

LUCIANA CAMILA CACCI

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DAS
INFECÇÕES POR *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE
AO IMIPENEM EM PACIENTES HOSPITALIZADOS**

CAMPINAS

2007

LUCIANA CAMILA CACCI

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DAS
INFECÇÕES POR *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE
AO IMIPENEM EM PACIENTES HOSPITALIZADOS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica,
área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C113e Cacci, Luciana Camila
Estudo epidemiológico-molecular das infecções por *Pseudomonas*
aeruginosa resistente ao imipenem em pacientes hospitalizados /
Luciana Camila Cacci. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Imipenem . I. Ramos, Marcelo
de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Epidemiological-molecular study of *Pseudomonas*
aeruginosa imipenem resistant infections in hospitalized patients**

Keywords: • *Pseudomonas aeruginosa*
• Imipenem

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos
Prof. Dr. Carlos Alberto Pires Pereira
Prof. Dr. Plínio Trabasso

Data da defesa: 28 - 08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Membros:

Professor Doutor Carlos Alberto Pires Pereira

Professor Doutor Plínio Trabasso

Professor Doutor Marcelo de Carvalho Ramos



Marcelo

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 28/08/2007

DEDICATÓRIA

*Para minha irmã Tina (In Memoriam). Sua luta pela
vida me inspirou a lutar pelos meus sonhos.*

À Deus, por me dar saúde, força e coragem para realizar mais um sonho.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos, pela orientação, dedicação, e apoio na realização deste trabalho.

À Dra. Sílvia Figueiredo Costa, pela colaboração.

À Inneke Marie van der Heijden, pela amizade e colaboração.

À equipe do **Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular**, pela colaboração e amizade.

À Prof. Dra. Maria Cecília Barisson Villares, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários e amigos do **Laboratório de Microbiologia** do Depto. de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por tudo que aprendi durante o estágio, pelo carinho e amizade.

A Clara e Rubens, meus pais, por todo apoio recebido.

Ao Plínio, meu marido, pela paciência, amor e compreensão.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo nº 2005 / 01646-5).

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
Locais de estudo.....	26
Hospital das Clínicas da UNICAMP.....	26
Hospital Municipal Dr. Mário Gatti.....	26
Definição de Infecção Nosocomial.....	26
Materiais.....	26
Métodos.....	27
Identificação e Pesquisa de sensibilidade ao Imipenem.....	27
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	27
E-test MBL [®]	28
Extração de DNA.....	28
Eletroforese do DNA extraído.....	30
Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
Preparação de amostras e amplificação de DNA.....	30
Sequenciamento dos produtos de PCR.....	31
Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE.....	33

RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus centígrados
µL	Microlitro
BHI	Meio de cultura Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Composto pelos 4 nucleotídeos (A-T-C-G)
EC	Tampão Tris / NaCl 1M
ESBL	Beta-lactamase(s) de Espectro Estendido (do inglês, <i>Extended-Spectrum Beta-lactamase</i>), enzima(s) responsável(eis) pela clivagem de vários antimicrobianos beta-lactâmicos.
GNI	Gram Negative Identification - cartão para identificação de microrganismos Gram negativos, utilizado no Vitek.
GNS	Gram Negative Susceptibility - cartão para verificar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de microrganismos Gram negativos, utilizado no Vitek.
IP	Imipenem
IP + IPI	Imipenem com EDTA
kV	quilovolts
LPS	Lipopolissacarídeo - fator de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
M	Molar
mA	Mili ampère
MBLs	Metalo beta-lactamases
mg	Miligrama
Min	Minutos

mL	Mililitros
NCCLS	Comitê Norte-americano de Normas para Laboratórios Clínicos (do inglês, National Committee for Clinical Laboratory Standards)
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance System - sistema cooperativo, sem fins lucrativos, entre os hospitais norte-americanos e o Centro de Controle de Doenças - EUA, que monitora a incidência de infecções nosocomiais.
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
No.	Número
Obst/Ginec	Obstetrícia / Ginecologia
ol	
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis - método de genotipagem
P&B	Filme fotográfico preto e branco
rpm	Rotações por minuto
TBE	Tampão Tris / Ácido Bórico / EDTA
TE	Tampão Tris / EDTA
TEMED	N-N,N',N'-tetra metiletilenodiamina
TEN	Tampão Tris / EDTA / NaCl / Triton
TSB	Caldo tripticaseína de soja (meio de cultura)
U	Unidades
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	volts

	PÁG.
Tabela 1- Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento de trechos de genes codificadores de metalo beta-lactamases.....	31
Tabela 2- Distribuição dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> segundo o local do hospital em que foi obtido.....	32
Tabela 3- Distribuição dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudados, segundo o material clínico em que foi obtido.....	32
Tabela 4- Relação dos pacientes em que foram isoladas mais de uma cepa resistente ao Imipenem, segundo o local do hospital, a data do isolamento, o material em que foi isolada e o genótipo.....	42
Tabela 5- Relação das linhagens observadas segundo o paciente, o material em que foi isolada a cepa, a data do isolamento, o local do hospital, a concentração inibitória mínima do Imipenem e a produção de metalo beta-lactamase.....	43

	PÁG.
Figura 1- Exemplo de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) de isolados estudados.....	40
Figura 2- Dendrograma dos isolados genotipados pelo PFGE.....	41
Figura 3- Amplificação do gene <i>bla</i> _{SPM-1} . Coluna 1: Marcador de 100pb; Coluna 2: controle positivo para o gene <i>bla</i> _{SPM-1} (649pb); Colunas 3 a 8: cepas portadoras do gene <i>bla</i> _{SPM-1}	44

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1- Distribuição dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> segundo as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de Imipenem observadas.....	39

RESUMO

Introdução. As metalo beta-lactamases, presentes em *Pseudomonas aeruginosa* assim como em diversos microrganismos Gram negativos, são grande ameaça ao tratamento dos pacientes portadores de infecções causadas por este microrganismo.

Objetivos. A produção de MBLs e a relação genética foram investigadas em isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao Imipenem, recuperados de infecções hospitalares.

Descrição do estudo. Estudo retrospectivo em uma amostra de microrganismos. O estudo foi conduzido em dois hospitais universitários, em Campinas. Todos os isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao Imipenem foram coletados de pacientes hospitalizados no período de Março de 2000 a Dezembro de 2004.

Métodos. O método da disco-difusão foi utilizado para confirmar a resistência ao Imipenem. O E-test MBL[®] foi feito para verificar a produção de MBLs e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Imipenem. Os fragmentos das seqüências dos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1} foram amplificados.

Resultados: Cento e vinte e oito isolados resistentes ao Imipenem foram coletados durante o período do estudo. A maioria dos isolados exibiu CIM do Imipenem maior ou igual a 256 µg/mL. A análise por macrorestrição com a enzima *SpeI* através do Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) mostrou um polimorfismo significativo. Apenas 15 cepas puderam ser distribuídas em sete “clusters”, seis com dois isolados e um com três isolados. Noventa e oito isolados resistentes ao Imipenem foram triados para a pesquisa da produção de MBL. Setenta isolados apresentaram produção de MBL e o fragmento do gene *bla*_{SPM-1} pôde ser amplificado em 12 isolados. Nas cepas restantes nenhum outro tipo de MBL referente aos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} foi encontrado.

Conclusão. A disseminação de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBL genotipicamente heterogêneas foi documentada nos hospitais estudados. Apenas a metalo beta-lactamase SPM-1 foi encontrada entre essas cepas.

ABSTRACT

Objective. Genetic relatedness and Metallo- β -lactamase production was investigated in Imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from hospital acquired infections.

Design. Descriptive study in a convenient sample of organisms.

Setting. Two 400-bed tertiary care teaching hospitals, in Campinas, Brazil. All Imipenem resistant *P. aeruginosa*, recovered from March, 2000 through December 2004 from hospitalized patients were collected

Methods. Disk diffusion tests were used to confirm Imipenem resistance.

E-test MBL[®] was done to check for MBL production, and. Imipenem MIC's.

*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-2} sequences were amplified.

Results. A sample of 128 Imipenem resistant *P. aeruginosa* isolates was collected during the study period. Most isolates exhibited Imipenem MIC's ≥ 256 μ g/mL. Macrorestriction analysis (*SpeI*) using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) showed a substantial polymorphism. Only 15 strains could be allocated to seven clusters, six with two isolates and one with three isolates. Ninety-eight Imipenem resistant isolates were screened for MBL production. Seventy isolates showed MBL production, and. *bla*_{SPM-1} sequence could be amplified from 12 isolates. In the remaining strains no other MBL-type from *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-2} investigated in the study was demonstrated.

Conclusion. Dissemination of MBL producing-genotypically heterogenous *Pseudomonas aeruginosa* strains was documented in the hospitals studied. Only SPM-1 metallo- β -lactamase was found among these strains.

INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo que causa tanto infecções comunitárias, como hospitalares. A ceratite ulcerativa, a otite externa e as infecções de pele e outros tecidos moles são exemplos de doenças adquiridas na comunidade. As pneumonias associadas à ventilação mecânica, as pielonefrites associadas às sondas vesicais, as septicemias e as infecções de pele em queimados, por sua vez, são exemplos de infecções hospitalares. Os portadores de Fibrose Cística constituem um grupo especial de pacientes que são particularmente acometidos por esse organismo (Driscoll et al., 2007).

Essa bactéria, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, Gram negativa, cresce em meio aeróbio, não fermenta açúcares e não é esporulada. À microscopia simples é vista isolada ou formando pequenas cadeias, possui flagelos polares, o que lhe confere mobilidade. Produz pigmentos esverdeados (piocianina, pioverdina), avermelhados (piorrubina) ou negros (piomelanina) e quando recuperada em cultura, tem odor peculiar (Washington et al., 2006).

Diversos fatores de virulência já foram identificados em *P. aeruginosa*, como: lipopolissacarídeo (LPS), exotoxina A, leucocidina, protease e fosfolipase. Esses fatores contribuem para a colonização, infecção e o desenvolvimento de doença (Washington et al., 2006). Também é capaz de formar biofilme, o que as protege de condições hostis do ambiente e contribui com o caráter persistente e incurável de infecções produzidas em portadores de mucoviscidose, ou nos que têm material heterólogo instalado (Costerton et al., 1999).

De acordo com estudos de Kollef e Gaynes, a *P. aeruginosa* foi colocada em segundo lugar entre os agentes causadores de pneumonia associada à ventilação mecânica (Kollef et al., 2005; Gaynes e Edwards et al., 2005). Gales e colaboradores (2002) também citam a *P. aeruginosa* como o principal microrganismo causador de pneumonia em pacientes hospitalizados na América Latina e a maioria das cepas isoladas nesse trabalho possuíam resistência à grande parte dos antimicrobianos testados. Particularmente no Brasil, um número significativo de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com infecções hospitalares não é sensível a carbapenêmicos.

No Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, 13% e 7% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* coletados no período de 1999-2002 mostraram-se resistentes ao Imipenem e Ceftazidima, respectivamente. Dessa casuística, foram excluídos os pacientes portadores de mucoviscidose (Fortaleza et al., 2006).

Tem havido, inclusive, um aumento nos coeficientes de resistência de *P. aeruginosa*, conforme documentado nos trabalhos do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (National Nosocomial Infections Surveillance System – NNIS) e do Brasil. Nos Estados Unidos, esse aumento foi de 15% de 2002 a 2003 e, no Brasil, de cerca de 12% (Sader et al., 2004).

A *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a vários antibióticos, incluindo: beta-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim e a maioria das fluoroquinolonas. Essa resistência intrínseca não aparece no caso da ticarcilina, piperacilina, associação de beta lactâmico/inibidor de beta-lactamase, cefalosporinas, aminoglicosídeos, monobactams, algumas fluoroquinolonas, carbapenêmicos e polimixinas. Entretanto, ela é capaz de desenvolver resistência a qualquer desses agentes. O risco de emergência de resistência antimicrobiana é particularmente associado ao uso prévio de antimicrobianos (Carmeli et al., 1999).

A ceftazidima, o meropenem e o imipenem são os antibióticos mais utilizados para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Embora o imipenem seja um dos agentes antimicrobianos mais prescritos para esses tratamentos, essa decisão tem sido cada vez mais complicada pela crescente resistência exibida, além do que não é rara a resistência conjunta aos demais antimicrobianos citados (King et al., 1995).

O desenvolvimento de resistência nesses casos é, geralmente, consequência dos seguintes mecanismos: perda dos canais da porina OprD, as bombas de efluxo e a degradação enzimática por beta-lactamases.

A porina OprD, presente na membrana externa da célula bacteriana, permite a passagem do imipenem, o que deve resultar de uma afinidade entre esses dois compostos (Trias e Nikaido, 1990). Portanto, a sua perda deve determinar o menor ingresso do

imipenem na célula bacteriana. Entretanto, Livermore (1992) observou que essa perda só determina resistência quando há concomitante hiperprodução de AmpC beta-lactamase, uma enzima naturalmente produzida por *P. aeruginosa* (Livermore, 1992).

As bombas de efluxo, por sua vez, podem eliminar vários antimicrobianos de dentro da célula bacteriana com rapidez. Elas são denominadas de acordo com a sua constituição protéica. Quatro dessas bombas já foram bem caracterizadas, a saber: MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN e MexX-MexY-OprM). A terapia antimicrobiana exerce uma pressão que seleciona cepas de *P. aeruginosa* que expressam de forma importante essas bombas de efluxo (Mesaros et al., 2007). Este fenômeno opera, particularmente, quando se usa fluoroquinolonas, já que elas são substratos para todas as bombas de efluxo citadas (Jalal et al., 2000).

Beta-lactamases são enzimas capazes de degradar antibióticos do grupo beta-lactâmico através de hidrólise. A sua expressão pode ser induzida pela exposição do microrganismo a esses mesmos beta-lactâmicos, como no caso da hiperprodução de Amp-C. O Imipenem, um antimicrobiano desse grupo, também induz essa expressão (Hanson, 2003).

Além da Amp-C, outras beta-lactamases conhecidas como “*Extended Spectrum Beta-Lactamases*” (ESBL) já foram identificadas. Três classes de ESBL já foram descritas em *P. aeruginosa*, a saber: classe A (derivados da penicilinase); classe B (metalo-enzimas) e classe D (oxacilinas) (Nordmann e Guibert, 1998).

A PER-1, pertencente à classe A, é a principal penicilinase e foi encontrada em aproximadamente 11% dos isolados de *P. aeruginosa* em hospitais da Turquia (Vahaboglu et al., 1997). Outras enzimas da classe A, como TEM e SHV, foram raramente identificadas (Bonomo e Szabo, 2006).

As enzimas de classe D, as OXA beta-lactamases, hidrolizam cefalosporinas de terceira geração, como a ceftazidima e o aztreonam. Algumas dessas beta-lactamases como a OXA-18, OXA-19, OXA-28 e OXA-32 já foram descritas na França (Poirel et al., 2001;

Poirel et al., 2002). Os outros subtipos da família OXA foram encontrados na Turquia (Danel et al., 1997; Danel et al., 1999; Hall et al., 1993).

As metalo beta-lactamases (MBLs) são enzimas que, através de hidrólise, inativam praticamente todos os beta-lactâmicos, com exceção do aztreonam. Possuem molécula de zinco no seu sítio ativo, de modo que o EDTA, agente quelante de metais, inibe a ação dessas enzimas. Na *P. aeruginosa* as MBLs são codificadas em plasmídios, elementos que por serem móveis, contribuem para a disseminação dessas enzimas. Os principais tipos de MBLs já encontrados em *P. aeruginosa* são: IMP, VIM, SPM e GIM. A IMP-1 ou Imipenemase foi encontrada no Japão em 1988. A VIM-1 foi descoberta em Verona, Itália, em 1997. A SPM-1 foi encontrada em 1997, em São Paulo. A GIM-1 foi encontrada na Alemanha, em 2002 (Castanheira et al., 2004). As MBLs mais prevalentes são a IMP e a VIM. A IMP possui vários subtipos, tendo sido caracterizados 21 deles e está concentrada na Ásia. A VIM possui 14 subtipos e foi encontrada na Europa, Venezuela e Argentina. Outros subtipos da família VIM também já foram detectados em outros países da América Latina.

As MBLs já se disseminaram por vários países da Europa, Ásia, América do Norte, Oceania e América Latina. Walsh e colaboradores sugerem que a causa dessa ampla disseminação se deve à *P. aeruginosa* do meio ambiente. Rossolini sugere que isso pode ocorrer devido ao tráfego internacional intenso de pessoas (Walsh et al., 2005; Rossolini, 2005)

A SPM-1 é a MBL mais encontrada no Brasil e até o momento não foi encontrada em nenhum outro país (Walsh et al., 2005). Gales e colaboradores estudaram a disseminação e diversidade de MBLs na América Latina. Eles constataram que a SPM-1 é predominante no Brasil. Nesse trabalho, cepas de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 aparecem em São Paulo, Paraná, Distrito Federal, na Bahia e no Ceará (Gales et al., 2003). Em 2005, Zavascki e colaboradores realizaram um trabalho no sul do Brasil, no qual caracterizaram um surto hospitalar causado por *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 (Zavascki et al., 2005). Em 2006, Carvalho e sua equipe também verificaram a presença de SPM-1 no Rio de Janeiro, (Carvalho et al., 2006). A IMP-1 foi encontrada em isolados de

São Paulo e a IMP-16 foi encontrada em isolados de Brasília (2004) e São Paulo (2006) (Marra et al., 2006; Mendes et al., 2004).

Em resumo, a crescente resistência a antimicrobianos apresenta importante impacto sobre morbidade, mortalidade e custos de tratamento de pacientes internados (Fortaleza et al., 2006; Lautenbach et al., 2006). Vários pesquisadores atribuem um maior tempo de internação à infecção pela *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente (Raymond et al., 2003; Bukholm et al., 2002). Considera-se, também, que as doenças produzidas por esse organismo podem levar a seqüelas graves, reduzindo a capacidade funcional de pacientes acometidos (Aloush et al., 2006). É de interesse, portanto, que esses mecanismos de resistência aos carbapenêmicos sejam devidamente esclarecidos e que microrganismos portadores de determinado meio de resistência sejam bem caracterizados e avaliados com respeito à sua disseminação no meio hospitalar.

OBJETIVOS

1. Estimar, em amostra de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de materiais clínicos de pacientes internados em hospital geral, a frequência de isolados produtores de metalo beta-lactamases.
2. Pesquisar, nos isolados produtores de metalo beta-lactamases, a presença dos genes codificadores *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}, todos produtores de metalo beta-lactamases.
3. Determinar a relação genética, através do Pulsed Field Gel Electrophoresis, dos isolados produtores de metalo beta-lactamases, bem como dos eventuais portadores dos genes encontrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais e tipo do estudo

O estudo retrospectivo foi realizado nos hospitais: Hospital das Clínicas da UNICAMP e Hospital Municipal Dr. Mario Gatti da Prefeitura Municipal de Campinas.

Hospital das Clínicas da UNICAMP

Este hospital universitário possui 403 leitos. É referência para uma população de cerca de três milhões de habitantes da região metropolitana de Campinas. O corpo clínico é composto por 600 médicos, sendo 326 deles docentes. Além disso, possui 442 médicos residentes. Classificado como uma unidade hospitalar de perfil terciário e quaternário, o Hospital das Clínicas é capaz de prestar serviços altamente especializados.

Hospital Municipal Dr. Mário Gatti:

Este hospital possui 230 leitos. Cerca de 1.200 pessoas são atendidas por dia. É a principal porta de entrada para urgências e emergências e também é referência para serviços de diagnóstico e terapêutica da região metropolitana de Campinas. Em 2004, foi reconhecido como hospital de ensino e pesquisa pelos Ministérios da Saúde e da Educação.

Definição de infecção nosocomial:

É aquela adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após procedimentos hospitalares. (Garner et al., 1988)

Materiais

Todas as Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao Imipenem provenientes de espécimes clínicos enviados aos laboratórios de microbiologia dessas instituições e isoladas entre março de 2000 a dezembro de 2004 foram coletadas.

Métodos

Identificação e Pesquisa de sensibilidade ao Imipenem

As cepas, conforme identificadas pelos respectivos laboratórios, foram preservadas em caldo BHI e conservadas sob refrigeração a -20 ° C até a realização do estudo.

A seguir, todas as cepas coletadas foram recultivadas em ágar sangue para verificação da pureza e determinação de características morfológicas das colônias.

O sistema automatizado Vitek (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) foi utilizado para a re-identificação de todas as cepas coletadas. Utilizou-se o cartão GNI para a identificação e o cartão GNS para a determinação da sensibilidade a diversos antimicrobianos, inclusive, para a sensibilidade ao imipenem. A resistência ao Imipenem foi posteriormente confirmada pelo método da difusão em disco, seguindo as normas do Comitê Norte-americano de Normas para Laboratórios Clínicos (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS, 2004).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do E-test[®]

O E-test[®] é uma técnica que utiliza uma fita de plástico inerte, transparente, medindo 5,5 mm de largura por 60 mm de comprimento. De um lado da fita está impressa uma escala da CIM em µg/ml, e do outro lado existe um gradiente exponencial do antimicrobiano, seco e estabilizado. A concentração varia de 16 a 256 µg/mL para o Imipenem. Esse método combina os princípios da difusão do disco e da diluição e pode ser utilizado para uma grande variedade de microrganismos, incluindo leveduras e anaeróbios. Todas as fitas foram mantidas em congelador a -20°C até a sua utilização.

As cepas foram cultivadas em meio ágar sangue e três a cinco colônias foram selecionadas para a inoculação em solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez de acordo com a solução padrão 0,5 de Mac Farland. Um “swab” de algodão estéril é

mergulhado na solução salina e, após retirar o excesso de inóculo do “swab”, a placa de ágar Mueller-Hinton é inoculada vertical, horizontal e diagonalmente, para a distribuição uniforme do inóculo. Após colocar a fita do E-test[®] (AB Biodisk, Solna, Sweden) no meio de cultura, a placa é invertida e permanece em estufa a 37°C por 24 horas.

E-test MBL[®]

Este método foi utilizado para triagem da produção de metalo beta-lactamases. Semelhante à fita de E-test[®] comum, possui um gradiente de concentração de Imipenem (IP) em uma extremidade (4-256 µg/mL) e imipenem com EDTA (IP +IPI) na outra (1-64 µg/mL). O resultado é positivo para produção de metalo betalactamases quando a razão da concentração inibitória mínima de IP/IPI for maior ou igual a 8. Uma zona fantasma ou uma deformação da elipse também é positiva não importando o resultado de IP/IPI.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo de extração de DNA de bactérias Gram-negativas do GenomicPrep[™] Cells and Tissue DNA Isolation Kit - Amersham Pharmacia Biotech. As etapas do procedimento são descritas a seguir:

1. Acrescentar 1 mL de suspensão bacteriana cultivada por uma noite em um tubo de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, para sedimentar as células; desprezar o sobrenadante.
3. Adicionar 600 µL de “Cell Lysis Solution” e homogeneizar gentilmente com a pipeta até ressuspender as células.

4. Incubar a amostra a 80°C em placa térmica por 5 minutos (para lisar as células).
5. Esfriar à temperatura ambiente.
6. Adicionar 3 µL de “RNase A Solution” ao lisado celular.
7. Misturar a amostra, invertendo o tubo 25 vezes e incubar à 37°C por 30 minutos.
8. Esfriar a temperatura ambiente.
9. Acrescentar 200 µL de “Protein Precipitation Solution” ao lisado tratado com RNase.
10. Vortexar vigorosamente à alta velocidade por 20 segundos (misturando uniformemente).
11. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um “pellet” bem visível.
12. Cuidadosamente, transferir o sobrenadante contendo DNA para um tubo de 1,5 mL com 600µL de isopropanol 100%. Descartar o tubo contendo o sedimento de proteína.
13. Misturar a amostra invertendo o tubo gentilmente por 50 vezes.
14. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos; o DNA será visualizado como um “pellet” branco pequeno.
15. Desprezar o sobrenadante e acrescentar 600µL de etanol 70%.
16. Inverter o tubo 20 vezes para lavar o “pellet”.
17. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos. Desprezar cuidadosamente o sobrenadante (etanol).

18. Inverter o tubo sobre um papel absorvente e deixar o “pellet” secar no ar por 15 minutos.
19. Adicionar 50µL de “DNA Hydration Solution” ao “pellet”.
20. Permitir que o DNA re-hidrate “overnight” à temperatura ambiente.
21. Armazenar em temperatura de 2 - 8°C.

Eletroforese do DNA extraído

Para verificar a sua integridade, os DNAs extraídos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5µL/mL). A corrida eletroforética é realizada com tampão TBE (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM / EDTA 2,5 mM / pH 8,0) e submetida à uma corrente de 80V por uma hora. O gel, exposto à luz ultravioleta (260 nm), foi fotografado em câmara Polaroid (filme P&B 667).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os seguintes genes foram pesquisados nas cepas de *P. aeruginosa*: *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}.

Preparação de amostras e amplificação de DNA

A amplificação foi realizada com volume final de 50µL em termociclador. A mistura da reação contém 1µM de cada primer, 200µM de dNTPs, 1,5mM de tampão MgCl₂, 2,5U de *Taq* polimerase e, aproximadamente, 25ng de DNA alvo.

Os iniciadores utilizados neste trabalho para amplificação e sequenciamento do DNA estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Iniciadores utilizados para a amplificação e seqüenciamento de trechos de genes codificadores de metalo beta-lactamases.

Alvo	Seqüência do primer (5' a 3')
IMP-1	CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC GAACAACCAGTTTTGCCTTACC
VIM-1	TCTACATGACCGCGTCTGTC TGTGCTTTGACAACGTTTCGC
VIM-2	ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG CTACTCAACGACTGAGCG
SPM	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC

Após o início da desnaturação (5 minutos a 95°C), 30 ciclos de amplificação foram executados: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão do DNA a 68°C por 1 minuto. Os produtos amplificados na PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% (80V por 1 hora), aplicando-se na primeira canaleta do gel 1µL do marcador e 1µL do azul de bromofenol 10x e nas demais canaletas 8µL do produto de DNA e 2µL do azul de bromofenol 10x. Os produtos de PCR foram quantificados em espectrofotômetro de luz UV (GeneQuant, Pharmacia Biotech).

Seqüenciamento dos produtos de PCR

O seqüenciamento foi realizado através da técnica: *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para esta reação utilizou-se 25 ng do produto de PCR purificado, 1 µM de um dos iniciadores, 1 µL da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *BigDye* e água destilada estéril (volume final 15 µL). Em termociclador automático (GeneAmp® PCR System 2400 – Applied Biosystems) as amostras são submetidas a desnaturação inicial (94°C por 1 minuto) e 35 ciclos, com as seguintes temperaturas e tempos:

1. Desnaturação a 94°C - 10 segundos
2. Anelamento a 55°C - 5 segundos
3. Extensão a 60°C - 4 minutos

O produto desta nova reação de PCR foi então submetido à purificação: 2µL de acetato de amônio 7,5 M e 50µL de etanol absoluto são adicionados aos 10µL da reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante é removido por inversão e a seguir adicionou-se 100µL de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o DNA contido no fundo do microtubo. Para a completa remoção do etanol, as amostras foram submetidas à centrifugação invertida a 200 rpm por 7 segundos e, finalmente, aquecidas em placa térmica a 65°C por 5 minutos para a secagem. O produto da purificação foi armazenado a -20°C e protegido da luz com papel alumínio até a eletroforese. Para a eletroforese, adicionou-se 2 µL de “loading buffer”, uma mistura de formamida deionizada (Invitrogen), 25 mM EDTA (pH 8,0) com azul dextran (50mg/mL) na proporção de 5:1 em cada amostra. Elas foram homogeneizadas, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e colocadas em gelo para, a seguir, serem aplicadas em gel de poliacrilamida de 2 mm de espessura e separadas por eletroforese em seqüenciador automático (*ABI Prism 377 DNA Sequencer*, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

O gel para 100 mL foi composto por 4,5% de acrilamida / bis-acrilamida (19:1, volume final 10 mL), 36g de uréia, 1g de resina Dowex, 10 mL de tampão TBE 10X (108g de Tris, 55g de ácido bórico e 8,3g de EDTA dissódico, volume para 1000 mL). Desta solução, utiliza-se 20 mL para a montagem da placa adicionando-se 130 µL de persulfato de amônio (100 mg/mL) e 13 µL de TEMED. Após 2 horas de polimerização, a placa foi limpa e colocada em cassete para a eletroforese.

As condições de eletroforese são as seguintes: Voltagem – 1680 kV Corrente – 50.0 mA Potência 150 Watts Temperatura do gel – 50°C Potência do laser – 40.0 mW Tempo de corrida – cerca de 3 horas.

Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE

A genotipagem dos isolados foi efetuada através do PFGE, conforme os protocolos de Luzzaro et al. (2001), Romling e Tummeler (2000) e Silbert et al. (2001), com modificações.

As etapas cumpridas nessa técnica são as seguintes:

1º dia: Reativar os isolados de *P. aeruginosa* em BHI Agar, incubar em estufa a 35°C por 24 horas.

2º dia: Transferir cinco a dez colônias para meio TSB (tubos Falcon de 50 mL com 20 mL de meio), incubar em “Shaker” a 35°C por 24 horas.

3º dia: Centrifugar os tubos contendo as culturas a 5000 rpm por 5 minutos a 22°C. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 5 mL de salina 0,85% estéril (lavagem). Centrifugar novamente a 5000 rpm por 5 minutos a 22°C. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 mL de salina.

Adicionar 100 µL desta suspensão a 200 µL de TEN buffer o qual deverá ser misturado com 300 µL de solução de Agarose “Low Melting” a uma concentração de 2%, assim a mistura final ficará com concentração de 1% para formar os blocos.

Agarose “Low Melting”: Deve ser preparada com água destilada MilliQ grau 1.

Transferir para os Moldes “Plug”.

Conservar em geladeira a 4° C por 15 minutos.

Após a solidificação colocar os blocos em 3 mL de tampão EC por placa.

Adicionar Lisozima (solução de lise bacteriana) a esta solução de modo a obter uma concentração de 0,1 mg / mL. Incubar em estufa a 35° C por 24 horas.

4º dia: Aspirar a solução EC, lavar por 4 vezes (30 min) com tampão TE “low molarity”. Adicionar tampão ESP (proteínase K 0,1 mg / mL). Incubar por uma noite a 50° C.

5º dia: Aspirar a solução desproteinizante e lavar os blocos com solução de TE 1x “Low Molarity” por pelos menos 4x (lavagens de 30 min).

TE 1x: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA em pH 8,0.

Lavar por 4 x de 30 min com tampão “Dummy no Salt” para repor o magnésio.

Aspirar a solução e incubar os blocos por uma noite com Enzima de Restrição *SpeI* a 30° C com tampão correspondente, sendo 200 µL de tampão com 20U de enzima (para cada amostra: *SpeI* 1 µL) Normalmente o tampão é concentrado 10X, verificar e preparar a diluição correspondente.

SpeI: Usar a enzima a 5U por bloco.

6º dia: Preparar a Agarose para PFGE Grau Cromossômico a 1% com TBE 0,5X (Tampão TBE 0,5X: 45 mM Tris Borato; 1 mM EDTA).

OBS: Adicionar ao tampão de corrida 50 µM de tio-uréia para impedir a degradação do DNA pelos radicais reativos do Tris (tampão).

Condições de corrida:

Corrente 6,0 V/cm.

Ângulo de inversão 120°.

Pulsos 10s a 90s com subida linear.

Tempo de corrida - 20 horas.

Temperatura da cuba - 14° C.

Finalmente o gel foi fotografado o gel após ser banhado em brometo de etídio por 30 minutos.

O software utilizado para verificar o coeficiente de similaridade foi o Windows BIO PROFIL da BIOGENE Windows Application versão 99.04. Para a análise dos géis foi usado o BIOCAPT.MW versão 99.

RESULTADOS

Dos 154 isolados coletados no início do estudo, em 128 deles foi confirmada a resistência ao Imipenem nas subseqüentes técnicas realizadas. A maioria desses isolados foi obtida de pacientes admitidos nas enfermarias clínicas (40,6%), conforme pode ser visto na **Tabela 2**. As especialidades cirúrgicas, com exceção da neurocirurgia, obstetrícia e ginecologia, contribuíram com 17,2% dos isolados. A seguir, vêm as enfermarias de terapia intensiva e neurocirurgia. O material clínico em que foram recuperadas mais freqüentemente essas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi: urina (39,1%), secreções (25%) e sangue (10,9%), como mostra a **Tabela 3**. Esses 128 isolamentos foram feitos em 112 pacientes, de modo que em doze pacientes foram isoladas duas ou três cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre esses 128 isolados, apenas 6% deles foi proveniente de pacientes admitidos no Hospital Dr. Mário Gatti. Os materiais que originaram essas cepas, num mesmo paciente, nem sempre foram os mesmos, por exemplo: o microrganismo foi isolado do sangue e da secreção traqueal. O tempo decorrido entre esses isolamentos repetidos no mesmo paciente variou de zero a dezessete dias.

Em noventa e oito isolados, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do Imipenem. Na sua maioria (55%), foram altamente resistentes a esse antimicrobiano com CIM igual a 256 µg/mL. Esses resultados são exibidos no **Gráfico 1**.

Nesses mesmos isolados, foi pesquisada a produção de metalo beta-lactamases através do E-test MBL. Em 70 (71,4%) a produção dessas enzimas foi confirmada.

A genotipagem através do PFGE, realizada em 117 isolados, revelou um polimorfismo genotípico característico de *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar e em situações que não caracterizam surtos. A **Figura 1** apresenta os perfis de alguns isolados genotipados. Sete conglomerados foram observados, seis com dois isolados e um com três, conforme pode ser visto na **Figura 2**. Dentre os isolados agrupados em conglomerados, a maioria deles era produtor de metalo beta-lactamases, com exceção de dois casos em dois conglomerados distintos, em que um isolado era produtor e o outro não. Os demais 57 isolados produtores de metalo beta-lactamases possuíam genótipos únicos. Foram também encontradas cepas provenientes de um mesmo paciente com genótipos distintos, às vezes isoladas num mesmo dia e do mesmo material, bem como encontradas cepas de materiais distintos originadas de um mesmo paciente e com genótipos diferentes. Em um paciente foi

isolada uma linhagem recuperada de sangue e que pertencia a um conglomerado formado por dois pacientes e, nesse mesmo paciente, foi isolada uma outra linhagem de secreção traqueal, que também pertencia a um outro conglomerado de dois pacientes. Na **Tabela 4**, apresentamos a relação dos pacientes em que foram isolados mais de um exemplar de *Pseudomonas aeruginosa*, bem como os materiais em que foi recuperado esse agente, as datas, o local do isolamento e o genótipo. A **Tabela 5** exibe todas as informações em relação às linhagens observadas nos conglomerados encontrados.

Em uma amostra de 41 isolados foi pesquisada a existência de genes codificadores de metalo beta-lactamases. O trecho correspondente a fragmento do gene *bla_{SPM-1}*, com 649pb, foi amplificado em 12 casos. Um exemplo dessas amplificações pode ser visto na **Figura 3**. Nas cepas restantes, nenhum dos fragmentos correspondentes a genes codificadores de MBLs pesquisados foram encontrados. Infelizmente, na maioria das cepas agrupadas em conglomerados não foi feita a pesquisa por amplificação da metalo beta-lactamase envolvida. Somente em um conglomerado, o A17, ambos os isolados possuíam o *bla_{SPM-1}*. Nos demais, não houve conglomeração.

Numa amostra representativa de 5 isolados foi feito o seqüenciamento dos fragmentos amplificados, correspondentes ao gene *bla_{SPM-1}*. A seqüência de nucleotídeos encontrada foi correspondente à descrita para aquele gene.

Tabela 2- Distribuição dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, segundo o local do hospital em que foi obtido.

Enfermarias	No. de Isolados	(%)
Clínicas	52	40,6
Cirúrgicas	22	17,2
UTI	12	9,4
Neurocirurgia	12	9,4
Pronto socorro	6	4,7
Ambulatório	8	6,3
Obst/Ginecol	10	7,8
Outra	6	4,7
Total	128	

Tabela 3- Distribuição dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* estudados, segundo o material clínico em que foi obtido.

Material clínico	No. de Isolados	(%)
Urina	50	39,1
Secreções	32	25
Sangue	14	10,9
Ponta cateter	8	6,3
Líquidos	4	3,1
Outros	20	15,6
Total	128	100

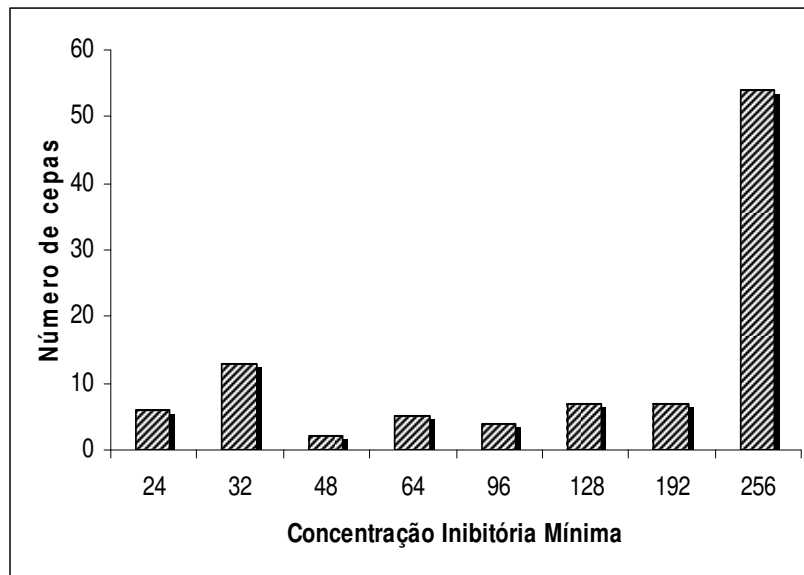


Gráfico 1- Distribuição dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* segundo as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de Imipenem observadas.

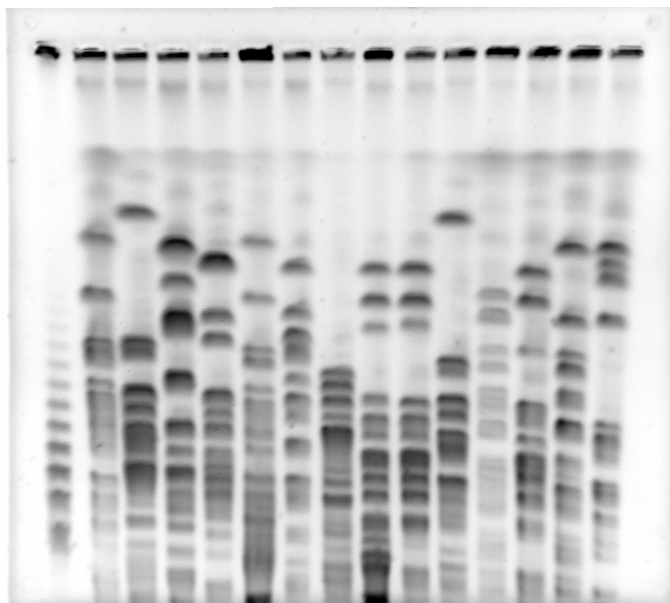


Figura 1- Exemplo de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) de isolados estudados.

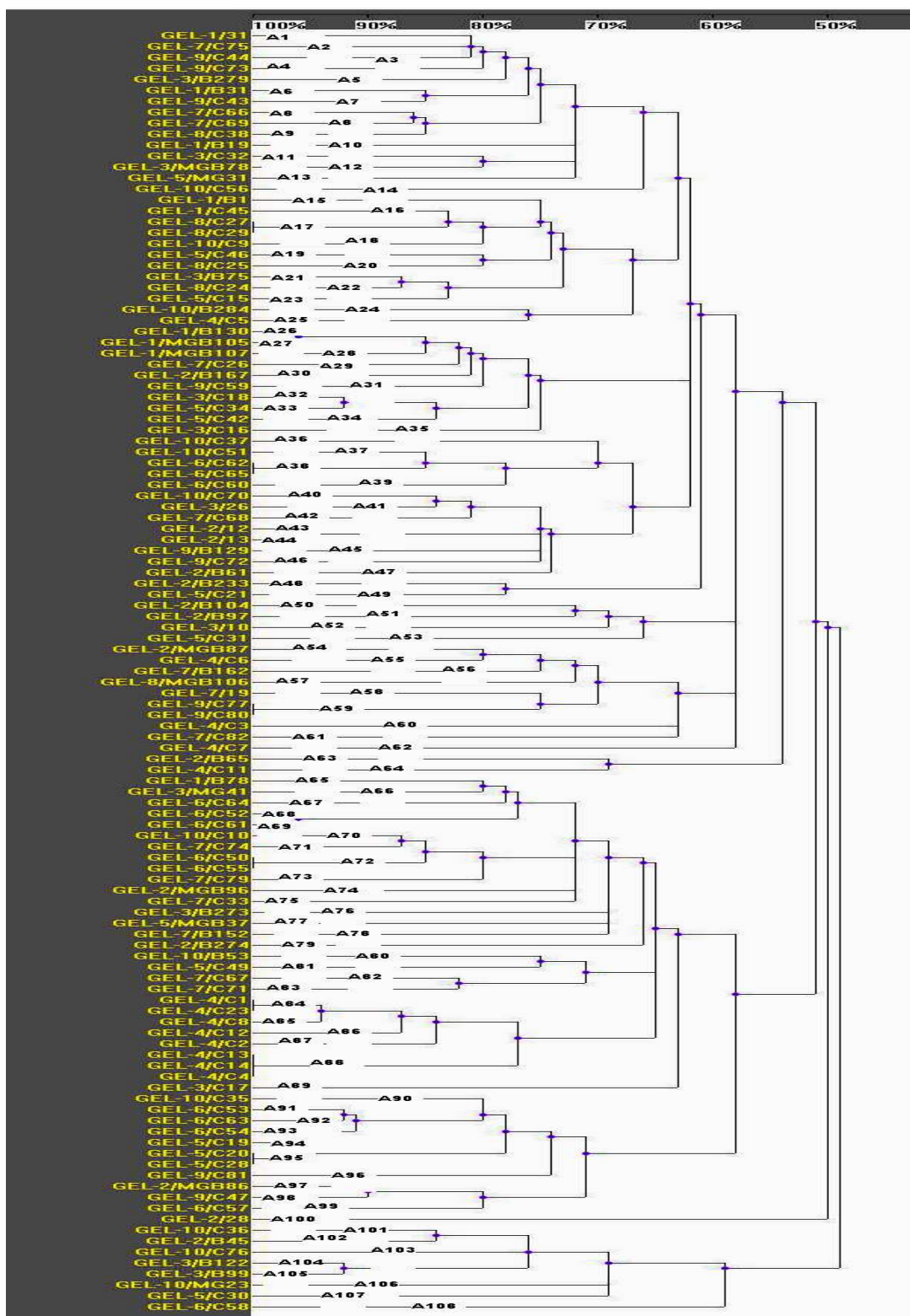


Figura 2- Dendrograma dos isolados genotipados pelo PFGE.

Tabela 4- Relação dos pacientes em que foram isoladas mais de uma cepa resistente ao imipenem, segundo o local do hospital, a data do isolamento, o material em que foi isolada e o genótipo.

Paciente (iniciais)	Local	Data	Material	Genótipo
JOS	UTI Adulto	24/10/02	Ponta Cateter	A74
	UTI Adulto	05/11/02	Ponta Cateter	A57
	UTI Adulto	05/11/02	Ponta Cateter	A28
LAOC	Cirurgia Trauma	21/04/02	Sangue	A102
	Cirurgia Trauma	21/04/02	Sangue	A47
TVS	Pediatria	23/06/02	Lavado Brônquico	P
	Pediatria	23/06/02	Lavado Brônquico	A26
RLS	Oncologia	24/06/04	Urina	A88
	Oncologia	26/06/04	Urina	A89
	Oncologia	07/07/04	Urina	A29
SP	Medicina Interna	09/07/04	Sangue	A95
	Medicina Interna	10/07/04	Secreção Traqueal	A17
RHRO	Oncologia	12/07/04	Urina	A107
	Oncologia	29/07/04	Urina	A3
ARS	Ortopedia	15/07/04	“Swab” Nasal	A90
	Ortopedia	22/07/04	Secreção Traqueal Surto	P*
MLPG	Retaguarda	18/07/04	Urina	A36
	UTI	17/07/04	Urina	A9
FST	Cirurgia Trauma	29/08/04	Urina	A31
	Cirurgia Trauma	01/09/04	Urina	A69
	Cirurgia Trauma	11/09/04	Urina	A8
LAG	Ambulatório	08/09/04	Ponta Cateter	A92
	Ambulatório	10/09/04	Secreção Traqueal Líquida	A82
JC	Moléstias Infecciosas	22/09/04	Urina	A46
	Moléstias Infecciosas	22/09/04	Sangue	A4
	Moléstias Infecciosas	22/09/04	Líquidos	A71
JBF	Ambulatório	26/09/04	Urina	A103
	Ambulatório	15/09/04	Urina	P*

* P- Prejudicado

Tabela 5- Relação das linhagens observadas segundo o paciente, o material em que foi isolada a cepa, a data do isolamento, o local do hospital, a concentração inibitória mínima do Imipenem e a produção de metalo beta-lactamase.

GENÓTIPO	Paciente	Material	Data	Local	CIM	MBL
A88	AC	Urina	21/5/04	Enfermaria Geral Adultos	256	+
	ECB	Urina	23/6/04	Obstetrícia	256	+
	RLS	Urina	24/6/04	Oncologia	256	+
A84	PFN	Sangue	20/5/04	Hematologia	24	-
	NB	Urina	03/07/04	Gastro Cirurgia	256	ND*
A95	CSV	Urina	29/06/04	Neuro Cirurgia	256	+
	SP	Sangue	09/07/04	Med Interna	256	+
A17	IARB	Urina Secreção	07/07/04	Laboratório Central	256	+
	SP	Traqueal	10/7/04	Med. Interna	256	+
A72	FCS	Urina Secreção	09/10/04	Oncologia	64	-
	MLBG	Ferida	24/08/04	Ginecologia	96	+
A38	JBF	Urina	01/09/04	Ambulatório	256	+
	LTM	Ponta Cateter	11/09/04	Bronco Adulto	256	+
A59	AAL	Urina	26/09/04	Pronto Socorro	32	ND*
	JRR	Urina	02/10/04	Neuro Cirurgia	32	ND*

*ND – Não determinado.

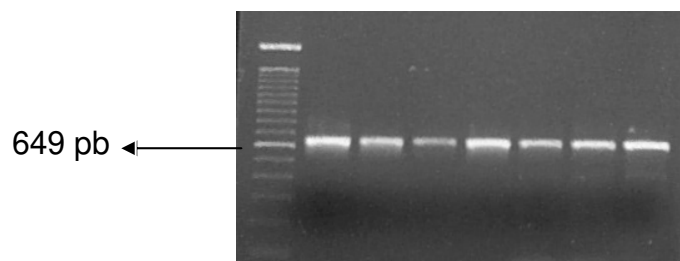


Figura 3- Amplificação do gene *bla*_{SPM-1}. Coluna 1: Marcador de 100pb; Coluna 2: controle positivo para o gene *bla*_{SPM-1} (649pb); Colunas 3 a 8: cepas portadoras do gene *bla*_{SPM-1}.

DISCUSSÃO

As bactérias Gram-negativas são motivo de bastante preocupação no ambiente hospitalar, pois causam mortalidade elevada quando acometem indivíduos já portadores de morbidades graves. Esses Gram-negativos resistentes a muitos antimicrobianos continuam a emergir e novas alternativas de tratamento não são disponíveis. O conhecimento da distribuição e dos determinantes dessas infecções adquire importância fundamental, nesse cenário, para a determinação da história natural dessas doenças e para a implantação de medidas preventivas (Bearman et al., 2006). A *Pseudomonas aeruginosa* está entre esses patógenos problemáticos e é um exemplo de organismo em que a resistência emerge com relativa facilidade. O uso de carbapenêmicos para o tratamento dessas infecções parece, em alguns estudos, ser associado a um risco adicional de doença provocada por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (Fortaleza et al., 2006). Em outros trabalhos, o uso de fluoroquinolonas, parece estar associado a esse mesmo risco (Jalal et al., 2000). No Brasil, o risco do isolamento de cepas multiresistentes esteve associado a: transferência entre hospitais, o uso de imipenem, vancomicina ou amicacina e a hemodiálise (Fortaleza et al., 2006). Pode ser até que, em locais diversos, alguns mecanismos operem de modo diferente de outros, como é o caso do encontro freqüente de metalo beta-lactamases no Brasil e não nos Estados Unidos, onde elas não aparecem com freqüência. O conhecimento desses fatos pode, sem dúvida, contribuir para a melhoria desse cenário (Patterson, 2006).

De fato, o encontro de organismos produtores de metalo beta-lactamases tem sido freqüente no Brasil. Vários surtos provocados por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de SPM-1, uma MBL originalmente caracterizada em São Paulo, já foram registrados em artigos de investigação de surtos, com a devida clonalidade estabelecida (Carvalho et al, 2006; Zavascki et al., 2005). Há, também, o registro, embora em número insuficiente, do encontro, em ambiente hospitalar, de organismos sem relação clonal (Sader et al., 2005).

Num período relativamente curto de observação, de pouco mais de dois anos, conseguimos recolher, a partir de materiais biológicos diversos, um número grande de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos. Esse achado, isoladamente, atesta a importância dos fatos comentados.

A recuperação desses organismos resistentes ao Imipenem é registrada também em outros hospitais brasileiros. Segundo Renato Grinbaum¹ (2003) “o Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo registrou que a frequência desses isolados elevou-se de cinco para cerca de 25 casos por mil pacientes por dia no período de 2000 a 2001.” A resistência aos carbapenêmicos, conforme avaliada pelo projeto SENTRY em vários hospitais brasileiros foi encontrada em 2 a 68% dos isolados (Sader et al., 2005).

O encontro de metalo beta-lactamases em cepas resistentes ao imipenem foi também freqüente em nosso estudo e esses dados estão em consonância com os do projeto SENTRY, em que 70% dos isolados analisados eram produtores de metalo beta-lactamases, na sua maioria SPM-1 (Sader et al., 2005). Naquele estudo foi feita ainda a ribotipagem dessas cepas e houve clonalidade demonstrada na maioria das cepas produtoras de SPM-1.

O estudo da clonalidade das cepas isoladas em nosso trabalho, realizado pelo PFGE, revelou interessantes fatos. Sete conglomerados foram observados, seis com dois isolados e um com três, com 100% de similaridade. Em primeiro lugar, a grande diversidade de genótipos foi surpreendente. Sabe-se que esse organismo, quando isolado em ambiente hospitalar possui essa característica, porém no nosso caso isso foi adiante. Bonten et al (1999) quando investigaram a endemicidade de *P. aeruginosa* em unidades de terapia intensiva (UTIs) encontraram 44 genótipos diferentes. Arruda et al (1999) também avaliaram infecções por *P. aeruginosa* em UTIs do Hospital da Universidade de São Paulo e concluíram que elas foram causadas por múltiplas linhagens. Há suspeitas de que essa ampla variedade de genótipos desses organismos se dá facilmente pela disseminação através da água hospitalar (Bertrand et al., 2001; Blanc et al., 2004).

Observamos o isolamento de mais de uma linhagem em um mesmo paciente, em alguns casos obtidos de um mesmo material biológico. Isso pode ter acontecido, pois esses pacientes deviam ser intensamente colonizados, com ocorrência de infecção posterior, além de serem altamente manipulados e com intenso uso de antimicrobianos. Em mais de um caso, encontramos uma dessas linhagens em outros pacientes, configurando um “cluster”, em que, certamente, houve a transmissão por fonte comum.

¹ <http://www.aeciherj.org.br/eventos/2003/RenatoGrinbaumPolimixina.pdf>

Os pacientes LAG e JBF, embora admitidos no ambulatório, apresentaram isolados resistentes ao Imipenem. Isso aconteceu provavelmente porque esses pacientes devem ter tido alta hospitalar alguns dias antes da coleta do material.

Ainda, as cepas produtoras de metalo beta-lactamases não estavam, na sua maioria, agrupadas em conglomerados e, sim, exibiam genótipos únicos.

A diversidade de genótipos encontrados significa que cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao Imipenem estão amplamente disseminadas pelo hospital. É preciso que medidas preventivas de controle de infecção hospitalar sejam reforçadas, como a prática de higiene das mãos e o controle do uso de antimicrobianos.

O único gene codificador de MBL encontrado em nosso trabalho foi o *bla*_{SPM-1}, observado em 29,3% dos casos de organismos produtores de MBLs. Embora não tenham sido pesquisados esses genes em todos os isolados produtores de MBLs, a amostra analisada correspondeu à maioria deles, ou seja, cerca de 58,6%. Essa enzima tem sido caracterizada na maioria dos surtos de infecção por *P. aeruginosa* resistente ao Imipenem observados no Brasil. Não conseguimos encontrar a origem das MBLs nos demais isolados em que se demonstrou a sua produção. Deles não foi amplificado nenhum dos trechos de gene pesquisados. Pode ser que nessas cepas haja a produção de uma MBL, mesmo que de um dos grupos pesquisados, porém não amplificável com os iniciadores utilizados. Mais pesquisas deverão ser feitas nessas cepas para determinar-se o exato mecanismo de resistência desses casos.

CONCLUSÕES

A frequência de isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBLs é de 71,4 %.

Apenas o gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado, em 29,3% dos isolados pesquisados.

Não houve relação genética significativa entre os isolados produtores de MBLs.

A amostra analisada apresentou multiclonalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:43-8.

Arruda EA, Marinho IS, Boulos M, Sinto SI, Caiaffa HH, Mendes CM, et al. Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20:620-3.

Bearman GM, Munro C, Sessler CN, Wenzel RP. Infection control and the prevention of nosocomial infections in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27: 310-24.

Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, et al.

Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units *Intensive Care Med* 2001; 27:1263-68.

Blanc DS, Nahimana I, Petignat C, Wenger A, Bille J, Francioli P. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization / infections in intensive care units *Intensive Care Med* 2004; 30:1964–68.

Bonomo RA, Szabo D Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43 Suppl 2:S49-56.

Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1212–19.

Bukholm G, Tannaes T, Kjelsberg AB, Smith-Erichsen N. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* associated with increased risk of patient death in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23:441-6.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1379-82.

Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques Ede A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* 2006; 12:103-8.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4654-4661.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318–1322.

Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:785–790.

Danel F, Hall LMC, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1362–1366.

Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67:351-68.

Fortaleza CM, Freire MP, Filho Dde C, de Carvalho Ramos M. Risk factors for recovery of imipenem-or-ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among patients admitted to a teaching hospital in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 901-6.

Gales AC, Sader HS, Jones RN. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44:301-11.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:699-702.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988;16:128-40.

Gaynes R, Edwards JR. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005; 41:848-54.

Grinbaum RS. Bactérias multirresistentes[aula “on line” apresentada em evento]. Rio de Janeiro, 2003. [19-07-2007]

<http://www.aeciherj.org.br/eventos/2003/RenatoGrinbaumPolimixina.pdf>

Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1637–1644.

Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:2-4.

Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:710-2.

King A, Shannon K, Phillips I. Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:1037-41.

Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 2005; 128:3854-62.

Lautenbach E, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Sheridan A, Fishman NO. Imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk factors for infection and impact of resistance on clinical and economic outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:893-900.

Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2046-8.

Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1865-70.

Marra AR, Pereira CA, Gales AC, Menezes LC, Cal RG, de Souza JM, et al. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:388-90.

Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4693-702.

Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:378-86.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. M100-S14. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 14th informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

National Nosocomial Infections Surveillance System National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-85.

Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:128-31.

Patterson JE. Multidrug-resistant gram negative pathogens multiple approaches and measures for prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:889-92.

Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron located gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:447-453.

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

Raymond DP, Pelletier SJ, Crabtree TD, Evans HL, Pruett TL, Sawyer RG. Impact of antibiotic-resistant Gram-negative bacilli infections on outcome in hospitalized patients. *Crit Care Med* 2003; 31:1035-41.

- Romling U, Tummeler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2000; 38:464-465.
- Rossolini GM. Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. Clin Infect Dis 2005; 41:1557-8.
- Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis 2004; 8:25-79.
- Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Antimicrob Agents 2005; 25:57-61.
- Silbert S, Barth AL, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2001; 39:3976-81.
- Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:52-7.
- Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey - A nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2265-69.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18:306-25.
- Washington CW Jr. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6ª edição. United States of America: Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 1535 p.
- Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-{beta}-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother 2005; 56:1148-51.