X:** isolados de *P. aeruginosa* considerados como produtores de M β L.

Anexo G – Resultados de DDST negativos dos 14 isolados de *P. aeruginosa* considerados como não produtores de MβL.



Discos (idem ao anexo anterior). **A-N**: isolados de *P. aeruginosa* considerados como não produtores de MβL.

Anexo H – DDST de 4 isolados de *P. aeruginosa* considerados inconclusivos para a presença de M β L devido à sensibilidade (P27, P80 e P83) ou sensibilidade intermediária (P07) à Ceftazidima apresentada pelos mesmos.



Discos (idem ao anexo anterior). **Seta**: distorção (aumento direcional) do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do halo de CAZ. **Pontilhado circular**: limites definidos e continuação virtual do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do halo de CAZ. **A**: P07. **B**: P27. **C**: P80. **D**: P83.

Anexo I – Cálculos¹ da sensibilidade e do valor preditivo negativo encontrados para o sistema Vitek® 2 para a detecção de carbapenemases em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes quando comparados ao DDST (*Double-Disk Sinergy Test*).

Diagnostic or Screening Test Evaluation			
Single Table Analysis			
	Positive	Negative	Total
Positive	24	3	27
Negative	0	11	11
	24	14	38

Parameter	Estimate	Lower - Upper 95% CIs	Method
Sensitivity	100%	(86.2, 100 ¹)	Wilson Score
Specificity	78.57%	(52.41, 92.43 ¹)	Wilson Score
Positive Predictive Value	88.89%	(71.94, 96.15 ¹)	Wilson Score
Negative Predictive Value	100%	(74.12, 100 ¹)	Wilson Score
Diagnostic Accuracy	92.11%	(79.2, 97.28 ¹)	Wilson Score
Likelihood ratio of a Positive Test	4.667	(2.428 - 8.969)	
Likelihood ratio of a Negative Test	0.0	(0.0 - '?')	
Diagnostic Odds	'undefined'	('?' - 'undefined')	
Cohen's kappa (Unweighted)	0.8224	(0.5095 - 1.135)	
Entropy reduction after a Positive Test	30.93%		
Entropy reduction after a Negative Test	'?'%		
Bias Index	0.07895		

¹Resultados da especificidade e valor preditivo positivo calculados apenas com os dado para a produção de metalo-enzimas (resultados de DDST positivos) e não correlacionado à possível presença de outras carbapenemases devido à ausência de investigação da presença destas últimas.

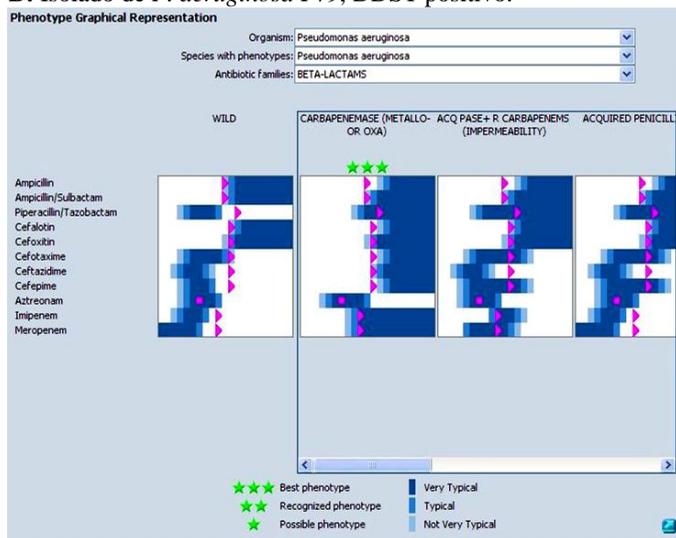
Fonte: *OpenEpi – Diagnostic or Screening Test Evaluation*, [HTTP://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm](http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm).

Anexo J – Representação gráfica dos fenótipos na identificação dos mecanismos mediadores de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos através do sistema Vitek® 2.

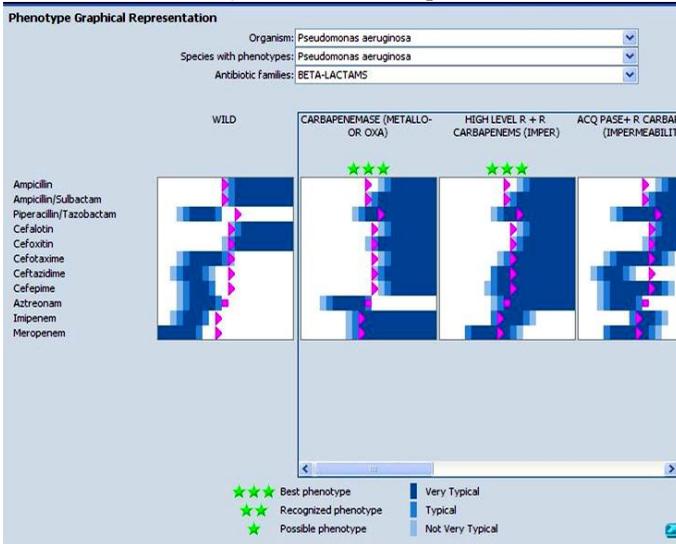
A: Controle DDST positivo, *P. aeruginosa* bla_{SPM-1}.



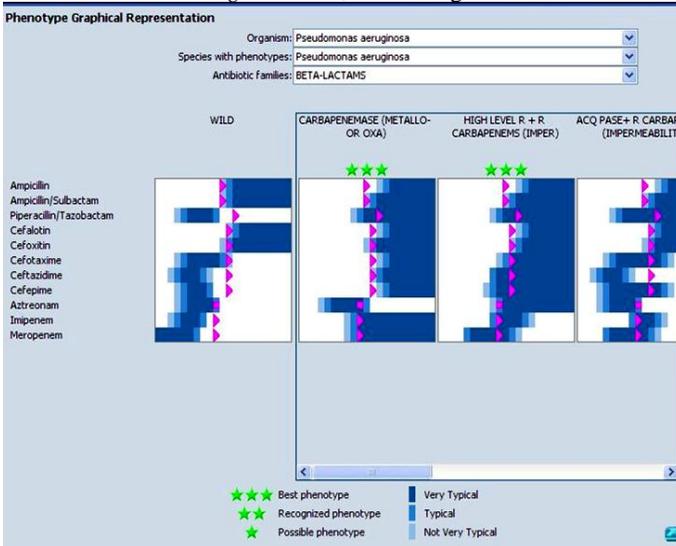
B: Isolado de *P. aeruginosa* P79, DDST positivo.



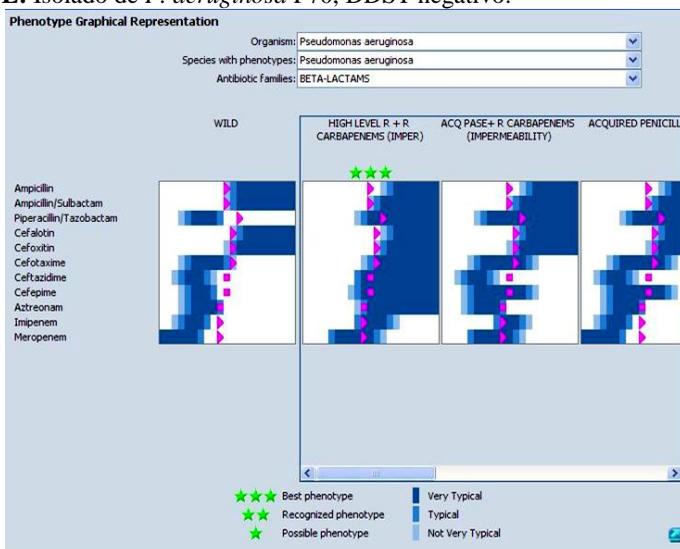
C: Isolato de *P. aeruginosa* P33, DDST positivo.



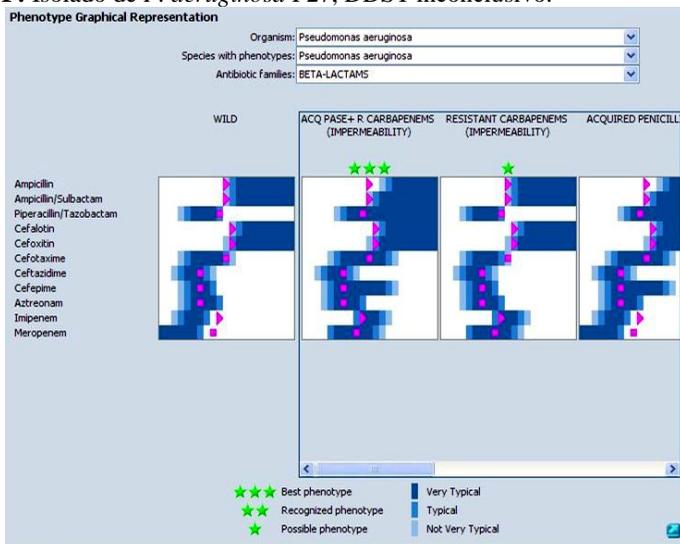
D: Isolato de *P. aeruginosa* P14, DDST negativo.



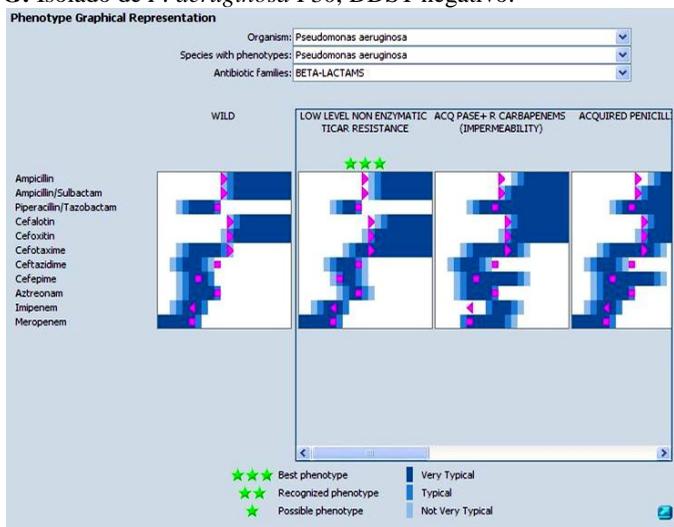
E: Isolado de *P. aeruginosa* P70, DDST negativo.



F: Isolado de *P. aeruginosa* P27, DDST inconclusivo.



G: Isolado de *P. aeruginosa* P30, DDST negativo.



Barras horizontais em azul dégradé: faixa de distribuição das CIM encontradas em isolados de *P. aeruginosa* armazenadas no banco de dados do equipamento e dispostas segundo os perfis fenotípicos de mecanismos mediadores de resistência conhecidos para cada agente antimicrobiano. Azul escuro: muito típico; Azul médio: típico; Azul claro: pouco típico. **Setas e quadrados magenta:** CIM obtidas para a cepa em teste. Seta: CIM com valores \leq ou \geq a uma dada concentração; Quadrados: CIM exata. **Esquerda:** lista dos agentes antimicrobianos betalactâmicos testados pelo cartão AST-N105 (Vitek® 2, bioMérieux); CIM esperadas para um isolado selvagem (ex., ATCC 27853), isto é, sem mecanismos mediadores de resistência adquiridos. **Centro:** mecanismo(s) mediador(es) de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos identificado(s) na cepa em teste através da escolha do melhor fenótipo (três estrelas verdes), o qual corresponde à coincidência das CIM obtidas para a cepa em teste com a faixa de distribuição de CIM de fenótipos conhecidos. **Direita:** fenótipos menos prováveis (um estrela) ou descartados (nenhuma estrela). **Diferenças entre as CIM obtidas pelo sistema Vitek® 2 para ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP) e aztreonam (ATM):** A e B (CAZ, FEP: elevadas; ATM: baixas); C e D (CAZ, FEP: elevadas; ATM moderadas); E (CAZ, FEP: moderadas; ATM: moderada); F (CAZ, FEP: baixas e ATM: baixa); G (CAZ: moderada; FEP, ATM: baixas).

Fonte: Representação Gráfica dos Fenótipos geradas pelo software produzido pela Vitek 2 Technology™ e integrado ao sistema de incubação e leitura, Vitek 2 System®, versão: 04.02, junho de 2009; AST, versão: 04.01.4.1.16, fevereiro de 2009; AES Expert, versão: 1.9.0, fevereiro de 2009; Knowledge Base, versão: 04.02, dezembro de 2010 (*View and Maintain Isolate Results: Phenotype Graphical Representation*).

Anexo K – Associação entre a presença de MβL e os isolados com perfis de suscetibilidade mais resistentes da amostragem deste trabalho (42 isolados).

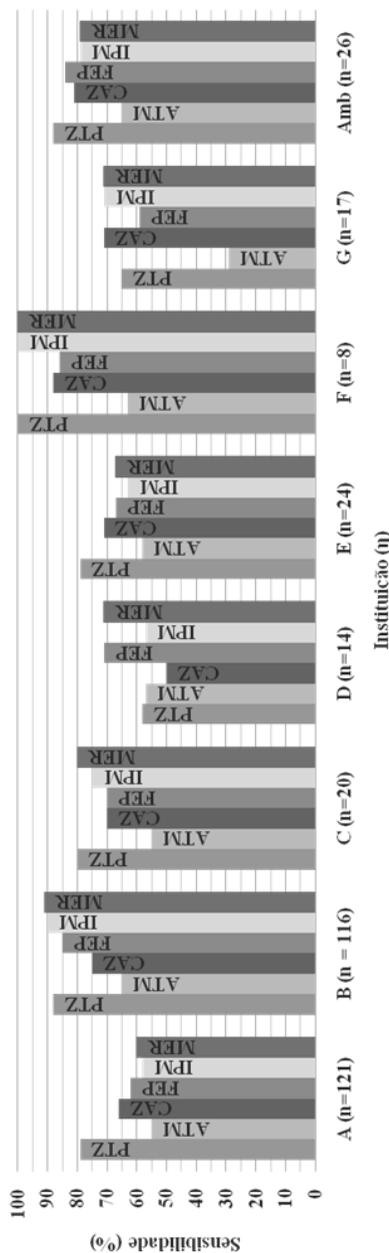
2 x 2 Table Statistics				
Single Table Analysis				
		Disease		
		(+)	(-)	
Exposure	(+)	22	2	24
	(-)	5	13	18
		27	15	42
Chi Square and Exact Measures of Association				
Test	Value	p-value(1-tail)	p-value(2-tail)	
Uncorrected chi square	18.29	0.000009503	0.00001901	
Yates corrected chi square	15.61	0.00003893	0.00007786	
Mantel-Haenszel chi square	17.85	0.00001194	0.00002389	
Fisher exact		0.00002472	0.00004944	
Mid-P exact		0.00001274	0.00002547	
All expected values (row total*column total/grand total) are >=5 OK to use chi square.				

Risk-Based* Estimates and 95% Confidence Intervals (Not valid for Case-Control studies)			
Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	Type
Risk in Exposed	91.67%	73, 98.84	Taylor series
Risk in Unexposed	27.78%	12.18, 51.2	Taylor series
Overall Risk	64.29%	49.12, 77.06	Taylor series
Risk Ratio	3.3	1.552, 7.018 ¹	Taylor series
Risk Difference	63.89%	40.43, 87.35 ^o	Taylor series
Etiologic fraction in pop. (EFp)	56.79%	29.46, 84.12	
Etiologic fraction in exposed (EFe)	69.7%	35.56, 85.75	

Odds-Based Estimates and Confidence Limits			
Point Estimates		Confidence Limits	
Type	Value	Lower, Upper	Type
CMLE Odds Ratio*	25.46	4.814, 211.8 [‡]	Mid-P Exact
		4.035, 303.1 [‡]	Fisher Exact
Odds Ratio	28.6	4.836, 169.1 [‡]	Taylor series
Etiologic fraction in pop. (EF _p OR)	78.63%	61.2, 96.06	
Etiologic fraction in exposed (EF _e OR)	96.5%	79.32, 99.41	

*Conditional maximum likelihood estimate of Odds Ratio
(P)indicates a one-tail P-value for Protective or negative association; otherwise one-tailed exact P-values are for a positive association.
Martin,D; Austin,H (1991) An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. Epidemiology 2, 359-362.
[‡] 95% confidence limits testing exclusion of 0 or 1, as indicated
LookFirst items: Editor's choice of items to examine first.

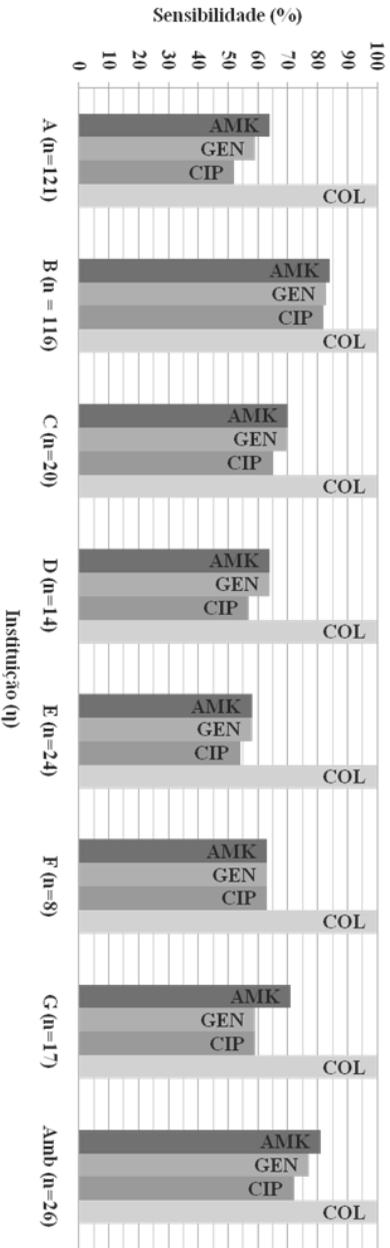
Fonte: *OpenEpi, Version 2, open source calculator—TwobyTwo*. Disponível em <http://www.openepi.com/OE2.3/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>.



Anexo L – Frequências de suscetibilidade aos antimicrobianos betalactâmicos de isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados em sete instituições públicas e privadas da região da Grande Florianópolis e recuperados de pacientes atendidos em caráter ambulatorial atendidos pelo serviço de microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL) de Florianópolis, SC, no período de março a dezembro de 2010.

A – Hospital Privado “A”, B – Hospital Público “B”, C – Hospital Privado “C”, D – Clínica Privada “D”, E – Clínica Privada “E”, F – Hospital Público “F”, G – Clínica Privada “G”, Amb – Ambulatório. Antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos indicados: PTZ – Piperacilina/Tazobactam, ATM – Aztreonam, CAZ – Ceftazidima, FEP – Cefepima, IPM – Imipenem, MEM – Meropenem. η - número de isolados de *P. aeruginosa* no período.

Fonte: LMSL/dados não publicados.



Anexo M – Frequências de susceptibilidade aos representantes de outras classes de antimicrobianos (amino glicosídeos, fluororoquilonas e polimixinas) de isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados em sete instituições públicas e privadas da região da Grande Florianópolis e recuperados de pacientes atendidos em caráter ambulatorial atendidos pelo serviço de microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia (LMSL) de Florianópolis, SC, no período de março a dezembro de 2010.

A – Hospital Privado “A”, B – Hospital Público “B”, C – Hospital Privado “C”, D – Clínica Privada “D”, E – Clínica Privada “E”, F – Hospital Público “F”, G – Clínica Privada “G”, Amb – Ambulatório. AMK – Amicacina, Antimicrobianos aminoglicosídeos indicados: GEN – Gentamicina. Antimicrobiano representante da classe das fluororoquilonas indicado: CIP – Ciprofloxacina. Antimicrobiano da classe dos polipeptídeos (Polimixinas) indicado: COL – Colistina. n - número de isolados de *P. aeruginosa* no período.

Fonte: LMSL/dados não publicados.