

KARYNE RANGEL CARVALHO

**DETECÇÃO DE β -LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE
PACIENTES INTERNADOS EM HOSPITAIS DE SÃO LUIS DO MARANHÃO**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2004

**DETECÇÃO DE β -LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE
PACIENTES INTERNADOS EM HOSPITAIS DE SÃO LUIS DO MARANHÃO**

Karyne Rangel Carvalho

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa
de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da
Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do
título de Mestre

Orientadora: Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro
2004

FOLHA DE APROVAÇÃO

DETECÇÃO DE β -LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS EM HOSPITAIS DE SÃO LUIS DO MARANHÃO

Karyne Rangel Carvalho

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado:

_____ (IOC / FIOCRUZ)
Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

_____ (INCQS / FIOCRUZ)
Dra. Maria Helena Simões Villas Boas

_____ (INCQS / FIOCRUZ)
Dr. Victor Augustus Marin

_____ (INCQS / FIOCRUZ)
Orientadora: Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Karyne Rangel

Detecção de β -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes internados em hospitais de São Luis do Maranhão. Karyne Rangel Carvalho. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2004.

xvi, p., fig., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2004. Orientadora: Verônica Viana Vieira.

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. β -lactamases 3. Metallo- β -lactamase 4. PFGE 5. Infecção Hospitalar

I. Título

Aos meus queridos filhos, esposo e
pais, dedico com muito amor este trabalho.

Existe somente uma idade para ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos. (...) Essa idade tão fugaz na vida da gente se chama PRESENTE e tem a duração do instante que passa.

(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

A Deus que tornou meu sonho possível;

Aos meus pais pelo apoio, paciência e por me ensinarem o caminho que deveria andar;

Ao meu querido marido João Luiz que com amor sempre me incentivou e acreditou que eu seria capaz;

Aos meus lindos filhos João Pedro e Izabella que são a luz da minha vida;

À minha orientadora Verônica Viana Vieira que contribuiu de maneira grandiosa em minha vida científica;

Às amigas Carmen Lucia e Vanda pela sincera amizade, carinho e incentivo;

À Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki, minha primeira orientadora, pela amizade e por tudo que me ensina até hoje;

À Maria Helena Simões Villas Boas pela amizade, paciência e eterno bom-humor;

À Marília Martins Nishikawa que me apresentou a FIOCRUZ;

Ao Setor de Identificação Bacteriana, em especial;

A todo Setor de Biologia Molecular, Paola, Regina, Renata e Suely;

A todos dos Setores de Microrganismos de Referência, Saneantes, Vacinas, e Meio de Cultura do DM/INCQS;

Ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ;

Às colegas Simone e Gisele da secretaria de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, na pessoa do seu diretor, Dr. André Luis Gemal;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) que contribuiu para a execução desta tese;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais patógenos nosocomiais. Atualmente, a emergência de clones multirresistentes causando surtos hospitalares têm sido descritas em diversos países, inclusive no Brasil e consiste num grave problema. A resistência adquirida aos β -lactâmicos, que estão entre as drogas de primeira linha indicadas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, pode ser resultante da produção de β -lactamases. Neste estudo, foram analisadas 214 *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em hospitais de São Luís do Maranhão no período de junho de 2001 a junho de 2002. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco-difusão conforme as recomendações do NCCLS. A presença das seguintes séries de genes codificadores de β -lactamases: CARB, IMP, OXA, PSE, SHV, SPM, TEM e VIM foi determinada através da técnica da PCR em isolados que apresentaram-se positivos em testes de detecção fenotípicos ou que apresentaram perfil de resistência característico para as séries de β -lactamases citadas. Vários isolados apresentaram diferentes séries de β -lactamases, e apenas as séries de metalo- β -lactamases IMP e VIM não foram detectadas nos isolados estudados. A caracterização genotípica dos isolados produtores de β -lactamases foi realizada através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), após tratamento do DNA cromossômico com a enzima de restrição *Spe I*. Foram observados diversos genótipos entre os isolados que apresentaram a mesma série de β -lactamases, mostrando a disseminação destas enzimas nesta espécie nos hospitais de São Luís do Maranhão. Apenas os isolados produtores da enzima SPM-1 apresentaram o genótipo 3 que foi detectado nos últimos 5 meses do estudo, sugerindo o início da introdução desta metalo- β -lactamase no Maranhão. Estudos relacionados à caracterização molecular e resistência a antimicrobianos de isolados hospitalares podem fornecer informações fundamentais para auxiliar as ações dos programas de controle de infecções hospitalares. Nossos resultados mostram a importância da detecção de isolados de *P. aeruginosa* produtores de β -lactamases, que na maioria dos casos teriam opções terapêuticas limitadas, para prevenir o espalhamento destes e os conseqüentes surtos hospitalares.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common and important nosocomial pathogen. β -lactams antibiotics represent the most commonly prescribed antibacterial agents for treating infections caused by *P. aeruginosa*. Strains with acquired resistance to β -lactams may be result from the production of β -lactamases. In this study, we analysed 214 isolates of *P. aeruginosa* obtained from clinical specimens taken from patients hospitalized in Sao Luis do Maranhão from June 2001 to June 2002. Susceptibility tests were determined by the disk diffusion method in accordance with NCCLS guidelines. The presence of genes encoding CARB, IMP, OXA, PSE, SHV, SPM, TEM and VIM β -lactamases were investigated by PCR in DNA of the isolates that showed particularly resistant phenotypes or in β -lactamase producers detected by phenotypic tests. Several isolates produced different β -lactamases types. None of the isolates gave positive PCR results for sequences encoding IMP or VIM enzyme types. Genetic characterization of isolates β -lactamase producers was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the restriction endonuclease *SpeI*. By PFGE twenty-six genotypes were found in *P. aeruginosa* isolates β -lactamases producers. *P. aeruginosa* isolates exhibiting one of β -lactamase types (CARB, OXA, PSE, SHV or TEM) revealed several genotypes indicating the nosocomial spread of these β -lactamases. The SPM β -lactamase type was detected only in isolates belonging to genotype 3. The presence of *P. aeruginosa* carrying the *bla_{SPM}* gene in the last five months studied suggested the introduction of this metallo- β -lactamase. Genetic characterization of nosocomial isolates and antimicrobial resistance studies is important to support and enhance the efforts of the infection control programs. Our results showed that the detection of *P. aeruginosa* β -lactamase producers that have limited therapeutic options is necessary for protection against spreading nosocomial these isolates.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma

mM – milimolar

$^{\circ}\text{C}$ – graus celsius

DNA – ácido desoxiribonucleico

dATP – deoxiadenosinucleosídeo trifosfato

dCTP – deoxicitosinucleosídeo trifosfato

dGTP – deoxiguaninucleosídeo trifosfato

dNTP – deoxinucleosídeo trifosfato

dTTP – deoxitimina trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ESP – edta sarcosina

Kb – kilobase

M – concentração molar

mA – mili ampére

MgCl_2 – cloreto de magnésio

mL – mililitro

N – concentração normal

NaCl – cloreto de sódio

ng – nanograma

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial de hidrogênio

PIV – cloreto de sódio tris

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

TAE – tris acetato edta

TBE – tris ácido bórico

TE – tris edta

Tris – hidroximetil amino metano

U – unidade

UFC – unidade formadora de colônia

V – volume

V/cm – voltz por centímetro

LISTA DE SIGLAS

AD3 – Técnica de Aproximação de Discos utilizando o tazobactam como inibidor de β -lactamase

AD5 – Técnica de Aproximação de Discos utilizando o ácido clavulânico como inibidor de β -lactamase

AMI - amicacina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATM - aztreonam

CAZ - ceftazidima

CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CIP- ciprofloxacina

CN- gentamicina

CRO - ceftriaxone

CTX - cefotaxima

ESBL – β -lactamase de espectro estendido

FEP - cefepime

GCG – Genetics Computer Group

IPM - imipenem

M β la – Metallo- β -Lactamase

M β la/2MP – Teste de aproximação de discos utilizando ácido 2-mercaptopropiônico como inibidor de metalo β -lactamase

M β la/EDTA – Teste do disco imipenem-EDTA

MEM - meropenem

MP – Ácido 2-Mercaptopropiônico

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NNISS – National Nosocomial Infection Surveillance System

NOR - norfloxacin

PB - polimixina

PCIH – Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar

PFGE – Pulsed Field Gel Electroforesis

PRL - piperacilina/tazobactam

SCIH – Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

SENTRY – Antimicrobial Surveillance Program

SUS – Serviço Único de Saúde

TOB – tobramicina.

UCISA – Unidade de Controle de Infecção em Serviços de Saúde

UTIs – Unidade de Terapia Intensiva

NR – não realizado

LISTA DE ESQUEMAS

	pg
Esquema 1. Técnica de aproximação de Discos utilizando o ác. clavulânico (AD5) e tazobactam (AD3) como inibidor de b-lactamase	21
Esquema 2. Teste do disco imipenem-EDTA (Mbla/EDTA) e Teste de aproximação de discos utilizando ácido 2-mercaptopropiônico como inibidor de metalo b-lactamase (Mbla/2MP)	22

LISTA DE FIGURAS

	pg
Figura 1. Testes fenotípicos para detecção de β -lactamases de espectro estendido. A - Testes AD3 e AD5 negativos. B – Teste AD3 positivo indicando a produção de ESBL. C - Teste AD5 positivo indicando a produção de ESBL.	29
Figura 2. Testes fenotípicos para detecção de metalo- β lactamases. A - Testes M β la/2MP e M β la/EDTA negativos. B – Teste M β la/2MP positivo indicando a produção de M β la. C - Teste M β la/EDTA positivo indicando a produção de M β la.	30
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR de diferentes genes de β -lactamases a partir de isolados de <i>P. aeruginosa</i> .	31
Figura 4. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com <i>Spe I</i> e separados por PFGE de representantes de isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram os genótipos predominantes de metalo- β -lactamases.	32
Figura 5. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com <i>Spe I</i> e separados por PFGE dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram a série TEM de β -lactamases.	33
Figura 6. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com <i>Spe I</i> separados por PFGE dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram β -lactamases	34
Figura 7. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com <i>Spe I</i> e separados por PFGE dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram β -lactamases.	35
Figura 8. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com <i>Spe I</i> e separados por PFGE dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram β -lactamases.	36

LISTA DE TABELAS

	pg
Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações em cadeia da Polimerase	21
Tabela 2. Critérios para a interpretação dos perfis de PFGE ^a	22
Tabela 3. Isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivos para os testes de detecção fenotípica de β -lactamases de espectro estendido, AD3 e AD5.	33
Tabela 4. Isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivos para os testes de detecção fenotípica de metalo- β -lactamases M β 1a/2MP e M β 1a/EDTA.	34
Tabela 5. Isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que apresentaram uma das séries de β -lactamases através da técnica de PCR.	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais e Espectro Clínico das Infecções Causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como patógeno de Infecções Hospitalares	2
1.3 Infecção Hospitalar e Vigilância Sanitária	3
1.4 Resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos Agentes Antimicrobianos	4
1.5 β -lactamases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.6 Detecção de β -lactamases	10
1.7 Tipagem Genotípica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12

2 OBJETIVOS

14

3 METODOLOGIA

3.1 Isolados bacterianos	15
3.2 Identificação da espécie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
3.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	15
3.4 Detecção de β -lactamases de espectro estendido	16
3.4.1 Técnica de aproximação de discos (AD3 e AD5)	16
3.5 Detecção de metalo- β -lactamases	17
3.5.1 Teste de aproximação de discos utilizando ácido 2-mercaptopropiônico como inibidor de metalo β -lactamase (M β la/2MP)	17
3.5.2 Teste do disco imipenem-EDTA (M β la/EDTA)	17
3.6 Extração de DNA total pelo método de choque térmico	18
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	18
3.8 Eletroforese em gel de agarose	19
3.9 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	19
3.10 Interpretação dos perfis de bandas obtidos pelo PFGE	20

4 RESULTADOS

4.1 Isolados bacterianos	25
4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	25
4.3 Detecção fenotípica de β -lactamases de espectro estendido (ESBL)	25

4.4 Detecção fenotípica de metalo- β -lactamases	26
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	26
4.6 Presença do gen <i>Int1</i> em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtores de β -lactamases	27
4.7 Análise de DNA cromossômico através de eletroforese de campo pulsado (PFGE)	27
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	44
7 BIBLIOGRAFIA	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais e Espectro Clínico das Infecções Causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

A espécie *Pseudomonas aeruginosa*, compreende bastonetes Gram-negativos, aeróbios, não formadores de esporos, nutricionalmente versáteis, móveis devido à presença de um ou mais flagelos polares, que possuem metabolismo oxidativo. Isolados desta espécie bacteriana apresentam-se como oxidase-positivos, catalase positivas, com crescimento ótimo entre 37 a 42 °C, capazes de converter o nitrato a nitrito e/ou gás nitrogênio e produtores de pigmentos difusíveis em meios de cultura sólidos, incluindo pioverdina, piocinina (verde-azulado), piorrubina (vermelho) e piomelanina (preto) (KISKA & GILLIGAN, 1999).

Este microrganismo é saprófito, encontrado no meio ambiente (água, solo, planta e esgoto) e em baixa frequência fazendo parte da microbiota de indivíduos saudáveis. Nestes casos, o trato gastrintestinal é o lugar mais freqüente de colonização, mas outras regiões úmidas do corpo, incluindo a garganta, mucosa nasal e superfícies da pele como as axilas e períneo também podem ser colonizados (KISKA & GILLIGAN, 1999). Entretanto, devido à sua habilidade de sobreviver em materiais inertes tais como pias e equipamentos de terapia respiratória, que atuam como reservatórios de *P. aeruginosa*, e a sua resistência à maioria dos anti-sépticos e antibióticos tornaram esta espécie um importante e freqüente patógeno nosocomial (DUBOIS et al., 2001).

O espectro clínico das infecções causadas por *P. aeruginosa* varia desde infecções superficiais da pele a infecções agudas. Infecções comunitárias causadas por este agente bacteriano, em indivíduos que não apresentam imunossupressão, geralmente tendem a ser localizadas e associadas ao contato com água ou soluções contaminadas (PALLERONI, 1998). Este microrganismo é um importante patógeno respiratório em pacientes portadores de fibrose cística, uma doença genética autossômica recessiva que apresenta como uma das principais manifestações clínicas a doença pulmonar. Neste caso, os pacientes internados são facilmente contaminados durante a terapia respiratória (SAIMAN & SIEGEL, 2004). *P. aeruginosa* também pode ser agente de infecções da corrente sanguínea, em pacientes com doenças neoplásicas ou hematológicas, ou associado à ocorrência de queimaduras, endocardite, problemas urológicos e pneumonia. No ambiente hospitalar, esta espécie bacteriana representa uma das três causas mais comuns de pneumonia em pacientes fazendo

uso de respiradores artificiais e uma importante causa de infecções do trato urinário em pacientes em uso de cateteres urinários (RONALD, 2003).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno de Infecções Hospitalares

A vigilância dos principais patógenos relacionados a infecções hospitalares tem fornecido dados importantes sobre a ocorrência de *P. aeruginosa*.

Nos Estados Unidos, aproximadamente 245 hospitais enviam seus dados voluntariamente ao sistema NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance System) que é conduzido pelo programa de infecções hospitalares do CDC (Centers for Disease Control and Prevention). De acordo o NNIS, *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno mais isolado em casos de pneumonia em unidades de terapia intensiva (UTIs) na década passada (NNIS, 1999).

O sistema de vigilância MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), patrocinado pelo laboratório Zeneca, monitora a susceptibilidade a carbapenemas e outros antimicrobianos. Segundo dados obtidos através deste sistema na Europa, *P. aeruginosa* foi o segundo (13,9%) agente mais isolado em UTIs e o primeiro agente (68,8%) em unidades para pacientes com fibrose cística (MENDES et al., 2000).

Um estudo realizado pelo programa SENTRY de vigilância antimicrobiana (“SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”) em amostras isoladas do trato respiratório de pacientes com pneumonia, em hospitais do Canadá e Estados Unidos, no ano de 1997, mostrou *P. aeruginosa* (18,1%) como a espécie mais freqüente após *S. aureus* (22,9%). Outro estudo realizado pelo programa SENTRY, no período de 1997 a 1999, mostrou que *P. aeruginosa* foi a espécie mais freqüentemente isolada do trato respiratório, seguido por ferida cutânea, trato urinário e corrente sanguínea, sendo que as maiores taxas de isolamento do trato respiratório foram nas regiões da América Latina, Pacífico-Asiática e Europa (GALES et al., 2001).

No Brasil, alguns estudos realizados mostraram também a presença desta espécie bacteriana em nosso meio hospitalar. Um estudo realizado por De Moraes e colaboradores (2000), no Hospital Universitário Gafrée & Guinle a partir de várias fontes clínicas mostrou que *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno mais isolado. Sader e colaboradores (2001) realizaram um estudo sobre o padrão de resistência bacteriana em hospitais de quatro estados brasileiros e revelaram que *P. aeruginosa* foi o terceiro patógeno mais freqüentemente

isolado, enquanto Severino e Magalhães (2002) verificaram que este microrganismo foi o mais isolado de infecções em UTIs em hospitais de São Paulo.

O aparecimento de surtos nosocomiais devido a *P. aeruginosa* depende de vários fatores que permitem que os pacientes tenham sua microbiota bacteriana normal substituída por bactérias da microbiota hospitalar, uma vez que a colonização é uma condição necessária para a instalação da infecção. Entre estes fatores estão algumas condições ambientais tais como: o consumo de antimicrobianos de largo espectro, o uso de dispositivos invasivos, manipulação do paciente pelos profissionais de saúde, onde as mãos são o principal veículo de propagação destes organismos entre os pacientes, e também características especiais do microrganismo tais como: fatores de virulência, resistência a antimicrobianos, aderência, entre outros (FOCA et al., 2000; DAROICHE, 2001; FARR, 2001; LESCH et al., 2001).

1.3 Infecção Hospitalar e Vigilância Sanitária

Infecção Hospitalar ou nosocomial é definida como infecção não evidenciada na admissão hospitalar, sendo adquirida durante o período de internação, mas podendo manifestar-se após alta do paciente. Após a alta, este tipo de infecção pode ser evidenciado até 30 dias após cirurgia sem colocação de prótese ou 1 ano com colocação de prótese (BENNETT & BRACHMAN, 1998). Este tipo de infecção é considerado um grave problema de saúde pública, por contribuir com o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade, elevando o tempo de hospitalização e os custos com tratamentos (JARVIS, 1987; WEBER & RUTALA, 1989; EMORI & GAYNES, 1993).

Embora grande parte das infecções hospitalares seja de origem endógena e portanto de difícil prevenção, é considerável o número de infecções hospitalares que podem ser evitadas. O controle das infecções hospitalares passa, portanto, por um conjunto de ações que ao serem implementadas repercutam diretamente na melhoria da qualidade dos serviços prestados pelos hospitais com objetivo de reduzir ao máximo a incidência e a gravidade das infecções neste ambiente.

A Lei nº 9431, de 6 de janeiro de 1997 (BRASIL, 1997) dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem um Programa de Infecções Hospitalares e criarem uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) para execução deste controle, além de determinar as atividades do Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH). As diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares que

viabilizaram o planejamento do programa foram definidas pela Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998). De acordo com esta Portaria, as Comissões de Controle de Infecções Hospitalares devem ser compostas por membros consultores e executores, sendo esses últimos representantes do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e responsáveis pela operacionalização das ações programadas do controle de infecção hospitalar.

Atualmente, as diretrizes gerais para o Controle das Infecções em Serviços de Saúde são delineadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, através da Unidade de Controle de Infecções em Serviços de Saúde (UCISA). As ações e serviços voltados para a prevenção e o controle de infecções hospitalares devem ser organizados de maneira a obedecerem aos princípios, diretrizes e normas de organização, direção e gestão do Sistema Único de Saúde (SUS), definidos através da Lei 8080 de 19 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990).

Em julho de 2000, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou a Resolução RDC nº 48, que estabelece o roteiro de inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar (BRASIL, 2000) para realização da avaliação do cumprimento das ações do programa de Controle de Infecção Hospitalar.

Apesar de alguns centros no Brasil como São Paulo, Rio de Janeiro e Florianópolis participarem do programa SENTRY de vigilância de resistência aos antimicrobianos, criado para monitorar infecções hospitalares através de uma rede de laboratórios sentinelas distribuídos pelo mundo e da legislação citada acima, que visa a redução da incidência e gravidade das infecções hospitalares, dados sobre esse problema e eficiência dos programas são ainda escassos (SADER et al.,1997).

1.4 Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos Agentes Antimicrobianos

Infecções causadas por *P. aeruginosa* são frequentemente difíceis de tratar uma vez que estes microrganismos possuem altos níveis de resistência a vários antimicrobianos, devido a mecanismos de resistência intrínsecos, além disto, podem rapidamente desenvolver resistência a outras drogas durante a quimioterapia (GILLIGAN, 1995; GIAMARELLOU, 2000).

Dentre os mecanismos responsáveis por esta marcante resistência intrínseca, destacam-se: a baixa permeabilidade da membrana externa que apresenta apenas porinas que

permitem a difusão de pequenas moléculas (YOSHIMURA & NIKAIDO, 1982), diminuindo o acesso da maioria dos β -lactâmicos hidrofílicos a seus alvos, as proteínas que ligam penicilinas (PBPs) (KÖHLER et al., 1999); os sistemas de efluxo que são mecanismos desenvolvidos pelas bactérias para se protegerem contra compostos tóxicos, excluindo assim os antimicrobianos para fora da célula bacteriana através de proteínas de transporte situadas na membrana celular (LOMOVSKAYA et al., 2001); a produção de β -lactamases periplasmáticas que hidrolisam β -lactâmicos, somando seus efeitos na resistência à ação das bombas de efluxo (LIVERMORE, 1989; LI et al., 1995) e produção das enzimas inativadoras de aminoglicosídeos expressas em quase todos os isolados de *P. aeruginosa* que modificam os antimicrobianos através de acetilação, fosforilação ou adenilação (MINGEOT-LECLERCQ, GLUPCZYNSKI & TULKENS, 1999).

Entretanto existem antimicrobianos que superam as barreiras inerentes da *P. aeruginosa* e são efetivos contra a maioria dos isolados, entre eles estão algumas ureidopenicilinas (piperacilina) e carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina); cefalosporinas de 3º geração (ceftazidime), cefalosporina de 4º geração (cefepime), carbapenemas (imipenem e meropenem); o monobactâmico aztreonam; aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina); fluorquinolonas (ciprofloxacina) e polimixinas (PITT, 1998). Em alguns casos, infecções por este microrganismo requerem terapia com aminoglicosídeos em combinação com agentes β -lactâmicos (QUINN et al., 1986; BURWEN, BANERJEE & GAYNES, 1994; BASUSTA OGLU et al., 1995). Porém, a resistência a estes agentes é detectada logo após a introdução de cada um deles, estando relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso e indiscriminado desses medicamentos e a fatores relacionados às bactérias (NIKAIDO, 1994; FRIEDRICH, WHITE & BOSSO, 1999).

A emergência e disseminação de organismos multirresistentes representam a convergência de uma série de fatores que incluem, mutação em genes de resistência que tem seu espectro de atividade ampliado, a troca de informação genética entre microrganismos, pressões seletivas em hospitais e comunidades de organismos resistentes que proliferam e disseminam clones multirresistentes, e a incapacidade dos métodos utilizados em laboratório clínico para detectar a emergência de fenótipos resistentes (LIVERMORE & BROWN, 2001).

Uma característica marcante das infecções causadas por *P. aeruginosa* adquiridas em UTIs é a multirresistência (GOLDMAN & HUSKINS, 1997), o que reflete diretamente o uso de maior quantidade de antimicrobianos nesse ambiente, ocorrendo possivelmente a transmissão de cepas multirresistentes entre os pacientes. Conforme relatado pelo sistema de

vigilância NNISS em 2000 (NNISS, 2000), a resistência ao imipenem, ceftazidima e piperacilina em amostras de pacientes internados em UTIs foi de aproximadamente 2,5 vezes maior do que a encontrada em amostras de pacientes do ambulatório. Dados relativos a amostras isoladas de UTIs de países europeus obtidos pelo sistema de vigilância MYSTIC mostraram que *P. aeruginosa* apresentou a menor taxa de susceptibilidade a ciprofloxacina (65,3%) e a maior a piperacilina-tazobactam (84,2%). Foram observadas as seguintes taxas para as outras drogas: imipenem (69,8%), ceftazidima (73%) e meropenem (79,5%) (KIFFER et al., 2001).

Dados do programa SENTRY, provenientes de amostras de *P. aeruginosa* isoladas em hospitais da América Latina, mostraram as seguintes taxas de resistência: ciprofloxacina (25,5%), imipenem (24,2%), piperacilina-tazobactam (22,8%), ceftazidima (22,1%), amicacina (20,1%), meropenem (11,4%) e cefepime (6,7%) (SADER et al., 1998). Quando comparados os percentuais de resistência a antimicrobianos entre amostras de *P. aeruginosa* obtidos por Pellegrino e colaboradores (2002) em instituições de saúde no Rio de Janeiro, com aqueles obtidos por Sader e colaboradores (1998), podemos observar que os percentuais de resistência apresentados pelas amostras do primeiro estudo foram 5 a 10% maiores para os antimicrobianos piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, imipenem e meropenem.

Amostras de *P. aeruginosa* susceptíveis apenas a polimixina têm sido isoladas em São Paulo (LEVIN et al., 1999) e no Rio de Janeiro (PELLEGRINO et al., 2002). Este antimicrobiano foi comercializado no Brasil até o início dos anos 80, sendo indicado para o tratamento de infecções causadas por bastonetes Gram negativos. O uso deste medicamento foi interrompido principalmente devido à sua toxicidade, quando cefalosporinas de 2^a e 3^a gerações se tornaram disponíveis. Entretanto, a polimixina voltou a ser usada em nosso país, representando o último recurso para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* susceptíveis somente a este composto (LEVIN et al., 1999).

1.5 β -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa*

Os β -lactâmicos atuam interferindo na síntese da parede celular bacteriana. Esta classe de antimicrobianos possui um grupamento químico heterocíclico denominado anel β -lactâmico que é responsável pela atividade antimicrobiana. As enzimas β -lactamases atuam hidrolizando o anel β -lactâmico, resultando na perda da atividade do antimicrobiano

(HAKIMELAHI et al., 2002).

Existem alguns esquemas de classificações propostos para as enzimas β -lactamases. Na classificação de Ambler (1980) a seqüência genética define quatro classes designadas A, B, C e D. As β -lactamases da classe A, C e D possuem uma serina no sítio ativo e atuam sobre o antibiótico hidrolisando o anel β -lactâmico. As β -lactamases da classe B utilizam íons zinco para romper o anel β -lactâmico. Outro esquema de classificação destas enzimas foi proposto por Bush e colaboradores (1995). Este utiliza as propriedades bioquímicas das enzimas, a estrutura molecular e a seqüência de nucleotídeos dos genes para colocar as β -lactamases em grupos funcionais. Existe boa correlação entre a classificação de Bush e colaboradores (1995) e a classificação molecular proposta por Ambler (1980).

As classes A, B e D de β -lactamases foram descritas em *P. aeruginosa* mais recentemente. As β -lactamases da classe A são de espectro estendido (ESBL – do inglês “Extended spectrum β -lactamases”), isto é, atuam sobre os β -lactâmicos de amplo espectro, e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (BUSH et al., 1995). Desta classe foram identificadas nesta espécie algumas séries de enzimas, como TEM, SHV, PER, VEB e GES que não são relacionadas geneticamente, mas compartilham perfis hidrolíticos semelhantes (WELDHAGEN, POIREL & NORDMANN, 2003). Estas enzimas têm propriedades hidrolíticas semelhantes para penicilinas de baixo espectro e cefalosporinas de espectro estendido (cefepime e ceftazidime) e aztreonam, com exceção a GES-1 que possui baixo nível de atividade catalítica para a maioria dos substratos citados. A série GES tem afinidade por imipenem, porém a atividade catalítica destas enzimas é inferior em relação as metalo- β -lactamases (WELDHAGEN, POIREL & NORDMANN, 2003). Os genes que codificam estas enzimas podem estar localizados em plasmídios ou no cromossomo, sendo que as séries VEB e GES têm sido identificadas sob forma de cassetes como parte de integrons classe 1. As séries TEM e SHV têm sido descritas na França e Tailândia (MARCHANDIN et al., 2000; CHANAWONG et al., 2001), a série PER principalmente na França e Turquia (VAHABOGLU et al., 1997; DE CHAMPS et al., 2002), a série VEB na França, Tailândia e Kuwait (GIRLICH et al., 2001; POIREL et al., 2001) e a série GES na França e África do Sul (DUBOIS et al., 2002; POIREL et al., 2002).

P. aeruginosa também pode apresentar outra série de β -lactamase pertencente a classe molecular A de Ambler, a PSE (*Pseudomonas*-specific enzyme), que em alguns casos são denominadas CARB. Estas enzimas hidrolizam as aminopenicilinas e as carbenicilinas (em altas taxas), sendo inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Quatro enzimas

da série PSE têm sido descritas em *P. aeruginosa* PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 e CARB-4. PSE-1, PSE-4 e CARB-3 são estreitamente relacionados, diferindo uma da outra por um ou dois aminoácidos, enquanto CARB-4 compartilha apenas 86,3% dos aminoácidos (SANSCHAGRIN et al., 1998; BERT, BRANGER & LAMBERT-ZECHOVSKY, 2002). Os genes que codificam estas enzimas estão comumente localizados em transposons ou integrons.

A classe molecular B de β -lactamases compreende as metalo- β -lactamases (M β las). Estas enzimas representam o único grupo dentre as β -lactamases que possui o íon zinco no seu sítio ativo e assim são inibidas por agentes quelantes como o EDTA, mas não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam que são inibidores de β -lactamases que apresentam serina no sítio ativo. Elas são capazes de hidrolisar carbapenemas e também β -lactâmicos de largo espectro de ação, mas não monobactâmicos (BUSH et al., 1995). Elas são também denominadas de carbapemases (LIVERMORE, 2002). Estão incluídas nesta classe as séries IMP, SPM e VIM. Até o momento, apenas uma enzima da série SPM foi descrita, enquanto para as séries IMP e VIM, 16 e 10 variantes respectivamente (JACOBY & BUSH, 2004). Apenas as enzimas IMP-1, IMP-7, IMP-9, IMP-10, IMP-13, IMP-16, VIM-1 VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-7, VIM-8, VIM-9, VIM-10 e SPM-1 foram encontradas em *P. aeruginosa*. As M β las, das séries IMP e VIM são freqüentemente codificadas por cassetes gênicos inseridos em integrons localizados no cromossoma ou em plasmídios. Os Integrons são elementos genéticos que podem conter um ou mais cassetes de genes inseridos numa posição específica. Eles são definidos pela presença do gene integrase (*int1*), um sítio recombinante (*attI*), um ou dois promotores responsáveis pela expressão do gene inserido no cassete (COLLIS & HALL, 1995). A maioria destes integrons é de classe I (NORDMANN & POIREL, 2002). O gene *spm-1* é carregado por um plasmídio e não está associado ao elemento genético, integron e foi detectado até então apenas no Brasil (TOLEMAN et al., 2002). A primeira M β la em *P.aeruginosa*, IMP-1 foi detectada no Japão (WATANABE et al., 1991). As outras enzimas desta série foram detectadas em diversos países, a IMP-7 no Canadá e Malásia (GIBB et al., 2002; HO et al., 2002), a IMP-9 na China (EMBL/GenBank accession no. AY033653), a IMP-10 no Japão (IYOBE et al., 2002), IMP-13 na Itália (TOLEMAN et al., 2003) e IMP-16 (EMBL/GenBank accession no. AJ586617). A série VIM foi descrita primeiramente em 1999 em uma amostra de *P. aeruginosa*, isolada na Itália, em 1997 (LAURETTI et al., 1999). A variante VIM-2 foi detectada em outros países como: Grécia, França, Itália, Espanha e Coreia (NORDMAN & POIREL, 2002). A variante VIM-3 foi

detectada na Tailândia (YAN et al., 2001), VIM-4 na Polônia (PATZER et al., 2004), VIM-7 nos Estados Unidos (TOLEMAN et al., 2004), VIM-8 na Colômbia (EMBL/GenBank accession no AY524987), VIM-9 e VIM-10 (EMBL/GenBank accession no AY524988 e AY524989) no Reino Unido.

Outro grupo de β -lactamases são enzimas da série OXA que pertencem a classe molecular D. Estas enzimas que são caracterizadas pela alta atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina apresentam grande variabilidade genotípica (BRADFORD, 2001). Sanschagrín, Couture e Levesque (1995) classificaram a série OXA em cinco grupos de acordo com a similaridade genética. Estes são: o grupo I compreendendo as enzimas OXA-5, OXA-7, OXA-10 e seus derivados (OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17 e OXA-19) e OXA-13 e seu derivado (OXA-28); o grupo II incluindo OXA-2, OXA-3, OXA-15 e OXA-20; o grupo III incluindo OXA-1, OXA-4, OXA-30 e OXA-31; os grupos IV e V foram definidos pelas OXA-9 e LCR-1 respectivamente. A enzima OXA-18 não foi alocada em nenhum destes grupos devido à baixa identidade de aminoácidos com as oxacilinas. Novos membros da série OXA foram recentemente descritos (JACOBY & BUSH, 2004). As enzimas da série OXA podem ser de espectro estendido ou ter espectro de atividade característico. As enzimas da série OXA de espectro estendido (ESBL) são encontradas principalmente em *P. aeruginosa*, entre elas estão a OXA-10 e seus derivados (OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17 e OXA-19), OXA-2 e seu derivado OXA-15 e OXA-18. A maioria destas enzimas confere resistência a ceftazidima e aztreonam (NORDMAN & GUIBERT, 1998). Outras enzimas da série OXA-ESBL com características particulares foram descritas nesta espécie, como a OXA-24 (BOU, OLIVER & MARTINEZ-BELTRAN, 2000) que confere também resistência a carbapenemas e OXA-33 (AUBERT et al., 2001) que confere resistência ao cefepime e sensibilidade a ceftazidima. As enzimas da série OXA estão frequentemente localizadas em integrons classe I, sendo detectada a presença de múltiplos cassetes de genes que codificam oxacilinas num mesmo isolado (WELDHAGEN et al., 2003).

Isolados de *P. aeruginosa* produzem, de forma constitutiva, uma β -lactamase da classe C, codificada pelo gene cromossômico *ampC*, sendo a expressão dessa enzima modulada através de mutações que podem causar a expressão excessiva da β -lactamase AmpC cromossômica constitutiva reduzindo a susceptibilidade ou gerando resistência a penicilinas e cefalosporinas de 3º geração (LIVERMORE, 1995). A ampicilina, benzilpenicilina e a maioria das cefalosporinas de 1º geração são fortes indutores da produção desta enzima, sendo

rapidamente hidrolisadas por sua ação (LIVERMORE, 1989). As ureidopenicilinas, cefalosporinas de 3º geração e monobactâmicos são fracos indutores e, apesar de serem susceptíveis, permanecem ativos enquanto a enzima não é induzida. Entretanto, a desrepressão desta enzima ocasiona níveis elevados de resistência as ureidopenicilinas e à maioria das cefalosporinas (LIVERMORE & YANG, 1987). Carbenicilinas são estáveis às β -lactamases AmpC e são fracos indutores, retendo a mesma atividade para amostras induzidas. Imipenem e meropenem usualmente retém a atividade contra os isolados de *P. aeruginosa* que produzem níveis elevados desta β -lactamase (LIVERMORE, 1995).

A emergência das *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases têm importantes implicações terapêuticas e maior atenção tem sido dada a estes isolados. Existem opções terapêuticas extremamente limitadas nos casos de isolados de *P. aeruginosa* que expressam algumas ESBL tais como as M- β las. Além disto, a terapia atual para isolados da família *Enterobacteriaceae* que expressam ESBL é limitada a aqueles agentes de amplo espectro. Entretanto, a pressão seletiva pela prescrição de β -lactâmicos como ceftazidime ou imipenem, para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, pode favorecer o aparecimento de ESBL que são secundariamente transferidas para espécies enterobacterianas, tornando esta espécie um reservatório de novas enzimas (NORDMANN & GUIBERT, 1998). Considerando-se que algumas destas enzimas podem estar localizadas em integrons e/ou elementos genéticos móveis como, plasmídeos e transposons a detecção destas é importante para prevenir sua difusão, fato descrito na literatura já ter ocorrido em alguns países.

1.6 Detecção de β -lactamases

Vários testes de detecção fenotípica de β -lactamases baseados na metodologia do teste de difusão de disco Kirby-Bauer foram descritos para *Enterobacteriaceae*, uma vez que foi observado um aumento da prevalência destas enzimas em gêneros desta família bacteriana, sendo o teste de sinergia do disco duplo ou aproximação de discos, utilizando clavulanato, o mais amplamente utilizado para a detecção destas enzimas (LIVERMORE & BROWN, 2001). Entretanto, estes testes não apresentam a mesma sensibilidade e especificidade quando utilizados para a detecção destas enzimas em *P. aeruginosa*. A detecção destas enzimas através do teste de aproximação de discos, utilizando clavulanato e cefalosporinas de espectro estendido, para *P. aeruginosa* apresenta algumas dificuldades provenientes dos seguintes fatores: resultados falso-negativos devido à ocorrência natural de β -lactamases como AmpC

codificadas pelo cromossomo que podem ser produzidas em altos níveis de concentração; presença de Mβlas que hidrolizam além dos carbapenemas, celalosporinases de espectro estendido; resistência relativa à inibição pelo clavulanato e mecanismos de resistência combinados, como impermeabilidade e efluxo (DE CHAMPS et al., 2002; WELDHAGEN et al., 2003). Thomson (2001) sugere a utilização de sulbactam e tazobactam como inibidores de β-lactamases preferenciais para a detecção de ESBL em *P. aeruginosa* uma vez que o clavulanato age como um indutor da produção de AmpC em altos níveis, aumentando assim a resistência às cefalosporinas, impedindo o reconhecimento da ESBL, que é sensível ao clavulanato. Uma alternativa é incluir o cefepime como um agente de detecção de ESBL por tratar-se de uma droga com menor susceptibilidade à hidrólise pelas β-lactamases de classe C e que pode ser hidrolisada eficientemente por várias ESBLs.

Segundo Weldhagen, Poirel e Nordmann (2003), a presença de ESBL em *P. aeruginosa* pode ser suspeitada frente ao seguinte fenótipo de resistência aos antimicrobianos, resistência a ceftazidima e ticarcilina e sensibilidade a ticarcilina/ácido clavulâmico. Neste caso este autor sugere que seja utilizada a técnica de PCR testando uma série de iniciadores para detecção das séries em questão.

Diversos trabalhos enfatizam o aumento da detecção de Mβlas em todo o mundo entre os bastonetes aeróbios principalmente em *P. aeruginosa* (LIVERMORE, 2002; NORDMANN & POIREL, 2002). Alguns testes fenotípicos para detecção destas enzimas foram descritos. Arakawa e colaboradores (2000) elaboraram um teste de aproximação de discos para detecção da Mβla produzida por bactérias Gram negativas. Estes autores utilizaram discos de ceftazidima e um disco de filtro contendo um inibidor de Mβla tais como: compostos de thiol incluindo ácido 2-mercaptopropiônico (2MP), ácido mercaptoacético, sais de metal pesado (CuCl₂, FeCl₂ e HgCl₂) ou EDTA. Os melhores resultados foram observados com o 2MP porque esse agente químico bloqueia a atividade do IMP-1 mais fortemente, mesmo a baixa concentração.

Lee e colaboradores (2001) realizaram um estudo para avaliar a utilidade dos testes de Hodge modificado e sinergismo do disco duplo utilizando EDTA para detecção de microrganismos produtores de Mβla à partir de um grande número de isolados clínicos de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenem. Neste teste os autores utilizam um disco de imipenem e outro disco de papel de filtro onde foi adicionado o EDTA em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a leitura do teste de sinergismo de

disco-duplo foi mais eficiente quando se utilizou o disco de filtro impregnado com 1,5 mg de EDTA.

O inconveniente nos testes citados anteriormente (ARAKAWA et al., 2000; LEE et al., 2001) é que a distância entre os dois discos deve ser ajustado a fim de obter ótimos resultados, assim como acontece no teste de disco duplo para detecção de isolados produtores de ESBLs, pois o teste é considerado positivo quando ocorre distorção no halo de inibição (BRADFORD, 2001). Todos os testes que utilizam uma das variações na técnica de disco-difusão requerem muita interpretação e portanto, devem ser realizados por indivíduos com experiência na leitura desses resultados (THOMSON et al., 1992). Yong e colaboradores (2002) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a possibilidade da adição do EDTA diretamente no disco de imipenem para confirmar a produção de M β la em isolados clínicos de *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.*. Os isolados produtores de M β la apresentaram um aumento na zona de inibição maior que 7 mm quando empregado 750 μ g de EDTA. O teste mostrou ser de simples execução e interpretação, além de apresentar alta sensibilidade na detecção de isolados produtores de M β la e alta especificidade para *Pseudomonas*.

Oh e colaboradores (2003) identificaram a prevalência de M β las na Coreia em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* com susceptibilidade reduzida ao imipenem e ceftazidima. A análise pela PCR foi conduzida com os primers específicos bla_{IMP-1}, bla_{VIM-1} e bla_{VIM-2}. Foram utilizados os testes de sinergismo de disco- duplo utilizando diferentes substratos e inibidores, que foram, ceftazidima/ ác. 2-mercaptopropiônico e imipenem/EDTA e o teste de disco difusão com inibidor potenciado (IPD), isto é os mesmos inibidores foram adicionados aos discos de CAZ e IPM e a detecção de M β las foi feita medindo-se a zona de inibição. Como nesse estudo a maioria das M β las foram produtoras de VIM-2, a comparação dos quatro métodos de tipagem foi apropriada para estes produtores, mostrando ainda que o teste IPD com IPM-EDTA foi o mais sensível e específico, o que coincide com os relatos de Yong e colaboradores (2002). Os testes para detecção fenotípica de M β la em *P. aeruginosa* têm sido úteis para selecionar estas enzimas. A determinação da série de M β la deve ser determinada pela amplificação dos genes que codificam as séries das enzimas em questão. A identificação definitiva das β -lactamases só é possível através do sequenciamento do gene ou proteína, uma vez que, é necessária a análise da seqüência nucleotídica dos produtos da PCR para diferenciar as enzimas da mesma série, uma vez que algumas enzimas diferenciam-se por apenas um aminoácido.

1.7 Tipagem Genotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

Métodos de genotipagem são atualmente reconhecidos como os métodos mais precisos para a tipagem de microrganismos para fins epidemiológicos (TENOVER et al., 1995). Esses métodos, por analisarem diretamente o material genético dos microrganismos, apresentam melhor poder discriminatório do que os métodos convencionais (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997). Eles distinguem isolados relacionados (clones), daquelas não relacionadas. Clones são conhecidos como isolados geneticamente relacionados, indistinguíveis um do outro por métodos de caracterização genética ou similares, que presumem-se serem derivados de um parente comum (TENOVER et al., 1995). Sendo assim, é possível avaliar a transmissão e disseminação nosocomial e investigar suspeita de surtos e epidemias (BERTRAND et al., 2001). Esses métodos incluem determinação do perfil de plasmídios (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997), ribotipagem (BENNEKOV et al., 1996), técnicas baseadas na amplificação aleatória de DNA (“Randomly Amplified Polymorphic DNA” – RAPD) (RENDERS et al., 1996), determinação do polimorfismo de fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorfism” – RFLP) (NOCIARI et al., 1996), métodos baseados na amplificação de segmentos de DNA e a eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE) (SAVELKOUL et al., 1999).

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) foi uma técnica molecular desenvolvida por Schwartz e colaboradores (1983) a partir de uma variação da eletroforese convencional e permite a análise direta do DNA genômico. Essa técnica possibilita a separação efetiva de grandes fragmentos de DNA gerados após digestão do cromossomo bacteriano com enzimas de restrição de sítios raros. Os fragmentos obtidos originam um número relativamente pequeno de bandas no gel que facilitam a interpretação do mesmo e permite a comparação dos genomas bacterianos em questão (TENOVER et al., 1997).

Dentre os métodos de tipagem molecular que foram usados para estudar a epidemiologia da *P. aeruginosa*, a eletroforese de campo pulsado (PFGE) é o método mais satisfatório. PFGE mostrou ser útil nas investigações de surtos nosocomiais, na identificação de cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes e/ou produtoras de β -lactamases (SPEIJER et al., 1999, LUZZARO et al. 2001). Clones de *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases tem sido descritos causando surtos em diversos países (LUZZARO et al, 2001; YAN et al., 2001).

No Brasil, alguns autores investigaram a clonalidade de isolados de *P. aeruginosa*

originárias de infecções hospitalares através da técnica de PFGE (SADER et al., 1999; SADER, 2000; PELLEGRINO et al., 2002; DE FREITAS & BARTH, 2002; LOUREIRO et al., 2002). Na maioria destes estudos foi observada a presença de vários clones e a existência de clones predominantes associados a isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes. Até o momento, poucos estudos mostraram a presença de β -lactamases em nosso meio. Entretanto a disseminação de *P. aeruginosa* produtora de M β la SPM-1 (GALES et al., 2003) em vários estados brasileiros mostra a importância da realização de outros estudos visando a determinação de β -lactamases nesta espécie bacteriana no Brasil.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi investigar a ocorrência e clonalidade dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de β -lactamases provenientes de infecções em pacientes internados em hospitais de São Luís do Maranhão.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Determinar a presença de β -lactamases em isolados de *P. aeruginosa* através de técnicas de detecção fenotípica;
- 2- Verificar a série da β -lactamase apresentada pelos isolados selecionados pelos métodos fenotípicos, pela técnica da PCR;
- 3- Determinar a clonalidade dos isolados de *P. aeruginosa* produtores de β -lactamases utilizando técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE).

3 METODOLOGIA

3.1 Isolados Bacterianos

Neste estudo foram analisados 214 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* coletados de pacientes internados no período de junho de 2001 a junho de 2002 em diferentes hospitais de São Luís do Maranhão. A distribuição destes isolados entre os hospitais em questão foi a seguinte: 23 isolados foram provenientes do Centro Médico, 43 do Hospital Aliança do Maranhão, 12 do Hospital São Domingos, 81 do Hospital Universitário Presidente Dutra, 13 do Socorrão II, 34 do Hospital UDI e 8 de outros hospitais. Estes isolados foram enviados pela Dra. Rosângela Cipriano Monteiro, professora da Universidade Federal do Maranhão responsável pelo controle de infecções hospitalares nestes hospitais. Todos estes isolados foram estocados à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo infusão cérebro e coração (Difco) contendo 20% (v/v) de glicerol.

3.2 Identificação da Espécie *Pseudomonas aeruginosa*

Os isolados foram identificados inicialmente nos laboratórios dos hospitais de origem com o auxílio do sistema automatizado VITEK 32 (Bio Mérieux Inc., Hazelwood, Mo) ou através de testes bacteriológicos convencionais, conforme decisão do microbiologista responsável ou disponibilidade do uso do equipamento. No Setor de Identificação Bacteriana do Departamento de Microbiologia do INCQS, os seguintes testes foram realizados para

confirmação de identificação, após verificação da pureza das culturas: observação das características morfo-tintoriais após coloração pelo método de Gram, teste da produção da citocromo oxidase, teste de oxidação-fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson, determinação da atividade da arginina dihidrolase, crescimento a 42°C e produção de pigmento. Estes testes foram realizados de acordo com as recomendações de Kiska e Gilligan (1999).

3.3 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

A susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliada utilizando-se o teste de difusão em ágar conforme as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000). Os isolados foram cultivados em ágar com infusão de cérebro e coração (Difco) por 18 a 24 horas a 37° C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina e a concentração foi ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (~ 10⁸ UFC/mL). Em seguida a suspensão foi inoculada com o auxílio de “swab” estéril sobre uma placa de ágar Mueller-Hinton (Difco) no qual após secar por 15 minutos, foram aplicados os discos impregnados com antimicrobiano. As placas foram incubadas por 18 a 24 h a 37° C. Foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos: amicacina (30µg), aztreonam (30µg), cefepime (30µg), ceftriaxone (30µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), norfloxacina (10µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), ticarcilina/ácido clavulânico (75/10µg), tobramicina (10µg), polimixina (300U). Para o controle do teste foi utilizada a cepa padrão recomendada, *P. aeruginosa* ATCC 27853. A susceptibilidade foi verificada através da leitura do diâmetro dos halos de inibição interpretados de acordo com os valores estabelecidos pelo NCCLS (2001).

3.4 Detecção de β-lactamases de Espectro Estendido

3.4.1 Técnica de aproximação de discos (AD3 e AD5)

A identificação de isolados de *P. aeruginosa* produtores de β-lactamases foi realizada através da técnica de aproximação de discos seguindo as recomendações de Jarlier e

colaboradores (1988) e Thomson (2001). Os isolados foram cultivados em ágar com infusão de cérebro e coração (Difco) por 18 a 24 horas a 37° C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina e a concentração das células foi ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (~ 10⁸ UFC/mL). Em seguida a suspensão foi inoculada com o auxílio de “swab” estéril sobre placas de ágar Mueller-Hinton (Difco) no qual após secar por 15 minutos, foram aplicados os discos impregnados com antimicrobiano. Para a realização da Técnica de aproximação de discos utilizando o ácido clavulânico como inibidor de β-lactamase (AD5), os discos foram dispostos nas placas do seguinte modo: um disco de amoxicilina/ácido clavulânico no centro e lateralmente um disco de ceftazidima, aztreonam, cefotaxima e cefuroxima a uma distância de 20 mm centro a centro em relação ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico (Esquema 1-A). A Técnica de aproximação de discos utilizando o tazobactam como inibidor de β-lactamase (AD3) também foi realizado do mesmo modo que o anteriormente descrito utilizando um disco de piperacilina /tazobactam disposto no centro e lateralmente um disco de ceftazidima e cefepime a uma distância de 20 mm centro a centro em relação ao disco de piperacilina /tazobactam (Esquema 1-B). As placas foram incubadas por 18 horas a 35° C. A distorção do diâmetro da zona de inibição ao redor do disco de β-lactâmico indicou a presença de β-lactamase pelo isolado bacteriano.

3.5 Detecção de Metallo-β-lactamases

3.5.1 Teste de Aproximação de Discos Utilizando Ácido 2-mercaptopropiônico como Inibidor de Metallo β-lactamase (Mβla/2MP)

Este teste foi realizado segundo Arakawa e colaboradores (2000). Os isolados foram cultivados em ágar infuso de cérebro e coração (Difco) por 18 a 24 horas a 37° C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina e a concentração das células foi ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (~ 10⁸ UFC/mL). Em seguida a suspensão foi inoculada com o auxílio de “swab” estéril sobre placas de ágar Mueller-Hinton (Difco). Após 15 minutos, dois discos de antibióticos, contendo cada um, 30 µg de ceftazidima, foram aplicados sobre a superfície do ágar a uma distância de cerca de 4,5 cm. Um disco de papel de filtro foi aplicado a uma distância de cerca de 2 cm de um dos discos de ceftazidima, onde foi adicionado de 3µl de uma solução contendo 1,2g/mL de ácido 2-mercaptopropiônico (MP)

(MERK) (Esquema 2-A). A placa foi incubada a 37° C por 18 a 24 horas. A observação da expansão da zona de inibição do crescimento bacteriano no disco de ceftazidima localizado próximo ao disco com MP indicou a produção de Mβla pelo isolado bacteriano.

3.5.2 Teste do Disco Imipenem-EDTA (Mβla/EDTA)

Este teste foi realizado de acordo com as recomendações de Yong e colaboradores (2002) e se baseia na comparação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano apresentadas pelos discos de imipenem com ou sem EDTA. Os isolados foram cultivados em ágar infuso de cérebro e coração (Difco) por 18 a 24 horas a 37°C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina e a concentração das células foi ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (~ 10⁸ UFC/mL). A suspensão foi distribuída em placas contendo ágar Mueller-Hinton com o auxílio de “swab” estéril e após 15 minutos, dois discos contendo imipenem (10 µg) foram aplicados sobre a superfície do ágar a uma distância de cerca de 4 cm. Uma alíquota de 4µl de EDTA 0,5 M foi adicionada a um dos discos de imipenem (Esquema 2-B). A placa foi incubada a 37°C por 18 a 24 horas. O aumento do diâmetro do halo de inibição do disco de imipenem contendo EDTA de no mínimo 7 mm em relação ao halo de inibição do disco de imipenem sem EDTA indicou a produção de Mβla pelo isolado bacteriano.

3.6 Extração de DNA Total pelo Método de Choque Térmico

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 18-24 horas. Um mL de cultura de cada isolado foi transferido para microtubo e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 500 µl de água milli-Q e submetido a banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado e centrifugado (14000 rpm por 15 segundos). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C. A extração por este método foi utilizada na PCR.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação de regiões específicas do genoma dos isolados de *P. aeruginosa*, a reação da PCR foi realizada em um volume final de 50 µL. As reações individuais foram compostas de água esterilizada, tampão de reação 1X (eppendorf), 3 mM de MgCl₂ (eppendorf), 10 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]/eppendorf), 250 ng de cada iniciador (Tabela 1), 1,5 U da enzima Taq polimerase (eppendorf) e 3 µL do DNA obtido pela extração por choque térmico, como descrito anteriormente. Os iniciadores estabelecidos para este trabalho foram desenhados com a ajuda do programa PRIME pertencente ao pacote GCG (Genetics Computer Group, da Universidade de Wiconsin, USA). Os demais iniciadores foram obtidos a partir de outros trabalhos (Tabela 1). A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A amplificação pela PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X.

3.8 Eletroforese em Gel de Agarose

Os géis de agarose foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X de modo a obter uma concentração de 1,0 %. Foi adicionado tampão de corrida nas amostras de DNA (1/5 do volume da solução de DNA). Foram aplicados 7µL do produto da PCR e 1µL de marcador de peso molecular nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 60 Volts. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento VDS (Pharmacia-Biotech).

3.9 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico Através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose. Em resumo, uma alíquota de 2 mL do crescimento bacteriano em fase exponencial foi centrifugada e as células obtidas foram suspensas em 500 µL de salina estéril. Foi adicionada a suspensão de células, 500 µL de agarose (low melting, FMC) a 2 % em tampão PIV (NaCl 1M; TRIS-HCl 10mM pH 7,6) a 50°C. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 4ml de solução de lise (NaCl 1M;

TRIS-HCl 6mM pH 7,6; EDTA 100mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5 %; desoxicolato 0,2 %; sarcosina 0,5 % e lisozima 1 mg/mL) e incubados a 37°C. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5M pH 8,0; sarcosina 1 %) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma) e os blocos incubados por 24 horas a 50°C. Os blocos foram lavados 4 vezes com tampão TE (TRIS-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0.1mM pH 8,0) a 37°C e então incubados com 10U da enzima de restrição *SpeI* (Amersham) durante 24 h a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose NA (Amersham) a 1,3 % preparado em tampão TBE (TRIS 44,5mM; ácido bórico 44,5mM; EDTA 1mM pH final 8,3) através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 5 a 35 segundos, por 24 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C, com ângulo de 120°. Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL), observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

3.10 Interpretação dos Perfis de Bandas Obtidos pelo PFGE

Os perfis de banda foram analisados através da comparação visual entre amostras seguindo o critério de Tenover e colaboradores (1995) (Tabela 2).

Esquema 1

Esquema 2

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>Int1</i>	INT1F - AAA ACC GCC ACT GCG CCG TTA INT1R – GAA GAC GGC TGC ACT GAA CG	1068	LGMM ^a
<i>bla_{pse}</i>	PSEF – ACC GTA TTG AGC CTG ATT TA PSER – ATT GAA GCC TGT GTT TGA GC	321	Bert et al., 2002
<i>bla_{carb-4}</i>	CARB4F – TAA TAG AAA AGC AAG TAG GA CARB4R – AAC TAT GAT TGG GGA TTG AG	435	Bert et al., 2002
<i>bla_{oxa}</i>	OXA 1F – TCA ACA AAT CGC CAG AGA AG OXA1R – TCC CAC ACC AGA AAA ACC AG	276	Bert et al., 2002
<i>bla_{oxa}</i>	OXA2F - AAG AAA CGC TAC TCG CCT GC OXA2R – CCA CTC AAC CCA TCC TAC CC	478	Bert et al., 2002
<i>bla_{oxa}</i>	OXA3F – TTT TCT GTT GTT TGG GTT TT OXA3R – TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG	427	Bert et al., 2002
<i>bla_{tem}</i>	TEMF – ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG TEMR – CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	654	Rasheed et al., 1997
<i>bla_{shv}</i>	SHVF – TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC SHVR – GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG	867	Neste estudo
<i>bla_{vim}</i>	VIMB – ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC VIMF – TGG GCC ATT CAG CCA GAT C	420	Neste estudo
<i>bla_{imp}</i>	IMP 1 – CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG IMP2 – AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	451	Neste estudo
<i>bla_{spm}</i>	SPM r – GTC CAG GTA TAA CAA TTT TCG CTA SPMf – ACG TTT TCG TCG TCA CAG	609	LGMM

^a Laboratório de Genética de Microrganismos- IOC/FIOCRUZ

Tabela 2. Critérios para a interpretação dos perfis de PFGE ^a

Categoria	Nº de diferenças genéticas^b	Nº de fragmentos diferentes^b	Interpretação epidemiológica
Indistinguível	0	0	A amostra faz parte do surto
Intimamente relacionada	1	2-3	A amostra provavelmente faz parte do surto
Possivelmente relacionada	2	4-6	A amostra possivelmente faz parte do surto
Diferente	≥ 3	≥ 7	A amostra não faz parte do surto

^a conforme Tenover et al., 1995.

^b quando comparadas com a amostra responsável pelo surto.

4 RESULTADOS

4.1 Isolados Bacterianos

Todos os isolados de *P. aeruginosa* se apresentaram como bastonetes Gram negativos, oxidase positivos, móveis, metabolismo oxidativo em meio de Hugh-Leifson, descarboxiladores da arginina e com crescimento a 42°C. Foi observada a produção de pigmento em meio de ágar Mueller-Hinton na maioria dos isolados.

4.2 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Neste estudo, diferentes perfis de resistência foram observados, sendo que aproximadamente 42 % dos isolados apresentaram multirresistência. O critério utilizado para considerar o isolado multirresistente foi apresentar resistência à pelo menos um antimicrobiano de no mínimo três diferentes grupos definidos a seguir: penicilinas (ticarcilina/clavulanato ou piperacilina/tazobactam), aminoglicosídeo (amicacina ou gentamicina), monobactam (aztreonam), fluoroquinolona (ciprofloxacina), cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftazidima ou cefepime) e carbapemens (imipenem ou meropenem). Obtivemos as seguintes taxas de resistência através do método de difusão a partir do disco para os β -lactâmicos utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*: 37,9% para o aztreonam, 26,2% para o cefepime, 22,9% para a ceftazidima, 87,4% para a cefotaxima e 20,7% para o imipinem. Observamos 11 isolados apresentando resistência a todos os antimicrobianos com exceção a polimixina e quatro apresentaram resistência intermediária ao aztreonam e resistência aos demais antimicrobianos com exceção a polimixina.

4.3 Detecção Fenotípica de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

Utilizando a técnica de aproximação de discos com amoxicilina/ácido clavulânico (AD5) com os 214 isolados, foram observados resultados positivos para 13 (6,1%) isolados. Para a realização do teste de aproximação de discos com piperacilina/tazobactam (AD3), foram selecionados todos os isolados resistentes a ceftazidima ou cefepime. Foram observados resultados positivos para 19 (27,1%) dentre os 70 isolados selecionados

(Figura 1). Apenas 6 isolados foram positivos para ambos os testes. Na tabela 3 estão relacionados os dados dos isolados com resultados positivos para os testes AD3 e/ou AD5.

4.4 Detecção Fenotípica de Metallo- β -lactamases

Para a realização do teste de aproximação de disco utilizando ác. 2-mercaptopropiônico como inibidor de metallo β -lactamase (M β la/2MP), foram selecionados os isolados que apresentaram resistência a ceftazidima. Nove isolados (18,4 %) dentre os 49 selecionados apresentaram resultado positivo para este teste. Para a realização do teste do disco imipinem-EDTA (M β la/EDTA) foram testados todos os isolados que apresentaram resistência ao imipinem. Foram observados resultados positivos para 9 (20,4 %) dentre os 44 isolados selecionados (Figura 2). Dentre os 13 isolados com evidência de produção de M β la, apenas 5 isolados apresentaram-se positivos em ambos os testes. Os dados relacionados aos isolados positivos para estes testes estão apresentados na tabela 4.

4.5 Presença de Genes de Resistência aos β -lactâmicos

A detecção de genes que carregam β -lactamases nos isolados de *P. aeruginosa* foi realizada através da técnica da PCR. Foram utilizados iniciadores específicos para as seguintes séries de β -lactamases: CARB, IMP, OXA, PSE, SHV, SPM, TEM e VIM (Tabela 1). Para a detecção das séries de β -lactamases de espectro estendido CARB, OXA, PSE, TEM e SHV, foram selecionados os vinte e seis isolados que apresentaram-se positivos para os testes de detecção fenotípica para β -lactamases de espectro estendido AD3 e AD5 e também os isolados que apresentaram perfil de resistência característico para as séries de β -lactamases citadas e que não foram positivos nos testes de detecção fenotípicos. Para a detecção das séries de metallo- β -lactamases IMP, VIM e SPM, foram selecionados os isolados resistentes a ceftazidima e imipinem, ou seja, vinte isolados. Entre estes vinte isolados estavam incluídos os 13 isolados que apresentaram-se positivos para um dos testes fenotípicos de detecção de metallo- β -lactamases. Os resultados destas ampliações, assim como os demais dados referentes aos isolados estão demonstrados nas tabelas 4 e 5. Em cada caso, o tamanho do fragmento amplificado esteve de acordo com o tamanho do produto de PCR (Tabela 1, Figura 2). Apenas as séries de metallo- β -lactamases IMP e VIM não foram detectadas nos isolados estudados.

4.6 Presença de Integrase Classe I nos Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* Produtoras de β -lactamases

Como alguns genes que codificam β -lactamases podem estar localizados em integrons, determinamos a presença do gene *Int1* através da técnica da PCR nos isolados produtores de β -lactamases. Verificamos que a maioria dos isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido apresentou integrase classe I (Tabela 5).

4.7 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico Através de Eletroforese em Gel de Agarose de Campo Pulsado (PFGE)

A diversidade genômica das amostras de *P. aeruginosa* foi avaliada através da técnica de PFGE. Foram selecionados para esta análise todos os isolados para os quais foi detectado algum gene de resistência e todos os isolados que apresentaram o teste fenotípico de detecção de metalo- β -lactamases. Os genótipos foram designados arbitrariamente por meio de um número (Tabela 4 e 5).

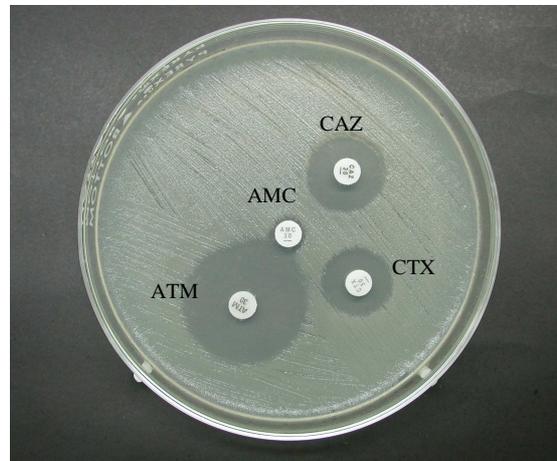
Um total de 26 perfis de fragmentação do DNA cromossômico foi observado entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de β -lactamases e 24 clones. Foram encontrados três genótipos predominantes, mas não relacionados geneticamente, entre os 48 isolados analisados. O genótipo 1 foi encontrado em 7 isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido (Tabela 5). O genótipo 2 foi apresentado por 5 isolados sendo que dois foram produtores de β -lactamases de espectro estendido, 2 apresentaram resultado positivo para o teste de detecção fenotípica para metalo- β -lactamase e 1 foi produtor de β -lactamases além de apresentar resultado positivo para o teste de detecção fenotípica para metalo- β -lactamase. O genótipo 3 foi detectado em 6 isolados produtores da metalo- β -lactamase SPM (Figura 3). Dois isolados que apresentaram este perfil também foram produtores de β -lactamase de espectro estendido, SHV. Os genótipos 4, 9, 12, 13, 14 e 19 apresentaram 2 isolados cada um. O genótipo 5 foi geneticamente relacionado ao genótipo 4 com diferença de apenas 4 fragmentos e o genótipo 5 e 7 diferem de apenas 2 fragmentos. Os demais genótipos foram representados, cada um, por uma única amostra, com perfis não relacionados entre si (Tabelas 4 e 5). Os isolados produtores de metalo- β -lactamases da série SPM apresentaram clonalidade, genótipo 3. A maioria dos isolados produtores de β -lactamases da série OXA do

grupo 2 apresentaram genótipo 1. Foi observada diversidade entre os isolados nos quais foram detectados genes de resistência para as diferentes séries de β -lactamases. Os isolados que apresentaram a série TEM apresentaram diferentes genótipos, sendo que dois isolados apresentaram o mesmo genótipo e foram provenientes de diferentes hospitais (Figura 4). Observamos genótipos com diferentes genes de resistência aos β -lactâmicos. O genótipo 1 foi encontrado em 7 isolados provenientes de dois Hospitais estudados. O genótipo 2 foi constituído por 2 isolados produtores de M β las, 2 que apresentaram a série OXA e 1 isolado produtor de M β las apresentando as séries CARB-4 e SHV, todos detectados no Centro Médico. Já os genótipos 9, 13 e 14 foram constituídos de dois isolados de diferentes hospitais. Os genótipos 4, 5 e 7 são relacionados geneticamente, mas possuem diferente composição de genes de resistência a β -lactamases e foram oriundos do Hospital Universitário Presidente Dutra.

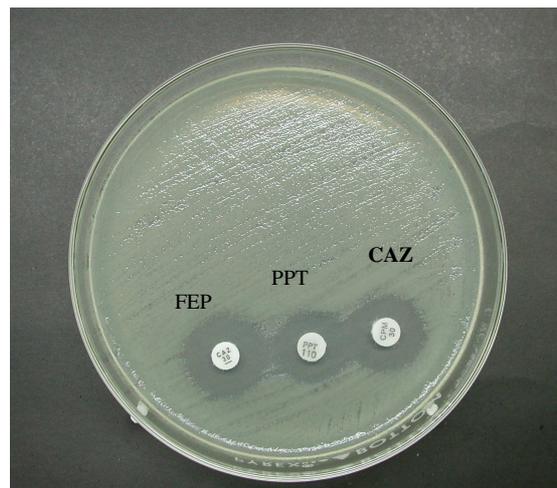
Considerando os resultados positivos para estes testes fenotípicos, foram obtidos de 13 isolados produtores de M β la que apresentaram 6 genótipos diferentes. Estes isolados foram coletados de pacientes no período de novembro de 2001 a junho de 2002, isto é nos últimos sete meses considerados deste estudo. O genótipo 2 foi encontrado em 3 isolados do Centro Médico, o genótipo 3 em seis isolados, 5 de Outros Hospitais e 1 do Centro Médico. Os outros genótipos foram encontrados em apenas um isolado.

Figura 1. Testes fenotípicos para detecção de β -lactamases de espectro estendido. A e B - Testes AD3 e AD5 negativos. C – Teste AD5 positivo indicando a produção de ESBLs.

A



B



C

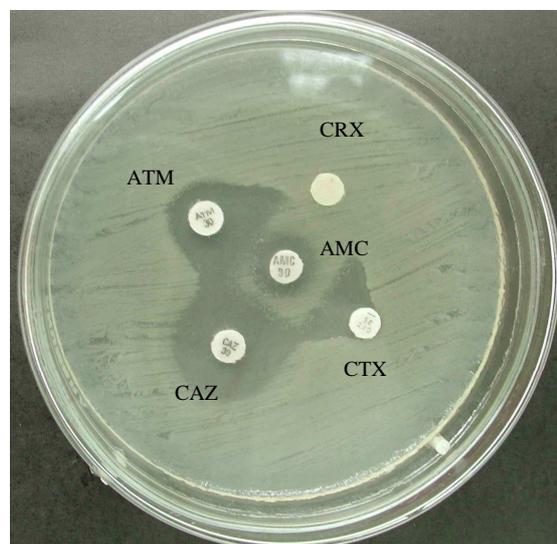


Figura 2. Testes fenotípicos para detecção de metalo- β -lactamases. A - Testes M β la/2MP e M β la/EDTA negativos. B – Teste M β la/2MP positivo indicando a produção de M β la. C - Teste M β la/EDTA positivo indicando a produção de M β la.

A



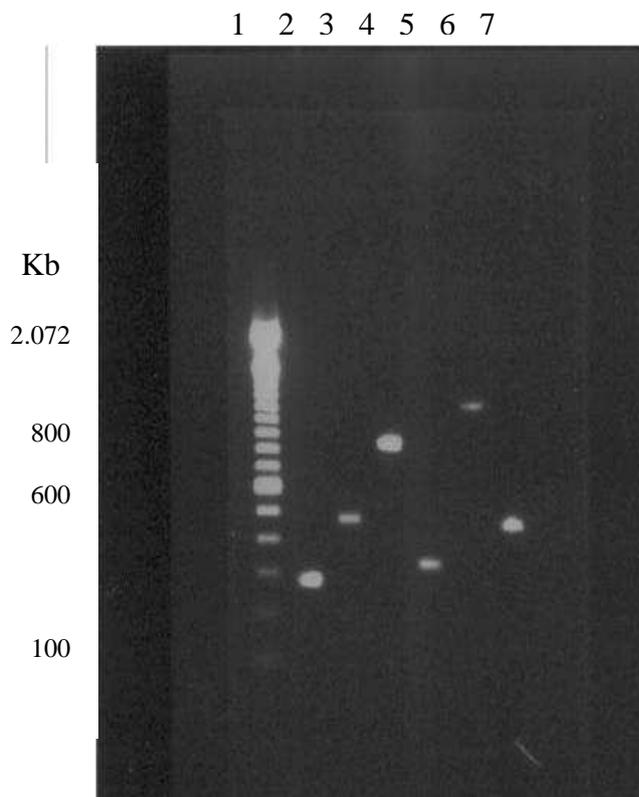
B



C

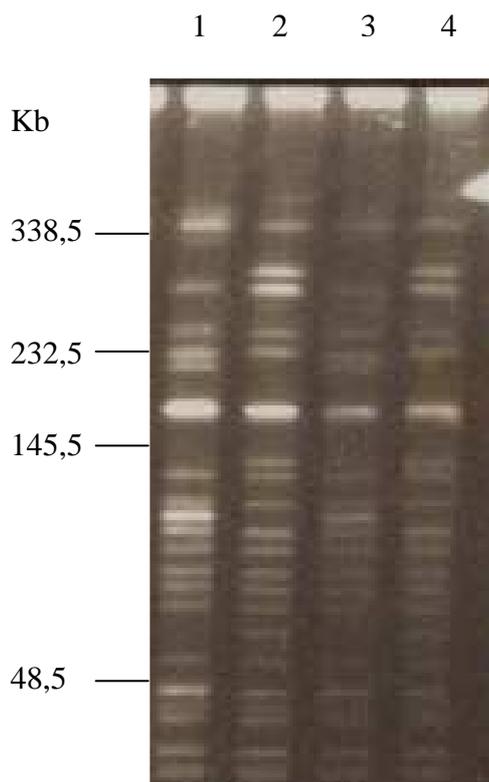


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR de diferentes genes de β -lactamases a partir de isolados de *P. aeruginosa*.



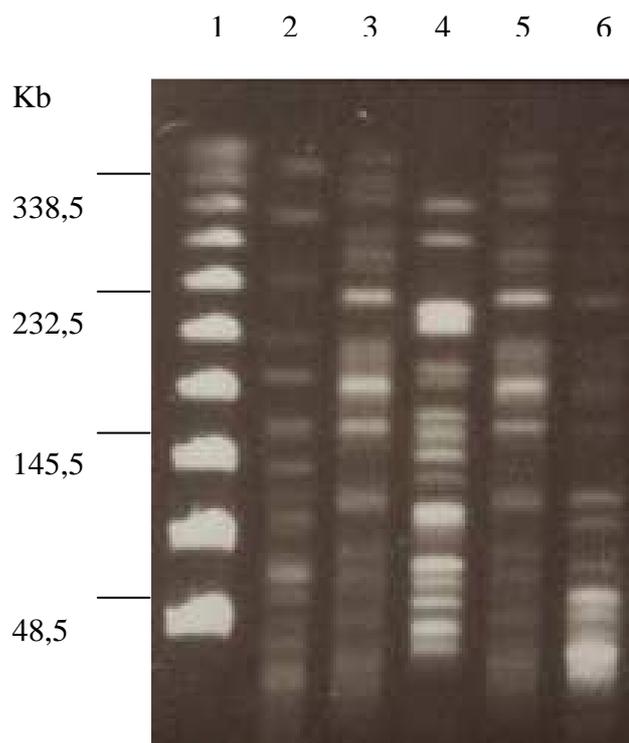
Linha 1: Padrão de peso molecular; Linha 2: isolado nº 255 representativo da série OXA-1; Linha 3: isolado nº 197 representativo da série OXA-2; Linha 4: isolado nº 114 representativo da série TEM; Linha 5: isolado nº 158 representativo da série PSE; Linha 6: isolado nº 257 representativo da série SHV; Linha 7: isolado nº 247 representativo da série CARB-4.

Figura 4. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com *SpeI* e separados por PFGE de representantes de isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram os genótipos predominantes de metalo- β -lactamases.



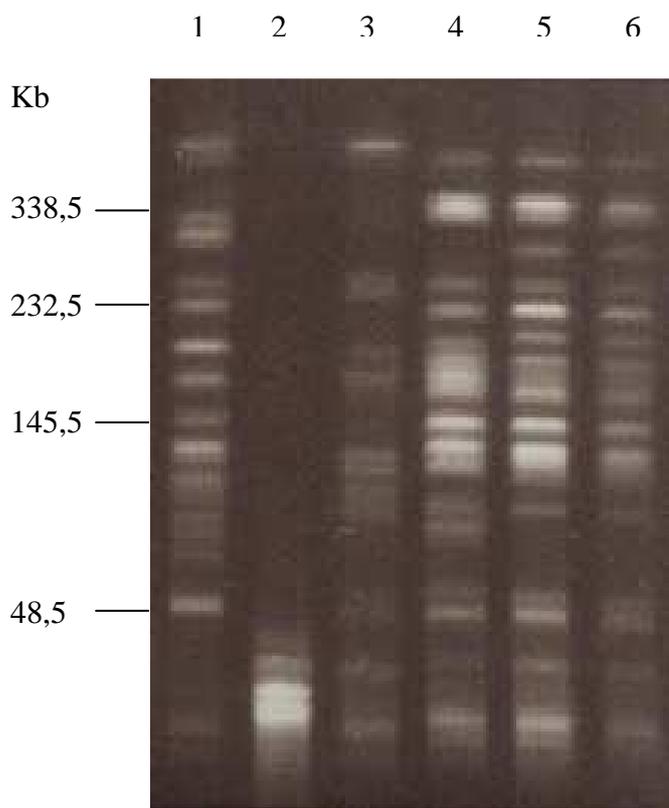
Representação de alguns genótipos obtidos por PFGE. Linhas 1 e 3: isolados nº 254 e 257, representativos do genótipo 2; Linhas 2 e 4: isolados nº 383 e 391 representativos do genótipo 3 (produtor da enzima SPM).

Figura 5. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com *SpeI* e separados por PFGE dos isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram a série TEM de β -lactamases.



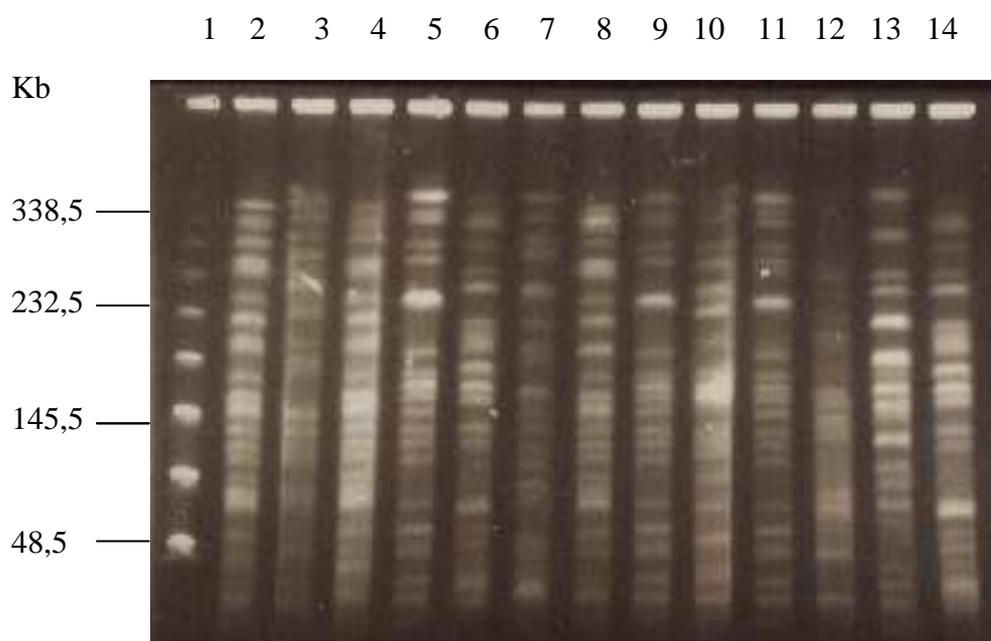
Representação de alguns genótipos obtidos por PFGE. Linha 1: Padrão de peso molecular (em Kb). Linhas 3 e 5: genótipo 9, isolados n^o 158 e 172; Linha 2: genótipo 8, isolado n^o 114; Linha 4: genótipo 6, isolado n^o 167 do; Linha 6: genótipo 10, isolado n^o 178.

Figura 6. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com *SpeI* e separados por PFGE dos isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram β -lactamases.



Representação de alguns genótipos obtidos por PFGE. Linha 1: genótipo 18, isolado nº 156; Linha 2: DNA degradado; Linha 3: genótipo 12, isolado nº 229; Linha 4: genótipo 5, isolado nº 260; Linhas 5 e 6: genótipo 4, isolados nº 262 e 282.

Figura 7. Perfis de restrição do DNA cromossômico obtidos após digestão com *Spe* I e separados por PFGE dos isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram β -lactamases.



Representação de alguns genótipos obtidos por PFGE. Linha 1: Padrão de peso molecular (em Kb). Linhas 2 e 4: genótipo 1, isolados nº 152 e 210; Linha 3: genótipo 22, isolado nº 163; Linhas 5, 9 e 11: genótipo 14, isolados nº 341, 343 e 256; Linhas 6 e 14: genótipo 7, isolados nº 271 e 371; Linha 7: genótipo 16, isolado nº 322; Linha 8: genótipo 15, isolado nº 313; Linha 10: genótipo 23, isolado nº 316; Linha 12: genótipo 20, isolado nº 295; Linha 13: genótipo 17, isolado nº 219.

Tabela 3.

Tabela 4.

Tabela 5.

5 DISCUSSÃO

Em meados dos anos 80, as infecções causadas por *P. aeruginosa* foram controladas por antibióticos, apesar do limitado número de agentes antimicrobianos com atividade contra esta espécie, incluindo penicilinas antipseudomonas e cefalosporinas, carbapenems, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas e polimixina (GIAMARELLOU, 2000). A utilização freqüente de antimicrobianos de amplo espectro tem contribuído para a emergência de isolados multirresistentes. No início dos anos 90, vários mecanismos de resistência foram identificados nesta espécie (NEU, 1992), além da resistência intrínseca, esta espécie bacteriana apresenta a habilidade de adquirir resistência aos antimicrobianos relevantes (LIVERMORE, 2002).

Os tratamentos praticados na rotina hospitalar atuam como pressão seletiva de bactérias multirresistentes. Devido ao uso indiscriminado dos antimicrobianos imipenem e ciprofloxacina, que são potentes agentes no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes, muitos autores alertam sobre a emergência de mutantes para essas drogas nos últimos anos (JONES et al., 1997; SADER, 2000; TSAKRIS et al., 2000). Os aminoglicosídeos, gentamicina e amicacina são considerados por muitos autores como adequados no tratamento contra *P. aeruginosa* multiresistentes, mas programas de vigilância têm recomendações sobre a restrição do uso destes quando são detectados isolados resistentes (JONES et al., 1997; MULLER-PREMUR & GUBINA, 1999). Além destes antimicrobianos, os β -lactâmicos devem ser monitorados porque induzem isolados produtores de β -lactamases, resultando no desenvolvimento da resistência na unidade hospitalar (LIVERMORE, 1989; SADER, 2000).

Estudos nacionais (SADER et al., 2001; DE FREITAS & BARTH, 2002; LOUREIRO et al., 2002; PELLEGRINO et al., 2002) e internacionais (FLUIT et al., 2001; MATHAI et al., 2001; PFALLER et al., 2001) têm demonstrado isolados de *P. aeruginosa* com elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos e a emergência de alguns multirresistentes. Entretanto, em nosso estudo, foi observada uma taxa de 7% de resistência simultânea aos 10 antimicrobianos utilizados em infecções causadas por *P. aeruginosa* provenientes de Hospitais de São Luís do Maranhão. Outros estudos encontraram taxas menores ou semelhantes de resistência simultânea, 3,2% em Hospitais de Porto Alegre (DE FREITAS & BARTH, 2002) e de 10% em Hospitais da Grécia (TASSIOS et al., 1998), enquanto Pellegrino e colaboradores (2002) detectaram um elevado percentual de resistência simultânea em 5 hospitais do Rio de Janeiro

(40%). Todos os isolados deste estudo foram susceptíveis a polimixina B, assim como relatado em outros estudos (GALES et al., 2001; LOUREIRO et al., 2002), por esta razão as polimixinas podem ser uma alternativa no tratamento contra *P. aeruginosas* multirresistentes, embora esses compostos sejam consideravelmente tóxicos.

No presente estudo, a produção de β -lactamases de espectro (ESBL) foi avaliada através do método de aproximação de discos utilizando discos de antibiótico com inibidores, piperacilina/tazobactam (AD3) e amoxicilina/clavulanato (AD5) (JARLIER et al., 1988; THOMSON, 2001). Vinte e seis isolados produtores de β -lactamases ESBL foram detectados através dos testes AD3 e AD5 sendo que apenas 6 isolados apresentaram resultados positivos para ambos. Uma vez que os métodos fenotípicos para determinação da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) descritos até o momento apresentam limitações na detecção destas enzimas em *P. aeruginosa*, foi empregada a técnica de PCR para detecção de genes de resistência de β -lactamases. As séries de β -lactamases CARB, OXA, PSE, SHV e TEM foram encontradas em 37 isolados, sendo que desses, 17 isolados apresentaram resultados positivos para AD3 ou AD5 e em 20 isolados selecionados por critérios específicos de resistência mais comumente conferido pelas séries de enzimas estudadas. Este resultado está de acordo com evidências relatadas por alguns autores sobre a eficiência dos testes fenotípicos de detecção para β -lactamases ESBL em *P. aeruginosa* (LIVERMORE & BROWN, 2001; WELDHAGEN et al., 2003). Por outro lado, nove isolados positivos para os testes fenotípicos não apresentaram nenhum dos genes pesquisados.

A observação da presença de mais de uma série de β -lactamases em 18 dos 37 isolados, inclusive em isolados do mesmo genótipo, pode ser explicada devido ao fato dos genes que codificam as séries de β -lactamases estudadas poderem estar localizadas em plasmídios ou em cassetes inseridos em integrons (LIVERMORE, 2002; WELDHAGEN et al., 2003). Genes correspondentes as séries OXA, PSE e CARB podem estar inseridos em integrons, inclusive simultaneamente (WELDHAGEN, 2004). A presença de integrase classe I foi observada na maioria dos isolados que apresentaram uma das séries de β -lactamases estudadas.

A caracterização genômica realizada pela técnica de PFGE, dos 37 isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram algum dos genes referentes as β -lactamases, foi importante para análise deste estudo. O grande número de genótipos obtidos e a presença de genótipos (Ex. 7, 9, 13 e 14) pertencentes a dois isolados de diferentes hospitais, evidenciam a disseminação dos genes de β -lactamases estudados em *P. aeruginosa* nos Hospitais de São Luís do

Maranhão. A detecção de isolados produtores de β -lactamases ESBL é necessária não apenas para ampliar o entendimento a cerca da resistência, mas também, para controlar essa disseminação da resistência na espécie estudada e também a outras espécies bacterianas presentes no ambiente hospitalar.

Neste estudo, avaliamos também a presença de M β las principalmente devido a importância clínica dos isolados que produzem estas enzimas, uma vez que estas conferem resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro inclusive carbapenemas (imipinem e meropenem). Os carbapenemas são os antimicrobianos indicados para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes (LIVERMORE, 2002). Apesar do principal mecanismo de resistência aos carbapenemas em *P. aeruginosa* ser devido à diminuição da permeabilidade da membrana (LIVERMORE, 2001), a aquisição e a produção de M β las tem sido o mecanismo de resistência mais comumente encontrado em alguns países como Japão e Coreia (LEE et al., 2002). Além disto, as M β las têm sido detectadas em várias regiões geográficas, inclusive no Brasil (NORDMAN & POIREL, 2002; TOLEMAN et al., 2002).

Para a detecção fenotípica das M β las foram utilizados os testes de aproximação de discos utilizando o ácido-2-mercaptopropiônico (M β la/2MP) (ARAKAWA et al., 2000) e o teste do disco imipinem-EDTA (M β la/EDTA) (YONG et al., 2002). Diferente do que ocorre com os testes de detecção fenotípica para β -lactamases ESBL, estes testes são recomendados para seleção das M β las em Gram negativos aeróbios, devido a sensibilidade e especificidade que apresentam (YONG et al., 2002; OH et al., 2003). Apesar do teste M β la/2MP ser mais amplamente utilizado na detecção das M β las, sua sensibilidade pode ser afetada de acordo com a distância da colocação dos discos, sendo assim, optamos por utilizar também o teste M β la/EDTA que se apresenta altamente sensível e específico.

Nossos resultados de detecção fenotípica de M β las foram menores (6,1%) do que no estudo realizado por Pellegrino e colaboradores (2002) que verificaram a produção de M β las em 37% dos isolados resistentes à ceftazidima em cinco hospitais do Rio de Janeiro. Em nosso estudo, apesar do pequeno número (13) de isolados que apresentaram resultados positivos, indicando a produção de M β la, várias considerações puderam ser realizadas. O primeiro aspecto a ser considerado é a diversidade, já que isolados apresentando 6 genótipos diferentes foram produtores de M β las. Apesar disto, dois genótipos predominaram entre estes, o genótipo 2 restrito ao Centro Médico e o genótipo 3 encontrado principalmente no Hospital Português. Foram detectados dois isolados (392 e 410) produtores de M β las que também

apresentaram β -lactamases ESBL. A ocorrência de isolados produtores de M β las e β -lactamases ESBL também foi observada no estudo realizado por Pellegrino e colaboradores (2002). Outro dado interessante foi a detecção do gene *bla_{spm}*, nos isolados do genótipo 3, através da PCR. O genótipo 3, assim como os demais produtores de M β las foram detectados apenas nos últimos oito meses dos 13 meses considerados neste estudo, sugerindo a introdução destas enzimas nos Hospitais do Maranhão no período investigado. Gales e colaboradores (2003) relataram a disseminação de um clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 em várias regiões do Brasil, sendo assim, o genótipo 3 pode pertencer a este clone multirresistente. Com relação as M β las que não foram caracterizadas, foi pesquisada a presença das séries IMP e VIM além da SPM, entretanto nenhuma série já descrita foi detectada. Outros estudos serão realizados com esta finalidade.

Em nosso estudo, a detecção da série das enzimas β -lactamases foi realizada através da PCR e alguns produtos obtidos de cada série foram seqüenciados no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (IOC/FIOCRUZ) para confirmação, uma vez que não haviam isolados produtores das enzimas estudadas para atuar como controles positivos, onde o resultado do seqüenciamento confirmou a série de β -lactamase pesquisada. A identificação da variante (alelo) da série de β -lactamase detectada só será possível através da análise das seqüências nucleotídicas que permite a discriminação dos genes da mesma série, que poderá ser realizado em estudos posteriores.

A emergência de M β las adquiridas do tipo IMP, SPM ou VIM entre bactérias Gram-negativas não fermentativas representam um risco epidemiológico uma vez que estas enzimas conferem resistência a praticamente todos os β -lactâmicos e estão freqüentemente associados a resistência à aminoglicosídeos além disto, os genes que codificam estas enzimas são comumente inseridos em elementos genéticos (integrons, transposons, plasmídios) que podem ser disseminados horizontalmente (LUZZARO et al., 2004). A disseminação do clone de *P. aeruginosa* produtora de SPM-M β la em hospitais de várias regiões do Brasil, assim como a descrição de endemia causada por *P. aeruginosa* produtora de VIM-M β la em hospitais europeus (GALES et al., 2003; LAGATOLLA et al., 2004) demonstra claramente a importância clínica das *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases e a necessidade da detecção destes determinantes genéticos para o controle destas situações.

Em saúde publica, o controle de uma doença consiste na aplicação de um conjunto de medidas, dirigidas a uma determinada comunidade, com o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade causadas por esta doença, a níveis tais que se deixe de considerá-la um problema.

É possível controlar as infecções hospitalares, reduzindo sua incidência a taxas aceitáveis através de programas institucionais de controle das infecções hospitalares. Para isto, são necessárias, a observação sistemática e análise rotineira da ocorrência e da distribuição das infecções nos hospitais e por outro lado, a ampla distribuição das informações analisadas, a todos que as geraram ou que delas necessitam para executar as ações de prevenção e controle. Em diversos países os resultados de caracterização genômica através da utilização da técnica de PFGE, detecção de ESBL e M β las, assim como os dados gerados pelos sistemas de vigilância de resistência aos antimicrobianos têm sido cruciais nos estudos epidemiológicos e no controle de infecções hospitalares (LAHTI, 1996, HO et al., 1998). No Brasil quando se faz referência a caracterização dos isolados estudados, mostra-se o que se conhece nas regiões sudeste, sul e em alguns outros estados, o que não reflete a realidade, mostrando-se necessário estudos desta natureza em outras regiões.

6 CONCLUSÃO

Todas as séries de β -lactamases pesquisadas (CARB-4, PSE, OXA, TEM e SHV) foram detectadas em *P. aeruginosa* provenientes de casos clínicos de hospitais de São Luís do Maranhão, inclusive as que ocorrem principalmente em Enterobactérias e ocasionalmente em outras espécies bacterianas (TEM e SHV).

A tipagem molecular através de PFGE revelou a presença de diferentes genótipos de *P. aeruginosa* apresentando a mesma série de β -lactamase, evidenciando a disseminação dos genes codificadores destas enzimas entre isolados oriundos dos Hospitais de São Luís do Maranhão.

O gene *bla_{spm}* foi detectado apenas no genótipo 3, este ocorreu apenas nos últimos cinco meses dos 13 meses considerados neste estudo, sugerindo a introdução deste nos Hospitais de São Luís do Maranhão neste período.

Os dados gerados a partir deste estudo, além de serem inéditos sob o ponto de vista da ocorrência de β -lactamases e clonalidade de isolados do Maranhão irão auxiliar as ações dos programas de controle de infecções hospitalares desta região e permitirá posteriormente a comparação dos isolados dessa região com a de outros estados e países.

7 BIBLIOGRAFIA

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, 16 v. 289, n. 1036, p. 321-31, May, 1980.

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T. FUJIWARA, H.; GOTO, M.. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p.40-3, Jan, 2000.

AUBERT, D.; POIREL, L.; ALI, A.B.; GOLDSTEIN, F.W.; NORDMANN, P.. OXA-35 is an OXA-10-related beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 717-21, Nov, 2001.

BASUSTAOGLU, A.C.; GUN, H.; SARACLI, MA.; BAYSALLAR, M.; HAZNEDAROGLU, T.. Development of resistance to imipenem among nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 469-70, May, 1995.

BENETT, J. V.; BRACHMAN, P. S. In **Hospital Infection**. 4th. Ed. Lipponcott-Raven, Philadelphia, USA, 1998.

BENNEKOV, T. ; COLDING, H.; OJENIYI, B.; BENTZON, M.W.; HOIBY, N.. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 202-4, Jan, 1996.

BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N.. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 11-8, Jul, 2002.

BERTRAND, X.; THOUVEREZ, M.; TALON, D.; BOILLOT, A.; CAPELLIER, G.; FLORIOT, C.; HELIAS, J.P.. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. **Int. Care Med.**, v. 27, n. 8, p. 1263-8, Aug, 2001.

BOU, G.; OLIVER, A.; MARTINEZ-BELTRAN, J.. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, n. 6, p. 1556-61, Jun, 2000.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 933-51, table of contents, Oct, 2001.

BRASIL. Lei 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.

BRASIL. Lei 9431 de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de janeiro de 1997.

BRASIL. Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 de maio de 1998.

BRASIL. Resolução-rcd nº 48 de 2 de junho de 2000. Roteiro de inspeção do programa de controle de infecção hospitalar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 de julho de 2000.

BURWEN, D.R.; BANERJEE, S.N.; GAYNES, R.P.. Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 6, p. 1622-5, Dec, 1994.

BUSH, K.. Metallo-beta-lactamases: a class apart. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 1, p. S48-53, Aug, 1998.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A.. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, Jun, 1995.

CHANAWONG A, M'ZALI FH, HERITAGE J, LULITANOND A, HAWKEY PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, n. 6, p. 839-52, Dec, 2001.

COLLIS, C.M.; HALL, R.M..Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 1, p. 155-62. Jan, 1995.

CURSO BÁSICO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. Caderno A- Epidemiologia para o controle de infecção hospitalar. Disponível em: (<http://www.anvisa.gov.br/divulga/cursos/cadernoA.pdf>). Acesso em:14 de julho de 2004.

DAROICHE, R.O.. Device-associated infections: A macroproblem that start with microadherence. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 1567-1572, 2001.

DE CHAMPS, C.; POIREL, L.; BONNET, R.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J.; NORDMANN, P.. Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime- resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 46, n. 9, p. 3031-4, Sep, 2002.

DE FREITAS, A.L.; BARTH, A.L.. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, p. 1-7, Feb, 2002.

DE MORAES, B.A.; CRAVO, C.A.; LOUREIRO, M.M. SOLARI, C.A.; ASENSI, M.D.. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 42, n. 4, p. 201-7. Jul-Aug 2000.

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; MELON, M.; MELON, B.; ANDRE, C.; FRIGO, C.; QUENTIN, C.. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12:

efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 2072-8, Jun, 2001.

DUBOIS, V.; POIREL, L.; MARIE, C.; ARPIN, C.; NORDMANN, P.; QUENTIN, C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 46, n. 3, p. 638-45, Mar, 2002.

EMORI, T.G.; GAYNES, R.P.. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 4, p. 428-42, Oct, 1993.

FARR, B.M.. Preventing vascular catheter-related infections: current controversies. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 1733-1738, Nov, 2001.

FOCA, M.; JAKOB K.; WHITTIER S.; LATTA P.L.; FACTOR,S.; RUBENSTEIN.; SAIMAN L.. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit. **New England J. of Medicine.**, v. 343, n. 10, p. 695-7000, Sep, 2000.

FLUIT, A.C.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F.J.; EUROPEAN SENTRY PARTICIPANTS. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 9, p. 617-25, Sep, 2001.

FRIEDRICH, L.V.; WHITE, R.L.; BOSSO, J.A.. Impact of use of multiple antimicrobials on changes in susceptibility of gram-negative aerobes. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, n. 5, p. 1017-24, May, 1999.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL, R.. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis.**, 15 v. 32 n. 2, p. S146-55, May, 2001.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S.. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 699-702, Oct, 2003.

GIAMARELLOU, H.. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J. Antimicrob. Agents**. v. 16, n. 2, p. 103-106, Oct, 2000.

GIBB, A.P.; TRIBUDDHARAT, C.; MOORE, R.A.; LOUIE, T.J.; KRULICKI, W.; LIVERMORE, D.M.; PALEPOU, M.F.; WOODFORD, N.. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 1, p. 255-8, Jan, 2002.

GILLIGAN, P.H. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray, P R; Baron, E; Pfaller, M A; Tenover, F C; Tenover, R H. **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press, Washington, D.C. p. 509-519, 1995.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; LEELAPORN, A.; KARIM, A.; TRIBUDDHARAT, C.; FENNEWALD, M.; NORDMANN, P.. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. **J Clin Microbiol**. v. 39, n. 1, p. 175-82. Jan. 2001.

GOLDMANN, D.A.; HUSKINS, W.C.. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. **Clin Infect Dis**. v. 24, n. 1, p. S139-45. Jan 1997.

HAKIMELAHI, G.H.; SHIA, K.S.; XUE, C.; HAKIMELAHI, S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; SABOURY, A.A.; KHALAFI-NEZHAD, A.; SOLTANI-RAD, M.N.; OSYETROV, V.; WANG, K.; LIAO, J.H.; LUO, F.T.. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of beta-lactam-based prodrugs. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, n. 11, p. 3489-98, Nov, 2002.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; TAKAHASHI, A.; YOMODA, S.; OKUBO, T.; NAKAMURA, A.; O'HARA, K.. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10,

from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an alcaligenes xylooxidans strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 6, p. 2014-6, Jun, 2002.

HO, P.L.; CHOW, K.H.; YUEN, K.Y.; NG, W.S.; CHAU, P.Y.. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 49-54, Jul, 1998.

HO, S.E.; SUBRAMANIAM, G.; PALASUBRAMANIAM, S.; NAVARATNAM, P.. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in malaysia producing IMP-7 beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 46, n. 10, p. 3286-7. Oct. 2002.

JACOBY, G.A.; BUSH, K.. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. 01/14/2004. Disponível em: (<http://www.lahry.org/studies/others.stm#table.1>). Acesso em: 13 jun. 2004.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A.. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 867-78, Jul-Aug, 1988.

JARVIS, W.R.. Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. **Pediatr. J. Infect. Dis.**, v. 6, n. 4, p. 344-51, Apr, 1987.

JONES, R.N.,; PFALLER, M.A.; MARSHALL, S.A.; HOLLIS, R.J.; WILKE, W.W.. Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: occurrence of resistance, molecular epidemiology, and screening for metallo-enzymes. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 29, n. 3, p.187-92, Nov, 1997.

KIFFER, C.R.; MENDES, C.; KUTI, J.L.; NICOLAU, D.P.. Pharmacodynamic comparisons of antimicrobials against nosocomial isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from the MYSTIC surveillance

program: the OPTAMA Program, South America 2002. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 49, n. 2, p. 109-16, Jun, 2004.

KISKA, O. L. & GILLIGAN, P. H.. *Pseudomonas*. In: P. R. Murray, F. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.516-526. 1999.

KÖHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPUR, M.; E.P.P.; SF, PECHERE, J.C.. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 43, n. 2, p. 424-7, Feb, 1999.

LAGATOLLA, C.; TONIN, E.A.; MONTI-BRAGADIN, C.; DOLZANI, L.; GOMBAC, F.; BEARZI, C.; EDALUCCI, E.; GIONECHETTI, F.; ROSSOLINI, G.M.. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 535-8, Mar, 2004.

LAHTI, C.J. Pulsed field gel electrophoresis in the clinical microbiology laboratory. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 10, n. 6, p. 326-30, Review, 1996.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M.. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 43, n. 7, p. 1584-90, Jul, 1999.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B.; KIM, Y.A.; YONG, D.; YUM, J.H.. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, n. 2, p. 88-91, Feb, 2001.

LEE, K.; LIM, J.B.; YUM, J.H.; YONG, D.; CHONG, Y.; KIM, J.M.; LIVERMORE, D.M.. bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 4, p. 1053-8, Apr, 2002.

LESCH, C.A.; LTOKAZU, G.S.; DANZIGER, L.L.I.; WEINSTEIN, R.A. Multi-hospital analysis of antimicrobial usage and resistance trends. **Diagn. Microbiol. Infect.**, v. 41, n. 3, p. 149-154, Nov, 2001.

LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENCO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, S.F.. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect. Dis.**, v. 28, n. 5, p. 1008-1, May, 1999.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 39, n. 9, p. 1948-53, Sep, 1995.

LIVERMORE, D.M. Role of beta-lactamase and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiot. Chemother.**, v. 42, p. 257-63. Review, 1989.

LIVERMORE, D.M.. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Ver.** v. 8, n. 4, p. 557-84. Review. Oct. 1995.

LIVERMORE, D.M.; BROWN, D.F.J.. Detection of β -lactamase mediated resistance. **J Antim Chemother.** v. 48, p. 59-64. Jul. 2001.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* our worst nightmare? **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 5, p. 634-640, Mar, 2002.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N.. Carbapenemases: a problem in waiting? **Curr. Opin. Microbiol.** v. 3, n. 5, p. 489-95. Review, Oct, 2000.

LIVERMORE, D.M.; YANG, Y.J.. Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Infect. Dis.**, v. 155, n. 4, p. 775-82, Apr, 1987.

LIVERMORE, D.M.; YUAN, M.. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella spp.* from intensive care units in Europe. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, n. 3, p. 409-24, Sep, 1996.

LOMOVSKAYA, O.; WARREN, M.S.; LEE, A.; GALAZZO, J.; FRONKO, R.; LEE, M.; BLAIS, J.; CHO, D.; CHAMBERLAND, S.; RENAULT, T.; LEGER, R.; HECKER, S.; WATKINS, W.; HOSHINO, K.; ISHIDA, H.; LEE, V.J.. Identification and characterization

of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 45, n. 1, p. 105-16, Jan, 2001.

LOUREIRO, M.M.; DE MORAES, B.A.; MENDONCA, V.L.; QUADRA, M.R.; PINHEIRO, G.S.; ASENSI, M.D.. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 3, p. 387-94. Apr. 2002.

LUZZARO, F.; MANTENGOLI, E.; PERILLI, M.; LOMBARDI, G.; ORLANDI, V.; ORSATTI, A.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M.; TONIOLO, A.. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 1865-70, May, 2001.

LUZZARO, F.; ENDIMIANI, A.; DOCQUIER, J.D.; MUGNAIOLI, C.; BONSIGNORI, M.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M.; TONIOLO, A.. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 48, n. 2, p. 131-5, Feb, 2004.

MARCHANDIN, H.; JEAN-PIERRE, H.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; DARBAS, H.; PERIGAULT, P.F.; CARRIERE, C.. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 1, p. 213-6, Jan, 2000.

MATHAI, D.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A.; SENTRY PARTICIPANT GROUP NORTH AMERICA. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 40, n. 3, p. 129-36, Jul, 2001.

MENDES, C.; HSIUNG, A.; KIFFER, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S.; MIMICA, I.; ZOCCOLI, C.; MYSTIC STUDY GROUP. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 5, p. 236-44, Oct, 2000.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M.. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 4, p. 727-37. Review, Apr, 1999.

MULLER-PREMRU, M.; GUBINA, M.. Serotype, antimicrobial susceptibility and clone distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital. **Zentralbl. Bakteriolog.**, v. 289, n. 8, p. 857-67, Jan, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M7-A4., **NCCLS**, Wayne. Pa. 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Document M 100-59. **NCCLS**, Wayne. Pa. 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) . Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Document M 100-S11. **NCCLS**, Wayne. Pa. 2001.

NEU, H.C.. The crisis in antibiotic resistance. **Sci.**, 21 v. 257, n. 5073, p. 1064-73. Review, Aug, 1992.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Sci.** 15 v. 264, n. 5157, p. 382-8. Review, Apr, 1994.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM (NNISS) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. **Am. J. Infect. Control.**, v. 26, p. 520-523, 1999.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM (NNISS). Aggregated data from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System, December, 2000.

NOCIARI, M.M.; CATALANO, M.; CENTRON, GARCIA, D.; COPENHAVER, S.C.; VASIL, M.L. SORDELLI, D.O.. Comparative usefulness of ribotyping, exotoxin A genotyping, and SalI restriction fragment length polymorphism analysis for *Pseudomonas aeruginosa* lineage assessment. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 179-90, Apr, 1996.

NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 2, p. 128-131, Aug, 1998.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 6, p. 321-31. Review, Jun, 2002.

OH, E.J.; LEE, S.; PARK, Y.J.; PARK, J.J.; PARK, K.; KIM, S.I.; KANG, M.W.; KIM, B.K.. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. **J. Microbiol. Methods.**, v. 54, n. 3, p. 411-8, Sep, 2003.

PALLERONI, N. J. Introduction to the aerobic *Pseudomonas*. In: Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infection. **Systematic Bacteriology**. Collier, L.; Ballows, A. & Sussman, M. (eds) vol 2 9th ed. New York, USA, 1091-1108, 1998.

PATZER, J.; TOLEMAN, M.A.; DESHPANDE, L.M.; KAMINSKA, W.; DZIERZANOWSKA, D.; BENNETT, P.M.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, n. 3, p. 451-6, Jan, 2004.

PELLEGRINO, F.L.P.C.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M.G.S.; NOUÉR, S.A.; OLIVEIRA, M.P.; SAMPAIO, J.L.M.; FREITAS, A.D.; FERREIRA, A.L.P.; AMORIM, E.L.T.; RILEY, L.; MOUREIRA, B.M.. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microb.**, v. 40, n. 7, p. 2420-2424, Jul, 2002.

PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H.S.. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clin Infect Dis.** 15 v. 32, n. 2, p. S156-67. May, 2001.

PITT, T.L. *Pseudomonas, Burkholderia* and related genera..In: Collier, L.; Balows, A. & Sussman, M. (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. **Systematic bacteriology**. Vol.2. 9th ed. New York, EUA. P. 1115-11138. 1998.

POIREL, L.; LAMBERT, T.; TURKOGLU, S.; RONCO, E.; GAILLARD, J.; NORDMANN, P.. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla(VIM-2) carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 2, p. 546-52, Feb, 2001.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G.F.; DE CHAMPS, C.; NORDMANN, P.. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, n. 3, p. 561-5, Mar, 2002.

QUINN, J.P.; DUDEK, E.J.; DIVINCENZO, C.A.; LUCKS, D.A.; LERNER, S.A.. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 2, p. 289-94, Aug, 1986.

RENDERS N, ROMLING Y, VERBRUGH H, VAN BELKUM A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 12, p. 3190-5, Dec, 1996.

RONALD, A.. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **Dis. Mon.**, v. 49, n. 2, p. 71-82. Review, Feb, 2003.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J.. Infection control in cystic fibrosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 57-71. Review, Jan, 2004.

SADER, H.S.; MIMICA, I.; ROSSI, F.; ZOCCOLI, C.; MONTELLI, A.C.; SAMPAIO, J.L.; SEGURA, A.J.; MAGALHAES, M.; NOWAKONSKI, A.; MENDES, C.M.. Evaluation of

the in vitro activity of cefepime compared to other broad-spectrum cephalosporins against clinical isolates from eighteen Brazilian hospitals by using the Etest. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v, 28, n. 2, p. 87-92, Jun, 1997.

SADER, H.S.; CERBARA, E.F.; LUZ, D.; HASHIMOTO, A.. Evaluation of the Cephalosporins, Cefepime, Cefpirome and Ceftazidime, against Clinical Isolates of Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 3, n. 6, p. 231-237, Dec, 1999.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; WINOKUR, P.; KUGLER, K.C.; PFALLER, M.A.; DOERN, G.V.. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). SENTRY Latin America Study Group. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, n. 4, p. 289-301, Dec, 1998.

SADER, H.S.. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from multicenter studies. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 91-9, Apr, 2000.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. A.; ZOCCOLI C.; BARTH, A.; JONES, R. N.. Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results From Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infec. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SANSCHAGRIN, F.; BEJAOU, N.; LEVESQUE, R.C.. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 42, n. 8, p. 1966-72, Aug, 1998.

SANSCHAGRIN, F.; COUTURE, F.; LEVESQUE, R.C.. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 39, n. 4, p. 887-93, Apr, 1995.

SAVELKOUL, P.H.; AARTS, H.J.; DE HAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J.L.; SCHOOLS, L.; LENSTRA, J.A.. Amplified-fragment length

polymorphism analysis: the state of an art. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 10, p. 3083-91. Review, Oct, 1999.

SCHWARTZ, D.C.; SAFRAN, W.; WELSH,; HAAS, R.; GOLDENBERG, M.; CANTOR, C.R.. New techniques for purifying DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Wymp. **Quant. Biol.**, v. 47, p. 189-195, 1983.

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. **Res. Microbiol.**, v. 153, n. p. 221-226, 2002.

SPEIJER, H.; SAVELKOUL, P. H.M.; BONTEN, M. J.; STOBBERINGH, E.E; TJHIE J. H. T. Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of Endemicity in a Intensive Care Unit. **J. Clin. Microb.**, v. 37, n. 11, p. 3654-3661, Jul, 1999.

TASSIOS, P.T.; GENNIMATA, V.; MANIATIS, A.N.,; FOCK, C.; LEGAKIS, N.J.. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. The Greek *Pseudomonas Aeruginosa* Study Group. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 4, p. 897-901, Apr, 1998.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A. MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINA, THAN, B.. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 9, p. 2233-9. Review, Sep, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT D.; GOERING R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthc are and epidemiologists. Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of America. **Infect. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, n. , p. 426-439, 1997.

THOMSON, K.S.; SANDERS, C.C.. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, n. 9, p. 1877-82, Sep, 1992.

THOMSON, K.S.. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. **Emerg. Infect. Dis.** v. 7, n. 2, p. 333-6. Review, Mar-Apr, 2001.

TOLEMAN MA, SIMM AM, MURPHY TA, GALES AC, BIEDENBACH DJ, JONES RN, WALSH TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 673-9, Nov, 2002.

TOLEMAN MA, BIEDENBACH D, BENNETT D, JONES RN, WALSH TR. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 583-90, Oct, 2003.

TOLEMAN, M.A.; ROLSTON, K.; JONES, R.N.; WALSH, T.R.. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, n. 1, p.329-32, Jan, 2004.

TSAKRIS, A.; POURNARAS, S.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M.F.; BABINI, G.S.; DOUBOYAS, J.; LIVERMORE, D.M.. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1290-2, Mar, 2000.

VAHABOGLU, H., CZTURK, R.; AYGUN, G.; COSKUNKAN, F.; YAMAN, A.; KAYGUSUZ, A. ET AL. Widespread detection of PER-I type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v.41, n. , p. 226-229, 1997.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S..Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, n. 1, p. 147-51,Jan, 1991.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.. Management of HIV-1 infection in the hospital setting. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 10, n. 1, p. 3-7, Jan, 1989.

WELDHAGEN, G.F.; POIREL, L.; NORDMANN, P.. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 8, p. 2385-92. Review, Aug, 2003.

WELDHAGEN, G.F.. Integrons and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 23, n. 6, p. 556-62, Jun, 2004.

YAN, J.J.; KO, W.C.; WU, J.J.. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 8, p. 2368-71, Aug, 2001.

YAN, J.J.; P.-R. HANEB, K.; WEN-CHIEN, K. T.; LOB, S.-H. TSAI, H.-M. WE, ANDJ.-J. WO. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM 3 a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. , p. 2224-2228, 2001.

YONG, D.; LEE, K.; YUM, J.H.; SHIN, H.B.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y.. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 10, p. 3798-801, Oct, 2002.

YOSHIMURA, F. & NIKAIDO, H.. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. **J. Bacteriol.**, v. 152, n. 2, p. 636-42. Nov. 1982.