UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos

Renata Galetti

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Renata Galetti

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Galetti, Renata

Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos

49p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa.

1. Metalo-beta-lactamase (MBL). 2. Carbapenêmicos.
3. *Pseudomonas aeruginosa*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Renata Galetti

Título do trabalho: Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profº Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado nos seguintes centros de pesquisa:

Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, onde foi realizado parte dos experimentos de sequenciamento.

Dedico este trabalho à minha amada família, meus pais Marco e Angela e meus irmãos Roberta e Rafael. Obrigada por todo amor e carinho, pela força e companheirismo em todos os momentos. A vocês meus pais, que estavam sempre presentes, dedico não só este trabalho, mas tudo o que ainda realizarei em minha vida. Sem vocês minha realização não seria possível.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, força maior, presente em todos os momentos da minha vida, por me guardar e iluminar, sempre.

Agradeço a minha mãe, Angela Montanini Galetti, por sempre me entender e além de todo o amor de mãe, sempre me deixar o seu ombro amigo, me apoiando em situações difíceis e dividindo comigo os intensos momentos de felicidade. Ao meu pai, Marco Antonio Galetti, por nunca me deixar desistir e me proporcionar sempre o apoio necessário para tudo o que eu realizei; a vocês, meu amor e carinho.

Agradeço a minha irmã, Roberta Galetti, por ser minha confidente e amiga, sempre me apoiando e dando força; ao meu irmão, Rafael Galetti, por estar sempre presente em minha vida, a vocês minha eterna amizade e amor.

Agradeço a Vittor Ribeiro Brito, pela amizade, amor e companheirismo, pelo apoio e compreensão. Com você tudo fica mais fácil.

Agradeço às minhas amigas Pammela Araújo Lacerda, Mariane Sperancin Marcomini e Shelly Leite, pela amizade verdadeira e por dividir comigo alguns dos melhores momentos de minha vida.

Agradeço à minha grande amiga Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira. Com você Gi, aprendi que verdadeiros amigos são para a vida inteira. Obrigada por estar sempre comigo.

Agradeço à minha orientadora, Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini, pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada. Minha admiração, respeito e enorme gratidão.

Aos amigos do LEBEM, André Pitondo-Silva, Eduardo Carneiro Clímaco, Izabel Cristina Vanzato Palazzo, Joseane Cristina Ferreira, Juliana Mucedola Longo, Leila Priscila Pinheiro da Silva, Leonardo Neves de Andrade e Rubens Eduardo da Silva pela amizade, ótimos momentos, ajudas e sugestões. Com vocês, a realização deste trabalho, com certeza, foi mais fácil e prazerosa.

Agradeço à Profª Drª Ana Cristina Gales, por ter cedido gentilmente linhagens bacterianas utilizadas como controle neste trabalho.

Agradeço à Prof. Dr. Laurent Poirel, por ter cedido gentilmente linhagens bacterianas utilizadas como controle neste trabalho.

Agradeço à Adriana Aparecida Márquez e ao Prof. Dr. Wilson de Araújo da Silva Júnior pelos seqüenciamentos de DNA.

Agradeço à FAPESP pela bolsa de mestrado concedida, processo nº 2008/52498-4 e pelo auxílio pesquisa nº 2008/56379-0.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor"

(Johann Wolfgang Von Goethe)

RESUMO

GALETTI, R. **Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos**. 2010. 49f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As metalo-beta-lactamases (MBL) são carbapenemases pertencentes à classe B de Ambler e ao grupo 3 de Bush-Jacoby, as duas classificações mais utilizadas atualmente.
Essas enzimas conferem, às bactérias, resistência às cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos, mas não conferem resistência ao monobactam aztreonam. Além disso, não são inibidas por inibidores de β-lactamases comercialmente disponíveis, porém possuem sensibilidade ao ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e ácido mercaptopropiônico (MPA). Atualmente são conhecidas nove subclasses de MBL: IMP,VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM e DIM. Essas MBL têm se tornado clinicamente importantes, principalmente, em *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e alguns gêneros da família *Enterobacteriaceae*. O principal objetivo desse trabalho foi a caracterização genética e epidemiológica de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapêmicos, produtoras de MBL, isoladas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo no período de abril a agosto de 2007. Das 54 *P. aeruginosa* estudadas, 24 foram positivas na triagem fenotípica para MBL e 5 apresentaram o gene $bla_{\text{SPM-1}}$ detectado por PCR e confirmado pelo seqüenciamento. O inibidor mais eficiente na triagem fenotípica foi o EDTA. A baixa correlação entre o teste fenotípico e molecular pode ser explicada pela capacidade que o EDTA possui de aumentar a permeabilidade da membrana celular e assim tornar a bactéria sensível a baixas concentrações do antibiótico. Além disso, a diferença entre o número de isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou ceftazidima e os que apresentaram a MBL podem ser explicados pela associação de outros mecanismos de resistência, como hiperprodução de AmpC, redução da expressão de porinas e/ou aumento do efluxo de antibióticos. De acordo com o perfil de macrorrestrição obtido por eletroforese em campo pulsado as 5 linhagens produtoras de SPM-1 estão agrupadas em 3 perfis clonais distribuídos em diferentes clínicas no hospital não sendo identificado nenhum clone predominante. Finalizando, entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou à ceftazidima a freqüência de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foi de 9,3%, indicando que as medidas aplicadas pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) desta instituição estão sendo eficientes, porém mesmo assim é necessário que a CCIH esteja sempre atenta a relatos de resistência aos carbapenêmicos pois, linhagens produtoras de MBL restringem muito as opções terapêuticas para infecções causas por elas.

Palavras-chave: Metalo-β-lactamase, *P.aeruginosa*, carbapenêmicos

ABSTRACT

GALETTI, R.. **Study of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and genes involved in carbapenem resistance**. 2010. 49f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Metallo-beta-lactamase (MBL) are carbapenemases which belong to the Bush-Jacoby-Medeiros group 3 and to the molecular class B, according Ambler. These two classifications are the most used nowadays. These enzymes confer microorganisms resistant to cephalosporins, penicillins and carbapenems, but not to aztreonam, a monobactam. Moreover, they are not inhibited by commercially available β-lactamases inhibitors, but they are susceptible to EDTA and MPA. Currently this is known nine subclasses of MBL: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM and DIM. These MBL became clinically important, especially in microorganisms such as *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and genera of the family *Enterobacteriaceae*. The main objective of this study was genetic and epidemiologic characterization of MBL-producing-*P. aeruginosa,* isolated in the Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo in the period from April to August 2007. Among the 54 *P. aeruginosa* studied, 24 were positive for phenotypic MBL screening and 5 presented $bla_{\text{SPM-1}}$ gene, detected by PCR and confirmed by sequencing. The most efficient inhibitor in phenotypic screening was EDTA. The low correlation between phenotypic and molecular testing can be explained by the ability of EDTA to increase the permeability of cell membranes and rendering the bacteria as sensitive to low concentrations of antibiotic. Furthermore, the difference between number of isolates carbapenem resistant and / or ceftazidime resistant and the number of MBL-producing-*P. aeruginosa* can be explained by the association with other resistance mechanisms, such as AmpC overproduction, reduced expression of porins and / or increased antibiotics efflux. According to profile of macrorestriction after pulsed-field gel electrophoresis, five SPM-1-producing-*P. aeruginosa* are grouped in three different clonal profiles. These clonal strains were proceeded from different clinics at the hospital and no predominant clone was identified. Finally, among the carbapenems and/or ceftazidime resistant isolates the frequency of SPM-1-producing-*P. aeruginosa* was 9.3%, suggesting that the hospital care of infection control has being effective.

Keywords: Metallo-β-lactamase, *P.aeruginosa*, carbapens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura principais anéis β-lactâmicos 2

Figura 2 Estrutura esquemática de integron de classe 1 7

Figura 3 Contexto genético da IS*CR*4 7

Figura 4 Esquema para a aplicação dos discos de CAZ, IMP, EDTA e MPA 15

Figura 5 Número de *P. aeruginosa* resitente ao IMP, MER e/ou CAZ e o número de *P. aeruginosa* positivas no teste de aproximação de discos isoladas por espécime clínico 23

Figura 6 Distribuição dos isolados presuntivamente produtores de MBL por clínica do HCFMRP-USP 24

Figura 7 Teste de aproximação de discos 24

Figura 8 Dendrograma dos perfis de PFGE apresentado pelos isolados de *P. aeruginosa* 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens-controle utilizadas no estudo..... 13

Tabela 2 - Pares de *primers* utilizados..... 17

Tabela 3 - Componentes para a reação de PCR..... 18

Tabela 4 - Dados gerais das linhagens e resultados dos estudos fenotípicos e moleculares para detecção de resistência por produção de MBL 26

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
°C	Graus Centígrados
%	Porcentagem
A	Adenina
AIM	*Australia Imipenemase*
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATM	Aztreonam
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
BHI	*Brain Heart Infusion*
C	Citosina
CAZ	Ceftazidima
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
cm	Centímetros
CPM	Cefepime
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DDS	Teste de aproximação de disco
DIM	*Dutch Imipenemase*
DNA	Ácido desoxirribonucléico

dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ES	EDTA sarcosil
Etest	*Epsilomer test*
ESBL	*Extended spectrum beta-lactamase*
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
G	Guanina
GIM	*German imipenemase*
Glu	Glutamina
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IMP	Imipenemase
IPM	Imipenem
IS	*Insertion sequence*
KHM	*Kyorin university Hospital Metallo-β-lactamase*
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
M	Molar (es)
mA	Miliamper (es)
MBL	Metalo-beta-lactamase
MER	Meropenem
mg	Miligrama (s)
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar (es)
mm	Milímetro (s)

MPA	Ácido mercaptopropiônico
NaCl	Cloreto de sódio
NDM	*New Delhi Metallo-β-lactamase*
ng	Nanograma (s)
ORF	*Open reading frame*
pb	Pares de base
PBP	*Penicillin-binding proteins*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PFGE	*Pulsed-field gel electrophoresis*
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Tris NaCl
pmol	Picomol (es)
POL	Polimixina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
s	Segundo (s)
SADT	Serviço de Apoio Diagnóstico e Tratamento
Ser	Serina
SIM	*Seoul imipenemase*
SPM	São Paulo Metalo-β-lactamase
T	Timina
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris, EDTA e água
U	Unidade

UETDI	Unidade de Emergência e Tratamento de Doenças Infecciosas
UPGMA	*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
VIM	*Verona imipenemase*
X	Vezes
Zn^{++}	Íon zinco
β	Beta

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

LISTA DE FIGURAS ..... **iii**

LISTA DE TABELAS ..... **iv**

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS ..... **v**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1. Antibióticos β-lactâmicos 2

1.2. Resistência bacteriana aos antibióticos β-lactâmicos 3

1.3. Metalo-beta-lactamases 4

1.4. O gênero *Pseudomonas* 7

1.5. Detecção de MBL 8

2. OBJETIVOS **10**

2.1. Objetivo geral 11

2.2. Objetivos específicos 11

3. MATERIAL E MÉTODOS **12**

3.1. Isolados bacterianos 13

3.2. Identificação bacteriana 14

3.3. Armazenamento das bactérias 14

3.4. Teste de sensibilidade aos antibióticos 14

3.4.1. Difusão em ágar 14

3.4.2. Concentração Inibitória Mínima 14

3.5. Detecção fenotípica de MBL 15

3.5.1. Aproximação de Disco 15

3.6. Detecção molecular de MBL 16

3.6.1. Extração de DNA genômico bacteriano 16

3.6.2. Amplificação dos fragmentos do DNA 16

3.6.2.1. Condições para a reação de amplificação 18

3.6.2.2. Eletroforese em gel de agarose 19

3.7. Seqüenciamento 19

3.8. Eletroforese em campo pulsado 20

4. RESULTADOS 22

4.1. Detecção fenotípica de metalo-beta-lactamases 23

4.2. Detecção molecular de metalo-beta-lactamase 25

4.3. Seqüenciamento 25

4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima 25

4.5. Eletroforese em campo pulsado (PFGE) 27

5. DISCUSSÃO 29

6. CONCLUSÕES 34

7. REFERÊNCIAS 36

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos β-lactâmicos

Antibióticos β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), representam 60% de todos os antimicrobianos de maior importância. São preferidos pela eficácia e segurança e porque sua atividade pode ser ampliada ou restaurada por manipulação química. Outras classes de antibióticos não possuem tal maleabilidade e versatilidade (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

A estrutura básica deste grupo de antibióticos envolve um anel β-lactâmico, tiazolidínico (penicilinas), diidrotiazina (cefalosporinas), ácido 3-aminobactâmico (monobactâmicos) ou carbapenêmico (carbapenêmicos) que corresponde ao anel tiazolidínico das penicilinas, diferenciando deste pela substituição do átomo de enxofre (S), por um átomo de carbono (C), e uma cadeia lateral que é responsável por grande parte das características farmacodinâmicas e do espectro de ação dos antibióticos. A classificação destes agentes é feita pela sua estrutura molecular, espectro de ação e estabilidade diante dos mecanismos de resistência bacteriana (LIVERMORE, 1996).

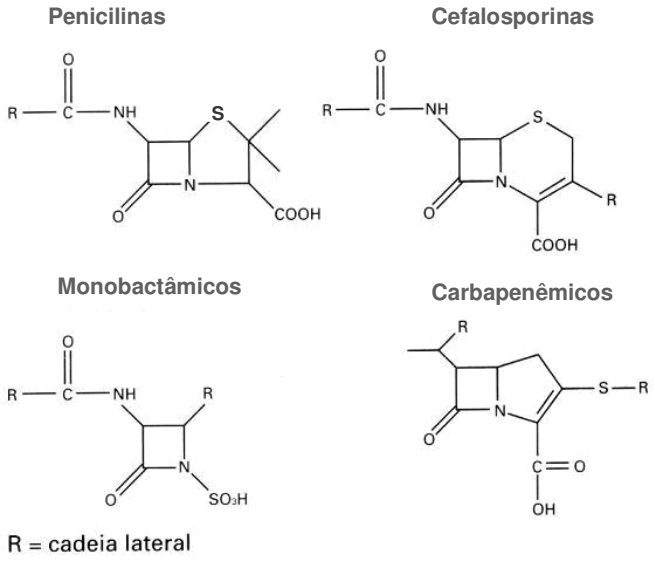

Figura 1. Estrutura dos principais anéis β-lactâmicos

A atividade dos β-lactâmicos é decorrente da habilidade que eles possuem de interferirem na síntese de peptídeoglicano, constituinte essencial para a manutenção da parede celular bacteriana, pois são estruturalmente análogos ao peptidil-D-alanil-D-alanina terminal

do peptídeoglicano (LIVERMORE, 2001), com isso a reação cruzada, que deveria acontecer para a formação da parede celular, é impedida e a parede celular não é corretamente formada, provocando, assim, a lise das bactérias.

O principal mecanismo de resistência, em bacilos gram-negativos, a este grupo de antibióticos, é a produção de enzimas β-lactamases. Estas enzimas rompem cataliticamente o anel β-lactâmico destes antibióticos, formando um derivado ácido, sem atividade terapêutica (LIVERMORE, 2001).

Os antibióticos β-lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, como imipenem e meropenem, foram instituídos como alternativas terapêuticas para infecções graves provocadas, principalmente, por bactérias gram-negativas multirresistentes produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL - do inglês, *Extended Spectrum β-Lactamase*). Os carbapenêmicos são antibióticos originalmente naturais, produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. A presença do anel carbapenêmico dá a estas substâncias a propriedade de agir com elevada potência contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, sendo que a presença de uma cadeia hidroxietila na posição trans confere a estas drogas uma suposta estabilidade na presença de β-lactamases (TAVARES, 2001).

O imipenem, assim como os outros carbapenêmicos, inibe a síntese da parede celular das bactérias em crescimento, provocando sua lise osmótica. Estes antibióticos ligam-se a proteínas ligadoras de penicilinas (PBP - do inglês, *penicillin-binding proteins*) presentes na parede bacteriana, mas os receptores principais para os quais tem mais afinidade são as PBP1 e PBP2 (TAVARES, 2001).

1.2. Resistência bacteriana aos antibióticos β-lactâmicos

Tem-se notado, nos últimos anos, frequência aumentada de microrganismos resistentes às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, o que resulta em consequente aumento do uso de antibióticos β-lactâmicos mais potentes, como os carbapenêmicos. Atualmente, esses agentes são importantes opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções hospitalares. Isto deve-se à sua elevada afinidade pelas PBPs e estabilidade frente a algumas β-lactamases, como ESBL e β-lactamase AmpC. A utilização dos carbapenêmicos, cada vez mais frequênte, ocasiona pressão seletiva, evidenciando, deste modo, as bactérias mais resistentes.

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a produção de enzimas carbapenemases. Na ausência destas enzimas, os mecanismos responsáveis pela resistência a esses antibióticos são multifatoriais, principalmente devido ao aumento da atividade de cefalosporinase com redução da expressão de porinas e/ou aumento da expressão da bomba de efluxo. A proteína de membrana externa OprD permite a entrada dos carbapenêmicos e a redução na sua expressão é frequentemente notada em isolados resistentes. O sistema de efluxo MexAB-OprM é expresso constitutivamente em isolados de *P. aeruginosa*, e os substratos para esse sistema incluem fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e β-lactâmicos (incluindo carbenicilina, piperacilina, cefepime, ceftazidima e aztreonam). Imipenem não é um bom substrato para MexAB-OprM, mas o meropenem, por possuir uma cadeia hidrofóbica, pode ser afetado por esse sistema (QUALE, 2006).

1.3. Metalo-beta-lactamases

Vários esquemas foram propostos para a classificação das β-lactamases, porém as duas classificações mais utilizadas atualmente são segundo Ambler (1980) e Bush-Jacoby-Medeiros (1995). O primeiro agrupa as β-lactamases em quatro classes A, B, C e D, de acordo com a homologia da sequência de nucleotídeos e aminoácidos enquanto Bush, Jacoby e Medeiros (1995) dividem as β-lactamases em quatro grupos funcionais (1, 2, 3 e 4) relacionando características bioquímicas, enzimáticas e imunológicas.

As MBLs são caracterizadas por sua habilidade de hidrolisar carbapenêmicos utilizando dois íons divalentes, comumente o zinco, como co-fator para sua atividade catalítica normal. Apesar de possuir resistência aos inibidores clássicos de β-lactamases, como o ácido clavulânico e o sulbactam, possuem sensibilidade aos quelantes de íons metálicos como o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) e compostos derivados do ácido tiolático como ácido-mercaptopropiônico (MPA) (CROWDER *et al.*, 1998; QUEENAN; BUSH, 2007).

As MBLs são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* e *Aeromonas* spp.. Contudo, desde o início da década de 1990, genes que codificam MBLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, que não produzem naturalmente tais enzimas, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e gêneros da família

Enterobacteriaceae. Estes novos genes que codificam as MBL foram encontrados inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene, fazendo com que essas enzimas passassem a ser conhecidas como MBL móveis ou MBL adquiridas (MENDES *et al*., 2006).

Atualmente são conhecidas nove subclasses de MBL adquiridas: IMP (Imipenemase) (OSANO *et al*., 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI *et al*., 1999), SPM (São Paulo metalo-β-lactamase) (TOLEMAN *et al*., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA *et al*., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE *et al*., 2005), AIM (Austrália Imipenemase) (YONG *et al*.., 2007) e, mais recentemente, KHM (Kyorin University Hospital Metallo-β-lactamase) (SEKIGUCHI *et al*., 2008), NDM-1 (New Delhi Metallo-β-lactamase) (YONG *et al*., 2009) e DIM-1 (Dutch Imipenemase) (POIREL *et al*., 2009).

O primeiro relato de MBL adquirida ocorreu em 1994 quando foi descrita a enzima denominada IMP-1 em *Serratia marcescens* isolada no Japão, a qual apresentava o fenótipo de resistência ao imipenem e cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações (OSANO et al, 1994).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de bactérias produtoras de MBL adquirida ocorreu em 2002 (PELLEGRINO, 2002), que não foram caracterizadas molecularmente.

As variantes da subclasse IMP parecem ser mais prevalentes na Ásia, sendo comumente encontradas em bacilos gram-negativos não-fermentadores (QUEENAN, BUSH, 2007).

O primeiro relato de enzima da família IMP feito na Europa foi em uma linhagem de *Acinetobacter baumannii*, isolada na Itália, produtora de IMP-2, codificada por um cassete gênico localizado em um integron classe 1 (QUEENAN, BUSH, 2007).

Variantes IMP foram caracterizadas no Japão (IMP-3, IMP-6 e IMP10), apresentando substituições em apenas um aminoácido, o que resultava em alterações na atividade enzimática. A posição do aminoácido modificado observado na IMP-3 e IMP-6 correspondem ao aminoácido (glicina) encontrado em uma MBL inata a BCII (MBL codificada cromossomicamente por *Bacillus cereus*), gerando a hipótese de que a IMP-3 poderia ser a progenitora da IMP-1 (WALSH *et al*., 2005). Inúmeras variantes IMP têm sido descritas em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Um estudo realizado pelo programa de vigilância de resistência a antimicrobianos SENTRY, identificou, no Brasil, 5 isolados produtores da enzima IMP-1 e 1 isolado produzindo IMP-16 (WALSH *et al*., 2005).

O segundo grupo dominante de MBLs adquiridas são as enzimas da família VIM. VIM-1 foi primeiramente descrita em Verona, Itália, a partir de *P. aeruginosa* isolada em 1997. Esta bactéria era resistente a uma série de β-lactâmicos, incluindo piperacilina, ceftazidima, imipenem e aztreonam. O gene $bla_{\text{VIM-2}}$ foi identificado, pela primeira vez, no

sul da França, em *P. aeruginosa,* isolada no ano de 1996. VIM-2 está estreitamente relacionada com VIM-1 (90% de identidade de aminoácidos) (QUEENAN; BUSH, 2007). VIM-2 é a MBL mais relatada no mundo inteiro (WALSH *et al*., 2005).

A sequência de aminoácidos em VIM-3 difere de VIM-2 por substituições em dois aminoácidos. VIM-4 foi relatada a partir de um isolado de *P. aeruginosa* em Larissa, Grécia. VIM-4 difere de VIM-1 por mudança em apenas um aminoácido (Ser175Arg). VIM-5 difere da VIM-1 por alterações em cinco aminoácidos. VIM-6 difere de VIM-2 por mudança em dois aminoácidos (Glu59Arg e Asp165Ser) e de VIM-3 por apenas um aminoácido. VIM-7, possui apenas 77% de identidade com VIM-1 e 74% com VIM-2. O gene $bla_{\text{VIM-8}}$, que foi identificado a partir de *P. aeruginosa* na Colômbia, somou-se ao crescente número de genes bla_{VIM} descobertos na América do Sul. Dois outros, $bla_{\text{VIM-9}}$ e $bla_{\text{VIM-10}}$ são provenientes do Reino Unido e diferem entre si por apenas dois aminoácidos. Foram isolados também duas linhagens de *P. aeruginosa* produtoras VIM-11 na Argentina e Itália (QUEENAN; BUSH, 2007).

A primeira identificação da MBL SPM-1 foi feita em um isolado clínico de *P. aeruginosa*, como parte de um estudo realizado pelo SENTRY, em São Paulo, no ano de 1997 e definiu uma nova família com 35,5% de aminoácidos idênticos aos de IMP-1 (QUEENAN; BUSH, 2007; WALSH *et al*., 2005).

A sequência de aminoácidos difere significativamente de membros da família IMP e VIM, devido à inserção de 24 aminoácidos, logo após o sítio ativo. Esta inserção demonstrou ser muito flexível e funciona como um "loop", que atua, provavelmente, aumentando a ligação com β-lactâmicos e sua hidrólise (WALSH *et al*., 2005).

A epidemiologia atual das MBL mostra que o aumento de sua ocorrência é específico em cada país. Presumivelmente, esse fato acontece devido a múltiplos fatores, incluindo, uso e dosagem de antibióticos, e às práticas de cada hospital em relação ao isolamento de pacientes portadores de bactérias multirresistentes (QUEENAN; BUSH, 2007). Enquanto SPM-1 foi relatada somente no Brasil, e recentemente na Europa (EL SALABI *et al*., 2010), outros países da América do Sul, que têm relatado a presença de MBL, como Argentina, Chile, Venezuela e Colômbia, encontraram VIM-2, VIM-8 e VIM-11 em *P. aeruginosa* (QUEENAN; BUSH, 2007).

As MBL adquiridas, em sua maioria, são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeo. No entanto, $bla_{\text{SPM-1}}$ não é encontrado como cassete gênico, e sim, associado a uma sequência de inserção (IS*CR4*). Esse gene foi encontrado em

cromossomo e também plasmídeo granse em diferentes linhagens de *P. aeruginosa* (Figura 3) (TOLEMAN, BENNET, WALSH, 2006).

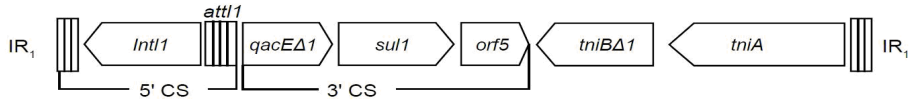

Figura 2. Estrutura esquemática de integron de classe 1. IR representam terminais de repetição invertidos. A região conservada 5' consiste em *intl1* e sítio *attl1*. A seta dos respectivos genes indica a direção de sua transcrição. A região conservada 3' consiste nos genes *qacEΔ1* (resistência a quaternário de amônio), *sul1* (resistência a sulfas) e *orf5* de função desconhecida, seguidos do módulo *tni*. Fonte: MENDES *et al*., 2006.

Figura 3. Contexto genético da IS*CR*4. Em amarelo IS*CR*4, em azul bla_{SMP-1} MBL, em verde um gene não relacionado à resistência. A seta dos respectivos genes indica a direção de sua transcrição. Fonte: TOLEMAN; BENNETT; WALSH, 2006.

1.4. O gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* é constituído por bacilos gram-negativos aeróbios estritos, retos ou levemente curvos; apresentam motilidade por meio de um ou mais flagelos polares; utilizam glicose e outros carboidratos por oxidação, na grande maioria são citocromo-oxidase positivas (HILL; HENRY; SPEERT, 2007) e produzem pigmentos hidrossolúveis, os quais se difundem em meios de cultura.

O gênero compreende grande número de espécies, sendo 25% mais relacionadas com infecções humanas, tendo *P. aeruginosa* como a principal delas. Na realidade, 70 a 80% dos bacilos gram-negativos não-fermentadores isolados de espécimes clínicos humanos correspondem à espécie *P. aeruginosa*, que está entre a maioria dos microrganismos

resistentes aos antibióticos responsáveis por infecções hospitalares (HILL; HENRY; SPEERT, 2007).

O aumento da prevalência de infecções hospitalares por *P. aeruginosa* multirresistente compromete muito a seleção adequada dos tratamentos, estando associada então, a taxas significativas de morbidade e mortalidade. Geralmente, essas infecções são difíceis de tratar devido à resistência natural desta espécie, bem como sua habilidade em adquirir mecanismos de resistência adicionais a múltiplos grupos de antibióticos. *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a agentes antimicrobianos não relacionados entre si devido a vários fatores, como a ocorrência natural de cefalosporinases, alteração da permeabilidade da membrana, e expressão constitutiva de várias bombas de efluxo (BONOMO, TOLMASKY, 2007).

Além disso, *P. aeruginosa* é extraordinariamente capaz de adquirir resistência a quase todos os antibióticos disponíveis, a partir da seleção de mutações em genes cromossômicos e devido ao aumento da prevalência de determinantes de resistência transmissíveis, em especial aqueles que codificam carbapenemases da classe B de Ambler, as MBL (GUTIÉRREZ *et al*., 2007).

1.5. Detecção de MBL

Em razão dos inúmeros relatos de bactérias produtoras de MBLs em diferentes regiões do mundo, houve a necessidade de desenvolver testes simples, práticos e de baixo custo, para tornar possível o rastreamento de bactérias produtoras de MBLs nos laboratórios de rotina microbiológica. As MBLs necessitam de íons divalentes, como o Zn^{++}, que funcionam como co-fator para a reação de hidrólise do β-lactâmico, portanto, estas enzimas podem ser identificadas por testes fenotípicos com auxílio de agentes quelantes de zinco, como o EDTA. Outro inibidor também utilizado em testes fenotípicos é o MPA, cuja ação se deve à sua capacidade de interferir na estrutura molecular da MBL (CROWDER *et al*., 1998).

Entre as metodologias possíveis, as mais utilizadas, são o teste de disco-aproximação e o Etest®. O primeiro faz uso de discos de antibióticos (geralmente uma cefalosporina e um carbapenêmico) dispostos em distâncias pré-determinadas de um disco contendo EDTA ou MPA. Se a bactéria for produtora de MBL, formará um halo de sinergismo entre os discos, denominado “ghost zone” ou zona fantasma.

Já o Etest® consiste em uma modificação da técnica de disco combinado; as fitas de Etest® são de plástico inerte, transparente e medem 50 mm de comprimento e 5 mm de

largura, nas quais, em uma de suas superfícies, está incorporado um gradiente de concentração perfeitamente estabilizado da droga a ser testada que irá se difundir através do ágar; esta metodologia também permite a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (LEE et al, 2003). Para pesquisa de MBL, em uma das extremidades da fita se encontra o antibiótico carbapenêmico, e na outra extremidade este mesmo antibiótico associado ao agente quelante EDTA (AB Biodisk).

Foi constatado que 41,3% das amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, isoladas de distintos hospitais brasileiros eram produtoras de MBL, evidenciando o problema da resistência a estes agentes e enfatizando a necessidade da realização de testes de detecção para este fenótipo de resistência em laboratórios de microbiologia (MENDES *et al*., 2005) para aplicação de medidas de controle de infecção por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos.

É importante ressaltar que *P. aeruginosa* possuem resistência intrínseca a vários antibióticos e possuem a habilidade de adquirir novos genes de resistência, como as MBLs, características que tornam as infecções causadas por essas bactérias praticamente intratáveis. Além disso, *P. aeruginosa* são bactérias que geralmente causam infecção oportunista, em pacientes que já possuem a saúde debilitada sendo, desta maneira, muito importante conhecer quais MBLs estão presentes no hospital, assim como conhecer a clonalidade das bactérias que carreiam estes genes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Caracterização genética e epidemiológica de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, produtoras de MBL, isoladas de pacientes hospitalizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) no período de abril a agosto de 2007.

2.2. Objetivos específicos

- Detecção fenotípica da produção de metalo-β-lactamases nos isolados estudados.

- Avaliação do inibidor de metalo-β-lactamase mais eficaz.

- Detecção molecular de genes responsáveis pela codificação de metalo-β-lactamases nos isolados estudados.

- Avaliação da relação entre a detecção fenotípica e molecular de metalo-β-lactamase.

- Estudo da clonalidade de linhagens estudadas.

- Determinação da freqüência de *P. aeruginosa* produtora de MBL.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Foram estudadas *P. aeruginosa* isoladas de pacientes atendidos no HCFMRP - USP, no período de abril a agosto de 2007. As bactérias foram coletadas de placas de cultivo de isolamento primário de exames bacteriológicos realizados mediante solicitações de rotina, no Laboratório de Microbiologia do HCFMRP- USP.

Cada bactéria possui um grupo de dados catalogados, fornecidos pelo aparelho de automação Vitek1 (Biomerieux), contendo: nome do paciente (sigla), amostra clínica, data de entrada no laboratório, clínica do hospital e número de registro do paciente no hospital (Anexo 1).

No período foi isolado um total de 292 *P. aeruginosa*, destes, 54 isolados resistentes aos carbapenêmicos imipenem e/ou meropenem ou à cefalosporina ceftazidima foram selecionados para os estudos fenotípicos e moleculares.

As linhagens-controle, suas características e o experimento em que foram utilizadas estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens-controle utilizadas no estudo

Linhagens-controle	*Característica*	*Experimento*
E. coli pyo Col 1 VIM-2[a]	Produz enzima da família VIM	PCR , CIM e DDS
E. coli pyo 12870 IMP-[a]	Produz enzima da família IMP	PCR , CIM e DDS
E. coli p 2381 SPM-1[a]	Produz enzima da família SPM	PCR , CIM e DDS
E. coli ATCC 25922	Valores de CIM conhecidos	CIM
Acinetobacter spp. SIM[b]	Produz enzima da família SIM	PCR
P. aeruginosa GIM[b]	Produz enzima da família GIM	PCR
P. aeruginosa ATCC 27853	Valores de CIM conhecidos	CIM
A. baumannii [a]	Produtora de OXA-23	PCR
K. pneumoniae [a]	Produtora de OXA-48	PCR
A. baumannii [a]	Produtora de OXA-58	PCR
K. pneumoniae [a]	Produtora de KPC	PCR

[a] Linhagem gentilmente cedida pelo Professor Dr. Laurent Poirel, Hospital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, França.
[b] Linhagem Gentilmente cedida pela Professora Dr. Ana Cristina Gales, Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3.2. Identificação bacteriana

A identificação dos isolados foi realizada por provas fenotípicas convencionais e/ou por automação utilizando o aparelho Vitek1 (Biomerieux), no Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

3.3. Armazenamento das bactérias

P. aeruginosa foram semeadas em ágar MacConkey (Oxoid, Inglaterra), para verificar a pureza da cultura. Em seguida, foram semeadas em ágar Müller-Hinton (Oxoid) e cultivadas por 18 a 24 horas a 37ºC, sendo, então, transferidas para caldo BHI com glicerol a 15% e mantidas constantemente a -80º C. Para reativação gradativa do metabolismo bacteriano, confirmação da pureza e viabilidade das colônias, alíquotas das culturas estocadas foram cultivadas novamente em BHI, incubadas a 37ºC, durante 18 – 24 horas e depois foram transferidas para ágar MacConkey (Oxoid, Inglaterra) antes de serem submetidas aos experimentos.

3.4. Teste de sensibilidade aos antibióticos

3.4.1. Difusão em ágar

O teste de sensibilidade aos antibióticos foi realizado por disco difusão de acordo com o padronizado pelo CLSI, 2007, e/ou por automação (através da técnica de microdiluição) utilizando o aparelho Vitek1 (Biomerieux), no Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

3.4.2. Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos imipenem, meropenem, ceftazidima, cefepime e polimixina B foi realizada utilizando fitas de Etest® seguindo orientação do fabricante. Para a polimixina B a CIM foi realizada também pela técnica da microdiluição em caldo, de acordo com as normas do CLSI, 2010.

3.5. Detecção fenotípica de MBL

3.5.1. Aproximação de Disco

De modo geral, a metodologia consiste na inoculação da bactéria em uma placa contendo ágar Müller-Hinton conforme o padronizado pelo CLSI para realização do teste de sensibilidade aos antibióticos por disco difusão (CLSI, 2005). Em seguida, 2 discos, um com ceftazidima (30 µg) (Oxoid) e outro com imipenem (10 µg) (Oxoid), foram posicionados sobre o ágar ao lado de um disco esterilizado de papel-filtro contendo 3 µL de MPA e outro contendo 10 µL de solução EDTA 0,1 M, em distâncias pré-determinadas, 20mm para o disco de MPA e 15mm para o disco de EDTA (Figura 4), porém para as amostras negativas ou em que houve dificuldade para a interpretação dos resultados, a distância entre os discos foi modificada (aumentada ou diminuída) de acordo com a necessidade observada em cada caso. Os discos de EDTA e MPA foram preparados no dia do teste e aplicados nas placas somente após sua secagem. Em amostras produtoras de MBL foi observada distorção e ampliação do halo de inibição de crescimento de bactéria-teste na região do ágar onde ocorreu a difusão do agente quelante. Já, em testes negativos, não espera-se alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria testada.

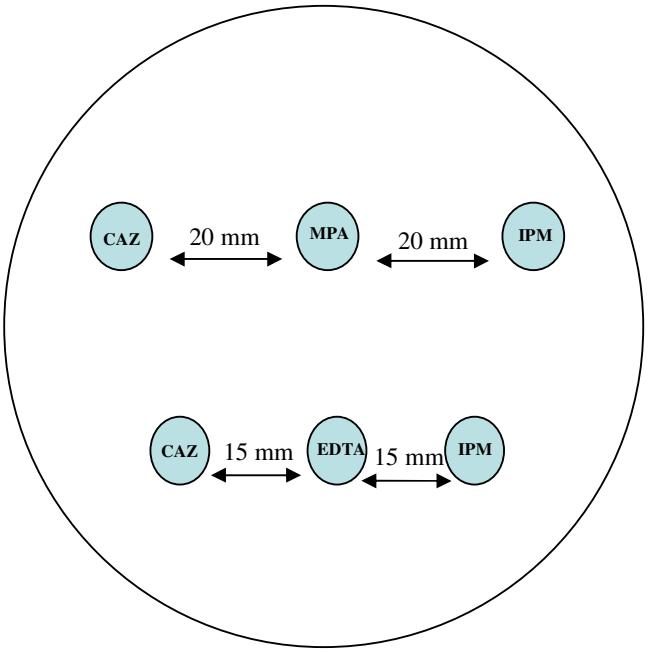

Figura 4 - Esquema para a aplicação dos discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM), EDTA e MPA.

3.6. Detecção molecular de MBL

3.6.1. Extração de DNA genômico bacteriano

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o método de Gianni-Rossolini (ROSSOLINI et al, 1993). Os microrganismos foram cultivados durante aproximadamente 18 horas em caldo BHI utilizando-se tubos tipo *eppendorf*. Os tubos contendo o caldo BHI foram centrifugados a 20.000 G (Centrífuga *Eppendorf* 5804 R) durante 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso com a solução 1 (sacarose 20%, Tris HCl 1M pH 8 e EDTA 0,5 M) resfriada a 6-8 ºC e incubado, em gelo, durante 10 minutos. Após esse período foi adicionada a solução 2 (NaCl, 1% de sarcosil e proteinase K), misturada por inversão e os tubos foram incubados em banho de água, por 2 horas, a 50 ºC. Após este período foi adicionada solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos foram centrifugados por 10 minutos. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo no qual foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram centrifugados novamente, a 20.000 G, durante 10 minutos. Foi coletado o sobrenadante, e transferido para um novo tubo no qual foi adicionado etanol, resfriado a 6-8 ºC, que foi misturado por inversão. Os tubos foram mantidos a -20 ºC, durante, aproximadamente, 18 horas e depois foram centrifugados durante 15 minutos, a 4 ºC. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi seco em *Speed-Vac* (Eppendorf) a 60 ºC. Em seguida, o sedimento foi suspenso em água W-3500 (Sigma) adicionando-se RNase (Invitrogen) e deixado no banho de água, durante 20 minutos, a 37 ºC.

A quantificação e avaliação da pureza do DNA foi analisada em espectrofotômetro de luz ultravioleta com comprimentos de onda (λ) de 260nm e 280nm utilizando o aparelho Gene Quant (Amersham Pharmacia Biotech), sendo a concentração do DNA fornecida em µg/mL. O DNA foi diluído em água W-3500 (Sigma) à concentração de 30ng/µL e armazenado a -20 ºC.

3.6.2. Amplificação dos fragmentos do DNA

A detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamases bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{SPM}, bla_{GIM} e bla_{SIM}, carbapenemases bla_{KPC} e bla_{OXA-23}, bla_{OXA-48} e bla_{OXA-58}, foi feita por PCR. Foram utilizados pares de *primers*, específicos para cada família de genes que codificam diferentes MBL, conforme exposto na Tabela 2.

Tabela 2. Pares de *primers* utilizados

Primers	Seqüência (5'- 3')	Fragmento do gene a ser amplificado	Tamanho (pb)	Temperatura de *annealing*	Referência
SPM-P1f SPM-P2r	GAACTCACCTAAATCGAGAGCC CTACAGTCTCATTTCGCCAACG	SPM-1	829	60ºC	CLÍMACO*, comunicação pessoal
VIM-P1f VIM-P2r	GTTATTGGTCTATTTGACCGCG CTACTCAACGACTGAGCGATTT	VIM-2,-3,-6,-8, -9,-10,-11,-18	781	58ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
VIM-P3f VIM-P4r	GGTCTACATGACCGCGTCTGT CTACTCGGCGACTGAGCGATT	VIM-1,-4,-5,-14	775	61ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
VIM-P5f VIM-P6r	CGATGGYGTTTGGTCGCATAT GAATGCGCAGCACCAGGATA	VIM-7,-12,-13	390	58ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
GIM-F GIM-R	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACTTTGCCATGC	GIM-1	477	59ºC	Ellington et al, 2006
IMP-P1f IMP-P2r	CGAGAAGCTTGAAGAAGGTGTT CGGACTTTGGCCAAGCTTCTA	IMP-2,-8,-13, -19,-20,-24	512	61ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
IMP-P3f IMP-P4r	GAAGTTAACGGGTGGGGCGTT CCTTTAACCGCCTGCTCTAATG	IMP-1,-3,-4,-6, -10	578	59ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
IMP-P5f IMP-P6r	GACAGTACGGSTGGAATAGAG CCTTTAACAGCCTGCTCCCA	IMP-12,-14,-18	407	59ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
IMP-P7f IMP-P8r	GTAGCATTACTGCCGCAGGA GTAAGCTTCAAGAGCGACGCA	IMP-11,-16, -21,-22	643	60ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
IMP-P9f IMP-P10r	CCTAAACACGGCTTGGTGGTT GCCAAACCACTACGTTATCTGG	IMP-5,-7,-9,-15	349	56ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
SIM-F SIM-R	TACAAGGGATTCGGCATCG TAATGGCCTGTTCCCATGTG	SIM-1	570	57ºC	Ellington et al, 2006
KPC-F KPC-R	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG GTTGACGCCCAATCCCTCGA	KPC	860	61ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
OXA-23-F OXA-23-R	AAGCATGATGAGCGCAAAG AAAAGGCCCATTTATCTCAAA	OXA-23	1066	54ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
OXA-48-F OXA-48-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	OXA-48	744	55ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal
OXA-58-F OXA-58-R	TTATCAAAATCCAATCGGC TAACCTCAAACTTCTAATTC	OXA-58	934	45ºC	CLÍMACO, comunicação pessoal

*Dados do projeto de doutorado de Eduardo Carneiro Clímaco, em andamento (LEBEM-FCFRP-USP).

3.6.2.1. Condições para a reação de amplificação

A PCR foi realizada utilizando os seguintes componentes para o volume de reação de 50µL, Tabela 3:

Tabela 3. Componentes para a reação de PCR

Componentes	Quantidade final
Produto da extração de DNA	60 ng
Solução tamponante para PCR de Alta Fidelidade [a]	1X
Mistura dos 4 nucleotídeos – dNTP [b]	0,2 mM
Primer	25 pmol
Taq-DNA polimerase [a]	0,625 U
$MgCl_2$	2 mM
Água duplamente processada "Qualidade PCR"[c]	q.s.p. 50 µL

[a] Plantinum ® taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen – Life Technologies)
[b] dNTP Set (Eppendorf)
[c] W-3500 (Sigma)

O DNA foi inicialmente desnaturado, por aquecimento, a 95ºC, por 5 minutos. Em seguida a reação foi submetida a 30 ciclos térmicos das etapas de desnaturação, *annealing* e extensão, nas seguintes condições:

- Desnaturação – 1 minuto a 95 ºC;
- *Annealing* – 1 minuto à temperatura de *annealing* específica de cada par de *primer* (Tabela 2);
- Extensão – 1 minuto a 72 ºC;

Após os 30 ciclos foi procedida uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 ºC.

O termociclador utilizado para os experimentos foi o *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf).

3.6.2.2. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. A estes produtos, foram adicionados 10 µL de solução de azul de bromofenol (33% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol em solução tamponante TBE (0,5X) e aplicados no gel de agarose. O marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas) foi aplicado no gel para a comparação com o tamanho dos fragmentos amplificados. A eletroforese foi realizada a 5 Volts/cm durante 120 minutos.

Depois da eletroforese completa o gel foi corado com brometo de etídeo (1µg/mL) por 20 minutos. Em seguida foi observado sob a luz ultravioleta e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager (Alpha Innotech).

3.7. Seqüenciamento

Os produtos amplificados foram purificados com o *kit* de purificação GFX-TM PCR (GE) para sequenciamento.

Os fragmentos obtidos por PCR foram seqüenciados para determinar a seqüência de cada gene, além de possíveis mutações nos genes estudados. Para a etapa de amplificação, foram utilizados 1,0µL de produto de PCR, 0,8µL de *primer* (16pmol/µL), 4,0µL da solução de ET Dye Terminator (Kit DYEnamic™ ET Dye Terminator, Amersham Bioscience) e água W-3500 (Sigma) suficiente para completar o volume final de 10,5µL. Em seguida, foi realizado o seguinte ciclo de amplificação, que foi repetido 30 vezes:

- Desnaturação: 20 segundos a 95 ºC;
- *Annealing*: 15 segundos a 50 ºC;
- Extensão: 1 minuto e 20 segundos a 60 ºC;

Em seguida o produto amplificado foi precipitado com acetato de amônio 7,5M e etanol 95% e então sequenciado no MegaBACE™ (GE). As seqüências obtidas foram analisadas no programa ChromasPro versão 1.33 (technelysium Pty Ltd) e comparadas às sequências disponíveis no banco de dados *GenBank*.

3.8. Eletroforese em campo pulsado

Foi analisado o perfil de macrorrestrição das 35 linhagens de *P. aeruginosa* com teste fenotípico positivo para MBL, por eletroforese em campo pulsado (PFGE), com a finalidade de verificar a relação clonal entre elas.

A PFGE foi realizada usando fonte EPS600 e aparelho Gene Navigator (Pharmacia Biotech). Uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubada a 37º C durante 24 horas. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo *eppendorf* e centrifugada por 2 minutos a 15.000 G. As células bacterianas foram lavadas com 500µL da solução PIV (10mM Tris, pH 8,0, 1,0M NaCl), centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 200 µL de solução de suspensão sendo 150 µL transferidos para um novo tubo, colocados em banho de água a 48ºC, durante 5 a 10 minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure, Gbco BRL) para a confecção dos blocos de agarose.

Os blocos de agarose foram colocados em tubos contendo solução de lise (6 mM Tris, pH 8,0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8,0; 0,2% deoxycolato de sódio, 0,5%, 0,5% N-laurylsarcosine), acrescentando-se RNase à concentração final de 20 µg/mL e incubadas durante 4 a 5 horas a 37º C. Em seguida a solução tamponante foi retirada, e foi adicionando 1mL de solução tamponante ES (EDTA, pH9,0; sarcosil 1%) acrescida de 1 mg/mL de proteinase K e os tubos foram incubados a 50º C durante 18 a 24 horas. Os discos foram lavados 5 vezes com 13mL da solução tamponante TE 1X (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH8,0) com intervalo de 30 minutos para cada lavagem. Os discos foram mantidos em solução tamponante TE, a 4º C, até o momento do uso.

Para a fragmentação do DNA, cada disco foi colocado em 100 µL de solução tamponante 1X concentrada da enzima *Spe*I e mantida a 37º C por 30 minutos. Essa solução foi desprezada e uma nova solução, preparada no momento do uso, acrescida de 27 U de enzima de restrição *Spe*I (Fermentas) foi adicionada. A reação foi incubada em banho de água a 37º C por 18 a 20 horas.

Para a corrida eletroforética, foram preparados 150 mL de gel de agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Gibco BRL) em TBE 0,5X (0,89 M Tris; 0,89 M ácido bórico; 0,25 M EDTA; pH 8,0). A eletroforese foi realizada em TBE 0,5X à temperatura de 14º C em voltagem de 164 V por 22 horas. Os pulsos foram de 5 segundos durante 20 horas e 15 segundos durante 1 minuto.

Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo a 1μg/mL, por 30 minutos, e descorado em água por mais 30 minutos, sendo, em seguida, observado e fotografado utilizando o sistema AlphaImager® (Alpha Innotech).

O perfil eletroforético de macrorrestrição foi analisado utilizando o programa BioNumerics versão 5.01 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética dos isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice e dendrogramas foram constituídos segundo o método UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Isolados com similaridade genética superior a 90% foram considerados do mesmo tipo clonal.

4. RESULTADOS

No período de abril a agosto de 2007, foram isoladas 292 *P. aeruginosa* no HCFMRP-USP. Deste total, 54 foram resistentes aos carbapenêmicos e/ou ceftazidima e selecionados para o estudo. Destes 54 isolados de pacientes diferentes, 21 (38,89%) foram provenientes de urina, 10 (18,52%) de escarro, 5 (9,26%) de cateter, 5 (9,26%) de sangue e 13 (24,07%) de outros sítios.

4.1. Detecção fenotípica de metalo-beta-lactamases

De 54 *P. aeruginosa* analisadas, 24 apresentaram teste fenotípico positivo para produção de MBL (triagem por disco-aproximação) sendo presuntivamente consideradas produtoras de MBL. Posteriormente, foram analisadas por PCR para determinar possíveis genes envolvidos na produção das MBL.

Os espécimes clínicos dos quais foram isoladas as 54 bactérias selecionadas para o estudo e as 24 presuntivamente produtoras de MBL estão demonstrados na Figura 5 e Tabela 4.

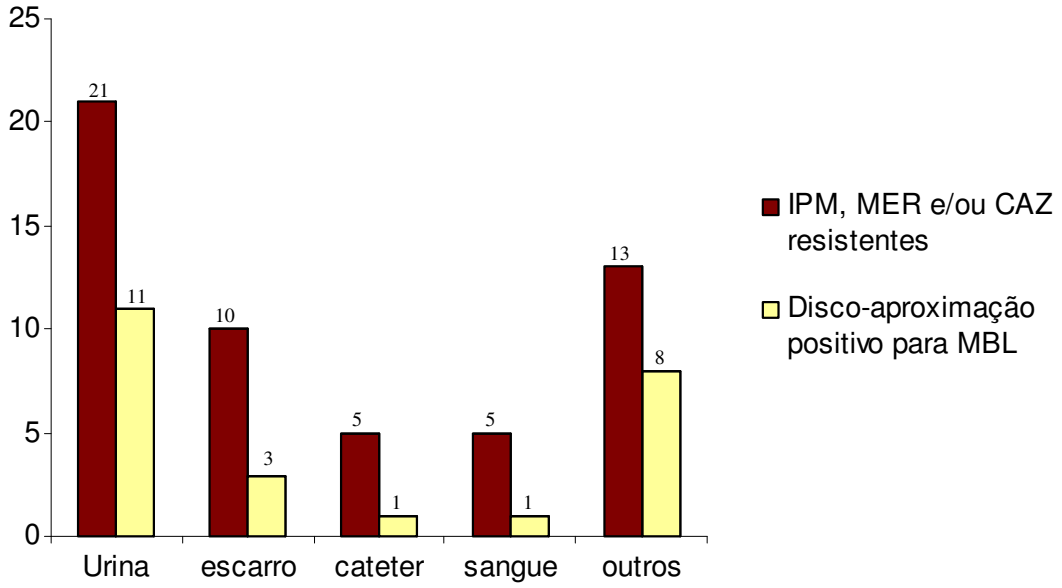

Figura 5. Número de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem (IPM), meropenem (MER) e/ou ceftazidima (CAZ) e o número de amostras prováveis produtoras de MBL isoladas por espécime clínico.

A Figura 6 mostra a distribuição das 24 *P. aeruginosa* por clínica do HCFMRP-USP.

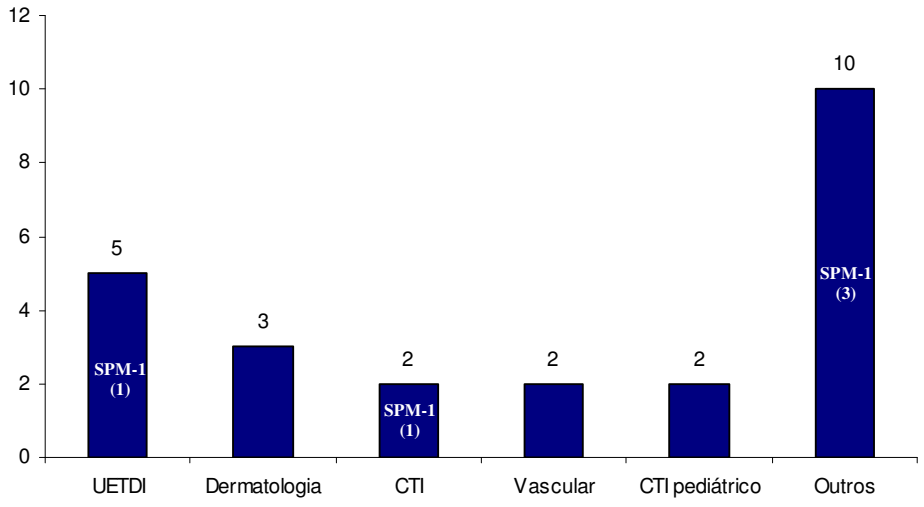

Figura 6. Porcentagem dos isolados presuntivamente produtores de MBL por clínica do HCFMRP-USP. As clínicas onde foram detectados isolados produtores de MBL estão identificadas pela sigla SPM-1 referente ao gene bla_{SPM-1}. UETDI – Unidade de Emergência de Doenças Infecciosas, CTI – Centro de Terapia Intensiva.

Das 24 amostras *P. aeruginosa* positivas para MBL pelo teste de aproximação de disco, todas (100%) foram positivas utilizando EDTA e 8 (33,33%) foram positivas utilizando MPA.

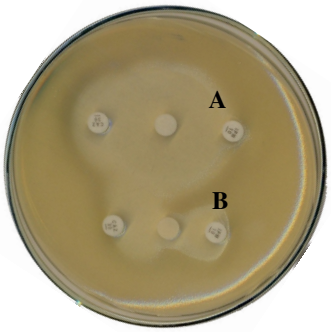

Figura 7. Teste de aproximação de discos. **A** - utilizando como inibidor o MPA. **B**- utilizando como inibidor o EDTA.

4.2. Detecção molecular de metalo-beta-lactamase

As 24 bactérias que apresentaram teste de disco-aproximação positivo foram submetidas à PCR com *primers* para os genes bla_{SPM}, bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{GIM}, bla_{SIM}, bla_{KPC}, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-48}, bla_{OXA-58}. Cinco apresentaram fragmento de tamanho correspondente a 829 pb, esperado para o gene bla_{SPM}, porém para os demais genes pesquisados nenhum fragmento foi amplificado.

4.3. Seqüenciamento

O fragmento acima mencionado, encontrado nas linhagens *P. aeruginosa* HC58/07, HC84/07, HC103/07, HC289/07 e HC371/07 foi seqüenciado e comparando os resultados do seqüenciamento com a sequência disponível no *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Genbank), o gene encontrado nas amostras apresentou 100% de identidade com o gene bla_{SPM-1} (número de acesso AY341249).

4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Os valores da CIM, dados pelo Etest®, de cada antibiótico testado para as bactérias que apresentaram o gene bla_{SPM-1} estão demonstrados na Tabela 4. A interpretação dos valores de CIM obtidos foi baseada nas padronizações do CLSI (2010).

Todas as linhagens de *P. aeruginosa* demonstraram CIM elevada aos carbapenêmicos imipenem e meropenem, à ceftazidima e ao cefepime, porém todas apresentaram sensibilidade ao aztreonam. O resultado da CIM para polimixina B está demonstrado na Tabela 5, comparando os resultados obtidos através do Etest® e da microdiluição em caldo.

Tabela 4. Dados gerais das linhagens e resultados dos estudos fenotípicos e moleculares para detecção de resistência por produção de MBL

Isolados *P. aeruginosa*[a]	Data de isolamento	Clínica[b]	Amostra clínica	Detecção fenotípica DDS[c]		gene *bla*[d]	PFGE[e] *Spe*I	Determinação da CIM[f] (µg/mL)					
				EDTA	MPA			IMP	MER	CAZ	AZT	CPM	POL
HC 32/07	17/04/2007	Gastroenterol.	Urina	+	-	-	A1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 65/07	19/04/2007	Vascular	Pele	+	+	-	M	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 68/07	20/04/2007	Mol. infecciosas	Cateter	+	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 58/07	**24/04/2007**	**UETDI**	**Urina**	**+**	**-**	**SPM-1**	**C1**	**>32**	**>32**	**>256**	**6**	**>256**	**3**
HC 88/07	02/05/2007	Pediatria	Escarro	+	-	-	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 84/07	**05/05/2007**	**Proctologia**	**Urina**	**+**	**+**	**SPM-1**	**B1**	**>32**	**>32**	**>256**	**4**	**>256**	**6**
HC 102/07	09/05/2007	SADT	Urina	+	-	-	D	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 103/07	**09/05/2007**	**Geriatria**	**Pleura**	**+**	**-**	**SPM-1**	**B2**	**>32**	**>32**	**>256**	**6**	**>256**	**1**
HC 148/07	24/05/2007	Urologia	Urina	+	-	-	D	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 179/07	31/05/2007	Dermatologia	Úlcera	+	-	-	H	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 198/07	04/06/2007	CTI pediatria	Secr. Traqueal	+	-	-	O	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 197/07	06/06/2007	TR. Renal	Swab de úlcera	+	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 211/07	11/06/2007	Dermatologia	Swab de úlcera	+	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 243/07	26/06/2007	Neurologia	Urina	+	-	-	J	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 264/07	27/06/2007	CTI pediatria	Lav. Br. alveolar	+	+	-	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 289/07	**07/2007**	**CTI**	**Urina**	**+**	**-**	**SPM-1**	**A**	**>32**	**>32**	**>256**	**2**	**>256**	**2**
HC 313/07	16/07/2007	Vascular	Urina	+	+	-	G	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 312/07	17/07/2007	Nefrologia	Urina	+	+	-	L	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 336/07	23/07/2007	Fibrose cística	Escarro	+	-	-	E1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 345/07	25/07/2007	Dermatologia	Pele	+	-	-	I	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 367/07	06/08/2007	UETDI	Urina	+	+	-	C2	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 371/07	**09/08/2007**	**Tr. fígado**	**Urina**	**+**	**+**	**SPM-1**	**A**	**>32**	**>32**	**>256**	**4**	**>256**	**2**
HC 385/07	15/08/2007	UETDI	Escarro	+	-	-	E2	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HC 402/07	22/08/2007	UETDI	Urina	+	+	-	F	NR	NR	NR	NR	NR	NR

[a] Destacados em negrito: apresentam gene SPM-1, vermelho: resistente, azul: intermediário, verde: sensível
[b] UETDI: Unidade de Emergência e Tratamento de Doenças Infecciosa / CTI: Centro de Terapia Intensiva / SADT: Serviço de Apoio Diagnóstico e Tratamento
[c] +: positivo / -: negativo
[d] Pesquisa para os genes bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{SPM}, bla_{GIM}, bla_{SIM}, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-48}, bla_{OXA-58} e bla_{KPC}
[e] NR: Não realizado
[f] IPM: imipenem; MER: meropenem; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; CPM: cefepime; POL: polimixina B; CIM: Concentração Mínima Inibitória

4.5. Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

De 24 *P. aeruginosa* positivas no teste de aproximação de disco, 21 foram tipadas pela PFGE. Os perfis de macrorrestrição do DNA genômico destes 21 isolados estudos foram caracterizados após digestão utilizando a enzima de restrição *Spe*I e submetidos a PFGE. A análise das bandas foi realizada utilizando o programa Bionumerics gerando um dendrograma apresentado na Figura 8 e Apêndice 1. Não foi possível determinar o perfil de macrorrestrição de 3 *P. aeruginosa*, devido à degradação do DNA, após várias tentativas.

De acordo com o dendrograma construído a partir do perfil de macrorestrição dos isolados (Figura 8) e utilizando como critério similaridade superior a 90% (tracejado azul), foram visualizados 15 perfis de PFGE. As linhagens foram separadas de acordo com o perfil PFGE: A (3 isolados), B (2 isolados), C (2 isolados), D (2 isolados), E (2 isolados), F (1 isolado), G (1 isolado), H (1 isolado), I (1 isolado), J (1 isolado), L (1 isolado), M (1 isolado), N (1 isolado), O (1 isolado) e P (1 isolado).

No perfil de PFGE A ficaram agrupados 3 isolados, sendo dois deles, *P. aeruginosa* HC289/07 e HC371/07, produtores de SPM-1. Estes dois isolados são provenientes de mesmo espécime clínico, urina, porém de clínicas diferentes, CTI e Unidade de Transplante de Fígado, respectivamente. Possuem 100% de similaridade entre si, e aproximadamente 93% de similaridade com HC 32/07, que não possui o gene $bla_{\text{SPM-1}}$.

No perfil de PFGE B ficaram agrupados 2 isolados sendo que ambos são produtores de SPM-1. Estes isolados são provenientes de espécimes clínicos e clínicas diferentes, e possuem 96,7% de similaridade entre si.

No perfil de PFGE C ficaram agrupados 2 isolados, sendo um deles, HC 58/07, produtor de SPM-1. Este isolado possui 97% de similaridade com HC 367/07, que não é produtora de SPM-1.

As demais linhagens não são produtoras de SPM-1, e possuem pelo menos 60% de similaridade entre si.

Em síntese, no HCFMRP, no período estudado, foram encontradas 3 clones de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, com similaridade de 84% entre si, totalizando 5 isolados, disseminadas em 5 clínicas diferentes, porém a amostra clínica predominante foi a urina, com 4 isolados.

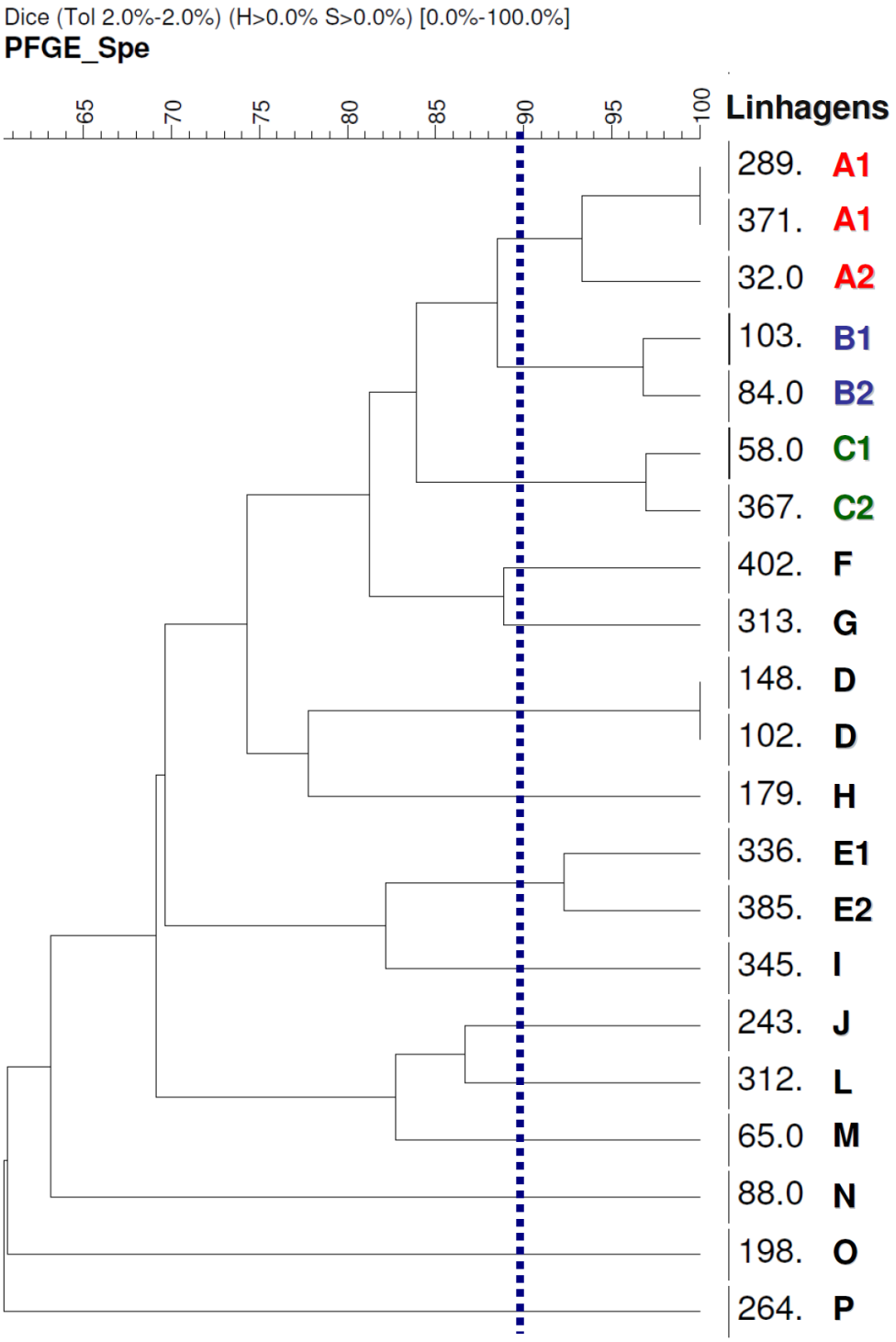

Figura 8. Dendrograma de similaridade de Dice gerado pelo método UPGMA utilizando o programa BioNumerics a partir do perfil de macrorrestrição do crDNA clivado com enzima *Spe*I apresentado na PFGE. As linhagens estão representadas por letras maiúsculas do alfabeto, e as destacadas em vermelho, azul e verde representam os clones nos quais estão os produtores de SPM-1.

5. DISCUSSÃO

P. aeruginosa produtoras de MBL têm sido relatadas como importante causa de infecções hospitalares. O aparecimento das MBL e sua disseminação entre bactérias patogênicas são questões de grande importância no que diz respeito ao futuro da terapêutica antimicrobiana (MARRA *et al*., 2006).

A detecção precoce desses genes poderia contribuir para o controle de disseminação de isolados multirresistentes. Métodos fenotípicos de triagem, apesar de simples de executar e baratos, têm mostrado resultados discordantes dependendo da metodologia utilizada, dos antibióticos aplicados como substratos, dos inibidores de MBL utilizados e das bactérias testadas. Os testes fenotípicos utilizados para detectar isolados produtores de MBL devem ser baseados no gênero bacteriano a ser testado, independentemente de qual enzima é produzida por esses isolados (PICÃO *et al*., 2008).

Dos 24 isolados de *P. aeruginosa* considerados produtores de MBL pelo teste fenotípico (aproximação de disco utilizando EDTA), apenas 5 apresentaram o gene $bla_{\text{SPM-1}}$ quando submetidos à PCR e ao sequeciamento.

Nesse estudo, pelo teste fenotípico de aproximação de disco utilizando MPA e EDTA , o inibidor que mostrou melhor sensibilidade (100%) foi o EDTA, porém apresentou baixa especificidade (37,14%) em relação às MBL pesquisadas. Picão *et al*. (2008) encontraram resultado diferente, o melhor inibidor de MBL para o mesmo teste fenotípico com *P. aeruginosa* foi o MPA. Além disso, a zona fantasma foi visualizada mais facilmente com o uso do EDTA, pois, seu halo de inibição é menor que o do MPA que, sozinho, produz grandes halos de inibição (Figura 7). Atualmente, a tendência é retirar da rotina produtos de toxicidade maior, como é o caso do MPA, diminuindo riscos para o meio ambiente e para os profissionais.

Apesar de 24 *P. aeruginosa* apresentarem teste fenotípico positivo no nosso estudo, a especificidade do EDTA como inibidor de MBL foi baixa para as MBL pesquisadas, como apresentado acima. A utilização do EDTA tem sido discutida por possuir efeito na permeabilidade da membrana bacteriana, aumentando a sensibilidade a vários antimicrobianos e gerando resultados falso-positivos, o que poderia explicar a baixa especificidade do teste de disco-aproximação quando o EDTA foi utilizado (PICÃO *et al*., 2008).

Na Figura 5 está representado o número de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, meropenem e/ou ceftazidima em relação ao número de amostras positivas no teste de disco-aproximação para a pesquisa de MBL, isoladas por espécime clínico. Das 5 amostras

produtoras do gene bla_{SPM-1}, 4 são de urina, resultado que já era esperado, já que, o número de *P. aeruginosa* isoladas de urina foi bem maior do que em qualquer outro espécime clínico.

Na Figura 6, as clínicas que apresentaram maior número de isolados presuntivamente produtores de MBL foram UETDI e Dermatologia. É interessante observar que apesar da Dermatologia aparecer como a segunda em isolados DDS positivos, nenhum isolado produtor de MBL foi confirmado, e na UETDI em apenas 1 isolado foi identificado o gene bla_{SPM-1}.

Pelo PFGE observamos que *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 pertencem a 3 clones diferentes, com similaridade genética de no mínimo 84% (A e B possuem similaridade genética de 89%, A e B possuem similaridade de 84% com C). Todos os isolados pertencentes aos perfis clonais A e C são de urina, assim como *P. aeruginosa* HC84/07 do perfil clonal B. Na Tabela 4, na qual estão expostos os dados das linhagens estudadas, podemos observar que 4 das 5 *P. aeruginosa* produtoras de MBL foram isoladas de urina e 1 isolado de pleura.

É importante observar também que, com o perfil clonal A, estão agrupadas 3 linhagens, sendo que 1 delas não é produtora de SPM-1, assim como ocorre também com as linhagens com o perfil clonal C, das quais uma é produtora de SPM-1 e a outra não. Quatro linhagens com os perfis clonais A e B estão presentes em mais de uma clínica do hospital. Este fato nos indica que os clones produtores de SPM-1 estão disseminados pelo hospital. Apesar da existência de 3 clones distintos produtores de SPM-1, tais clones apresentam no mínimo 84% de similaridade entre si, indicando que estas linhagens são possivelmente originadas de um ancestral em comum. Provavelmente, essa linhagem ancestral era produtora de SPM-1 e sofreu adaptações gerando os 3 grupos clonais. Algumas dessas linhagens, perderam o gene bla_{SPM-1} durante o processo evolutivo, o que explicaria a existência de linhagens produtoras e não produtoras de SPM-1 com o mesmo perfil clonal.

É conhecida, no Brasil, a disseminação de um clone endêmico de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 chamado clone SP. Este clone vem sofrendo adaptações evolutivas naturais nos ambientes em que estão presentes (GALES *et al*., 2003) indicando que o ancestral em comum entre os 3 grupos clonais, avaliados neste estudo, poderia ser o clone SP e isso deveria ser investigado.

A maneira mais comum pela qual genes de resistência são trocados entre bactérias é a conjugação. Neste estudo foram feitos experimentos de conjugação utilizando como receptora *Escherichia coli* K12 C600 (dados não mostrados) para avaliar se o gene SPM-1 estaria presente em plasmídeo conjugativo, podendo assim ser transferido entre bactérias, porém, os resultados obtidos foram insatisfatórios e não foram obtidos transconjugantes através desta técnica. A falha na obtenção de transconjugantes pode ter ocorrido devido a vários fatores,

como por exemplo, as linhagens doadoras e a linhagem receptora serem de gêneros diferentes, ou por características intrínsecas ao plasmídeo que, ainda não foi confirmado ser conjugativo ou não.

A presença dessas linhagens produtoras de MBL em urina deve-se, possivelmente, ao fato de que os pacientes infectados poderiam possuir algum tipo de patologia crônica ou terem sido submetidos a procedimentos hospitalares invasivos, como a inserção de cateteres, já que os isolados provêem de clínicas como CTI e Unidade de Transplante de Fígado, por exemplo.

Os dados desse estudo são de extrema importância para que a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) possa aplicar medidas e cuidados para evitar a disseminação da resistência. A disseminação das linhagens produtoras de SPM-1 no hospital exige atenção especial sendo importante observar se os cuidados para a prevenção de inecção estão sendo tomados, como a lavagem correta das mãos, uso de luvas esterilizadas e não-esterilizadas de maneira adequada, aplicação e manutenção correta de cateteres, cuidados pré-, intra- e pós-operatórios e esterilização do instrumental hospitalar.

Outro dado a ser observado, é que de 54 *P. aeruginosa* selecionadas para o estudo, apenas 5 são produtoras de SPM-1 (MBL). Alguns fatores devem ser considerados para explicar a resistência destas bactérias aos carbapenêmicos e à ceftazidima na ausência de carbapenemases. QUALE e colaboradores, ressaltam que, na ausência de uma carbapenemase eficiente, a resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode ser conseqüência de uma associação entre hiper-produção de AmpC, perda de porina OprD e expressão aumentada de bomba de efluxo MexAB-OprM. O achado mais consistente em isolados resistentes aos carbapenêmicos tem sido a perda de OprD. No entanto, o aumento da expressão de AmpC tem um pequeno efeito sobre o meropenem. Meropenem é um conhecido substrato do sistema MexAB-oprM e o aumento da sua expressão pode causar vários efeitos sobre a sensibilidade a este antibiótico. Nesse estudo, ainda encontraram diminuição da expressão de *oprD* em todos os isolados resistentes, e a maioria das bactérias resistentes ao imipenem/meropenem apresentava também aumento da expressão de *ampC* e bombas de efluxo (QUALE *et al*., 2006).

Os valores altos de CIM encontrados para os antibióticos imipenem, meropenem, ceftazidima e cefepime, são característicos de bactérias produtoras de MBL. Na Tabela 4, podemos observar que os valores de CIM para o aztreonam estão próximos à concentração limite para considerar as linhagens sensíveis (menor ou igual a 8 μg/mL) CLSI, 2010. Esses valores próximos ao limite indicam que mecanismos adicionais de resistência aos β-lactâmicos podem estar presentes, como os discutidos acima. O acúmulo de determinantes de

resistência impõe uma grande limitação sobre as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por estes isolados.

Alguns isolados podem ainda produzir enzimas carbapenemases da família OXA que podem apresentar resultado positivo no teste de disco-aproximação, porém essa possibilidade foi descartada nas linhagens estudadas, pois todas foram submetidas à PCR para a pesquisa desses genes e o resultado foi negativo para todas (dados não mostrados).

A determinação da CIM para a polimixina B foi realizada também pelo método da microdiluição em caldo como o recomendado pelo CLSI (2010), para confirmar os resultados encontrados pelo Etest®. Os resultados apresentados (Apêndice 2) mostram que, para a maioria das linhagens, a diferença da CIM entre as duas técnicas foi de apenas uma diluição e quando essa diferença foi maior (duas diluições), nenhuma linhagem mudou seu perfil de sensibilidade como também foi observado por Heijden *et al.* (2007) . Observamos também que as condições informadas pelo fabricante para a realização do Etest®, devem ser seguidas rigorosamente, como o meio de cultura a ser utilizado, concentração do inóculo e tempo de leitura, para que os resultados sejam reprodutíveis.

Os resultados obtidos nesse estudo revelam o perfil da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* devido à produção de enzima MBL no HCFMRP no período estudado, bem como a disseminação de clones produtores de SPM-1 nesse hospital. É sabido que essa bactéria é o principal não-fermentador responsável por infecção hospitalar, e que esta espécie adapta-se rapidamente a condições ambientais diversas (HILL; HENRY; SPEERT, 2007). SPM-1 até pouco tempo atrás era uma enzima restrita ao Brasil e relacionada com um clone endêmico, porém recentemente foi identificado um isolado produtor desta enzima na Europa (POIREL *et al*., 2009). Com isso, estudos dessa natureza tornam-se cada vez mais importantes para identificar clones bacterianos e elementos de resistência disseminados no hospital, para que assim possam ser implantadas medidas de vigilância mais adequadas para conter a disseminação destas bactérias.

A frequência de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, entre os 54 isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou ceftazidima, no período de aproximadamente 4 meses, foi de 9,3%. Este valor mais o fato de não existir um clone predominante no hospital, indicam que as medidas aplicadas pela CCIH estão sendo eficientes, porém mesmo assim é preciso que a CCIH esteja sempre atenta a relatos de resistência aos carbapenêmicos, pois a presença de linhagens produtoras de MBL restringem muito as opções terapêuticas para infecções causadas por estas bactérias.

6. CONCLUSÕES

- A triagem fenotípica de MBL apresentou baixa correlação com a detecção molecular

- O inibidor de MBL mais eficiente na triagem fenotípica por disco-aproximação foi o EDTA

- Entre as MBL estudadas, apenas o gene $bla_{\text{SPM-1}}$ foi detectado

- Há 3 clones diferentes de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 no HCFMRP-USP disseminadas em 5 clínicas diferentes

- Não há um clone predominante no hospital.

- Entre os 54 isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou ceftazidima a frequência de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foi de 9,3%

7. REFERÊNCIAS[*]

[*] De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. v. 289, p. 321-331, 1980.

BONOMO, R.A; TOLMASKY, M. Enzyme-mediated resistance to antibiotcs: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. **American Society of Microbiology**: Washington, 2007.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. Functional classification scheme for β-lactamases and It's correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, p. 1211-1233, 1995.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene $bla_{\text{GIM-1}}$, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 12, p. 4654-4661, 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 9th Ed. Doc M7-A6, v. 23, n. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S17, v. 28, n. 1., 2007.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S20, v. 30, n. 1., 2010.

CROWDER, M.W.; WALSH, T.R.; BANOVIC, L.; PETTIT, M.; SPENCER, J. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-β-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, n. 4, p. 921-926, 1998.

EL SALABI, A.; TOLEMAN, M.A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T.; FREI, R.; WALSH, T.R. First reporto f the metallo-β-lactamase SMP-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 01, p. 582, 2010.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER,H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producting SPM metallo-β-lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

ELLINGTON, M.J.; KISTLER, J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 321-322, 2006.

GUTIÉRREZ, O.; JUAN, C.; CERCENADO, E.; NAVARRO, F.; BOUZA, E.; COLL, P.; PÉREZ, J.L.; OLIVER, A. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 12, p. 4329-4335, 2007.

HEIJDEN, I.M.V.D.; LEVIN, A.S.; PEDRI, E.H.D.; FUNG, L.; ROSSI, F.; DUBOC, G.; BARONE, A.A.; COSTA, S.F. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdiluition for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** v. 6, n. 8, p. 1-7, 2007

HILL, E.B.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. Pseudomonas In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L., PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, 2007, v. 1, Cap. 48, p. 734.

LAURETT, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 7. p. 1584-1590, 1999.

LEE, K.; LIM, Y.S.; YONE, D.; YUM, J.H.; CHONE, Y. Evaluation of Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4623-4629, 2003.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 47, n. 3, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE, D.M.; WILLIAMS, J.D. Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. V. 4. p. 502-578, 1996.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **TRENDS in Microbiology**. v. 14, n. 9, p. 413-420, 2006.

MARRA, A.R.; PEREIRA, C.A.P.; GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; CAL, R.G.R.; SOUZA, J.M.A.; EDMOND M.B.; FARO, C.; WEY, S.B. Bloodstream Infections with Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 50, n. 1, p. 388-390, 2006.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Metalo-β-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-β-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 38, n. 1, p. 71-78, 1994.

PELLEGINO, 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.W.; MOREIRA, B.M. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 7, p. 2420-2424, 2002.

PICÃO, R.C.; ANDRADE, S.S.; NICOLETTI, A.C.; CAMPANA, E.H.; MORAES, G.C.; MENDES, R.E.; GALES, A.C. Metallo-β-Lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-Producing Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 6, p. 2028-2037, 2008.

POIREL, L.; RODRIGUES-MARTINEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. Characterization of $bla_{\text{DIM-1}}$, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. In: Anais do 19th Europian Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Helsinki, Finlândia, Maio 16-19, 2009.

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of efflux system, *amp*C, and *opr*D expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n. 5, p. 1633-1641, 2006.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

ROSSOLINI, G.M.; MUSCAS, P.; CHIESURIN, A.; SATTA, G. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Salmonella typhi* gene cluster coding for type 1 fimbrial. **The biology of *Salmonella***. p. 408-412, 1993.

SEKIGUCHI, J-I.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; AKIYAMA-M, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-β-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52. , n. 11, p. 4194-4197, 2008.

TAVARES, W.; **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**, 2ª ed. Atheneu: São Paulo, 2001, cap. 14. p.359 .

TOLEMAN, M.A.; BENNETT, P.M.; WALSH, T.R. IS*CR* Elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.70, n. 2, p. 296-316, 2006.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J., JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMAN, P. Metallo-_-Lactamases: the Quiet before the Storm?. **Clinical Microbiology Reviews**. v.18, n. 2, p.306-325, 2005.

YONG, D.; BELL, J.M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. A novel sub-group metallo-β-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Austrália. In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47. 2007, Chicago. Annais … Washington: American Society for Microbiology, 2007.

YONG, D.; TOLEMAN, A.M.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T.R. Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, *bla*NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.