

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

***Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp.:  
PERFIL DE SENSIBILIDADE E DETECÇÃO DE  
METALO- $\beta$ -LACTAMASES NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Letícia Eichstaedt Mayer**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

*Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp.:  
**PERFIL DE SENSIBILIDADE E DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -  
LACTAMASES NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA  
MARIA**

**Letícia Eichstaedt Mayer**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para parcial para obtenção do grau de **mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dra. Rosmari Hörner**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

*Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp.:  
**PERFIL DE SENSIBILIDADE E DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -  
LACTAMASES NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

elaborada por  
**Letícia Eichstaedt Mayer**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Rosmari Hörner, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Pedro Alves d'Azevedo, Dr.** (UFCSPA)

**Marli Matiko Anraku de Campos, Dra.** (UFSM)

Santa Maria, 16 de março de 2011.

Dedico este trabalho e todo o meu amor a meus pais,  
pelo apoio incondicional em todas as escolhas da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À prof. Dra. Rosmari Hörner, minha orientadora, pela oportunidade, por dividir comigo suas experiências, pelo apoio e dedicação constantes. Minha sincera e eterna gratidão.

Aos meus pais, Elemar e Judite, e ao meu irmão, Leandro, pelo amor, educação, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

A toda minha família, especialmente Lindomar e Clarice, que me oferecem apoio e carinho inestimáveis.

À minha grande amiga, Mariana. Obrigado por você existir!

Ao Francisco, pelo amor e pelo carinho.

Aos amigos, colegas e alunos de iniciação científica do laboratório de microbiologia, pelo auxílio e companheirismo. Tenho plena certeza de que nada se faz sem a ajuda de muitos.

Às mestrandas Cláudia, Magda, Maísa e Rosiéli pelo convívio, apoio e incentivo.

Às minhas ‘pupilas’, Catiusca, Liliana, Silvana e Tassiane, alunas co-orientadas. Muito mais aprendi do que ensinei a vocês!

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, especialmente José e Adolfo, pelo apoio e pela amizade.

Ao prof. Alexandre e à bióloga Laisa do Laboratório de Biotecnologia e Genética da Universidade de Santa Cruz do Sul. E ao amigo Caio, pela colaboração na realização de uma etapa imprescindível do presente trabalho.

A toda a equipe do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria.

A todos aqueles que eu não citei e que deveria ter citado. Perdoem-me pela involuntária indelicadeza e aceitem meus sinceros agradecimentos.

É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores,  
Mesmo correndo o risco de perder tudo,  
Do que permanecer estático, como os pobres de espírito,  
Que não lutam, mas também não vencem;  
Que não conhecem a dor da derrota,  
Mas não têm a glória de ressurgir dos escombros.  
Esses pobres de espírito,  
Ao final da jornada na Terra,  
Não agradecem a Deus por terem vivido,  
Mas desculpam-se ante Ele,  
Por terem simplesmente passado pela vida.

*Robert Nesta Marley (Bob Marley)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

*Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp.:  
**PERFIL DE SENSIBILIDADE E DETECÇÃO DE METALO- $\beta$ -  
LACTAMASES NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

AUTORA: LETÍCIA EICHSTAEDT MAYER

ORIENTADOR: ROSMARI HÖRNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de março de 2011.

A produção das enzimas metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L) por alguns patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. desencadeia implicações clínicas e epidemiológicas muito importantes em virtude do número restrito de antimicrobianos realmente efetivos ao tratamento das infecções causadas por esses microrganismos. Um total de 114 isolados clínicos foi estudado, 92 *P. aeruginosa* e 22 *Acinetobacter* spp. Os testes efetuados foram: teste de sensibilidade a antimicrobianos, determinação da concentração inibitória mínima (CIM), testes fenotípicos para detecção de M $\beta$ L (disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge modificado), reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes de M $\beta$ L, *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub>. *Acinetobacter* spp. apresentou-se como patógeno oportunista multirresistente, sendo gentamicina o antimicrobiano que mostrou maior sensibilidade para este gênero. Elevada taxa de isolados de *P. aeruginosa* AmpC positivas foi encontrada, além de emergência da resistência à polimixina B, o que representa o início de um problema terapêutico em nossa Instituição. Através da PCR foi detectada a presença dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub> em 4,95 % e 8,91 % dos isolados clínicos, respectivamente. Todos os isolados que apresentaram o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> eram do gênero *Acinetobacter*. A ausência de novos agentes antimicrobianos para bacilos gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) multirresistentes e sua rápida propagação leva a falhas terapêuticas. Além disso, a presença de isolados produtores de M $\beta$ L no ambiente hospitalar representa um grave problema para o controle das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* spp.; Metalo- $\beta$ -Lactamases; *bla*<sub>SPM-1</sub>; *bla*<sub>IMP-1</sub>.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Posgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

***Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp.:**  
**SENSITIVITY PROFILE AND METALLO- $\beta$ -LACTAMASE**  
**DETECTION IN THE UNIVERSITY HOSPITAL OF SANTA MARIA**

AUTHOR: LETÍCIA EICHSTAEDT MAYER

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Presentation date: Santa Maria, March 16<sup>th</sup> 2011.

The production of metallo- $\beta$ -lactamases enzymes (M $\beta$ L) by some pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. clinical and epidemiological implications triggers very important because of the limited number of really effective antimicrobial treatment of infections caused by these microorganisms. A total of 114 strains were studied, 92 *P. aeruginosa* and 22 *Acinetobacter* spp. The tests were performed: antimicrobial susceptibility test, determination of minimum inhibitory concentration (MIC), phenotypic tests to detect M $\beta$ L (double-disk synergy test, combined disc test and modified Hodge synergy test and polymerase chain reaction (PCR) for detection of genes M $\beta$ L, and *bla*<sub>IMP-1</sub> *bla*<sub>SPM-1</sub>. *Acinetobacter* spp. presented as multidrug-resistant opportunistic pathogen, and gentamicin was the antibiotic that showed greater sensitivity to this genus. High rate of strains of *P. aeruginosa* AmpC positive was found, and the emergence of resistance to polymyxin B, which represents the beginning of a therapeutic problem in our institution. We detected, by PCR, the presence of genes *bla*<sub>IMP-1</sub> *bla*<sub>SPM-1</sub> and at 4.95% and 8.91% of strains, respectively. All strains with the gene *bla*<sub>IMP-1</sub> were from the *Acinetobacter* genus. The lack of new antimicrobial agents for gram-negative non-fermenters (GN-NF) and its rapid spread multiresistant leads to therapeutic failures. Moreover, the presence of strains producing M $\beta$ L in hospitals represents a serious problem for the infection control committee.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* spp.; Metallo- $\beta$ -Lactamases; *bla*<sub>SPM-1</sub>; *bla*<sub>IMP-1</sub>.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

Figura 1.....	25
Figura 2.....	28
Figura 3.....	29
Figura 4.....	30
Figura 5.....	31

### Manuscrito 3

Gráfico 1.....	67
Gráfico 2.....	68

## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito 2

Tabela 1.....	44
Tabela 2.....	45
Tabela 3.....	45
Tabela 4.....	46

### Manuscrito 3

Tabela 1.....	64
Tabela 2.....	65
Tabela 3.....	66

## LISTA DE QUADROS

### **Manuscrito 2**

Quadro 1 .....	46
----------------	----

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo A – Registro no Comitê de Ética em Pesquisa .....	84
Anexo B – Carta de Apresentação do Manuscrito 1 .....	85
Anexo C – Carta de Aceite do Manuscrito 1 .....	86
Anexo D – Resumos Publicados em Anais de Congressos .....	87

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Técnica da Microdiluição em Caldo – Antimicrobiano Polimixina B.....	90
Apêndice B – Solução EDTA 0,5M .....	92
Apêndice C – Solução MPA 1,4mM .....	93
Apêndice D – Protocolo de Extração de DNA por Fervura .....	94
Apêndice E – Protocolo de Extração de DNA com CTAB.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BGN-NF	bacilo gram-negativo não-fermentador
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	gene de metalo- $\beta$ -lactamase IMP-1
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	gene de metalo- $\beta$ -lactamase SPM-1
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	gene de metalo- $\beta$ -lactamase NDM-1
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	centímetros
CTAB	cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide
DA	disco aproximação
DC	disco combinado
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro estendido
GIM	German imipenemase
h	hora
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IMP	imipenemase
IM $\beta$ L	inibidor de metalo- $\beta$ -lactamase
IRAS	infecções relacionadas à assistência à saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
MPA	ácido 2-mercaptopropiônico
M $\beta$ L	metalo- $\beta$ -lactamase
NaCl	cloreto de sódio
NDM	New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase
ng	nanograma
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
primers	iniciadores
rpm	rotações por minuto
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> – sulfato dodecil de sódio
SIM	Seoul imipenemase
SN	sensibilidade
SP	especificidade
SPM	São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase
Taq polimerase	<i>Thermus aquaticus</i> polimerase
TE	Tris-EDTA

UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UI	unidades internacionais
UTI	unidade de terapia intensiva
UV	ultravioleta
VIM	Verona imipenemase
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo
µg	micrograma
µL	microlitro
pmol	picomol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	19
1.1.1 Objetivo geral .....	19
1.1.2 Objetivos específicos .....	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>2.1 Características gerais de <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.</b> .....	20
<b>2.2 O papel das <math>\beta</math>-lactamases na resistência bacteriana</b> .....	21
2.2.1 Surgimento da resistência às cefalosporinas de amplo espectro .....	22
2.2.2 Surgimento da resistência aos carbapenêmicos .....	22
<b>2.3 Metallo-<math>\beta</math>-lactamases</b> .....	23
2.3.1 Epidemiologia das M $\beta$ LS.....	23
2.3.2 Elementos genéticos móveis.....	24
2.3.3 Mecanismo de ação e inibidores de M $\beta$ LS .....	26
2.3.4 Detecção fenotípica de M $\beta$ LS .....	27
2.3.4.1 Teste de disco aproximação.....	27
2.3.4.2 Teste de disco combinado.....	28
2.3.4.3 Teste de Hodge modificado .....	29
2.3.4.4 Teste de microdiluição em caldo .....	30
2.3.4.5 <i>Etest</i> <sup>®</sup> M $\beta$ L .....	30
2.3.5 Detecção genotípica de M $\beta$ LS .....	31
2.3.6 Opções terapêuticas para as infecções por microrganismos produtores de M $\beta$ LS .....	32
2.3.6.1 Polimixinas .....	32
2.3.6.2 Agentes antimicrobianos combinados .....	34
<b>3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	35
<b>3.1 MANUSCRITO 1 – (<i>communication</i>) Evaluation of bacterial growth inhibition by mercaptopropionic acid in metallo-<math>\beta</math>-lactamase detection on multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i></b> .....	35
Abstract .....	36
Resumo .....	36
Conflict of interest .....	37
Financial suport .....	37
References.....	38
<b>3.2 MANUSCRITO 2 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.: produção de AmpC e ESBL e perfil de sensibilidade no Hospital Universitário de Santa Maria</b> .....	39
Resumo .....	39
Abstract .....	40
Introdução .....	41
Materiais e métodos.....	42
Resultados .....	43
Discussão .....	47
Considerações finais .....	50
Referências .....	51
<b>3.3 MANUSCRITO 3 – Detecção de M<math>\beta</math>L em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> spp.</b> .....	55

<b>Resumo</b> .....	55
<b>Abstract</b> .....	55
<b>Introdução</b> .....	56
<b>Material e métodos</b> .....	57
<b>Resultados e discussão</b> .....	61
<b>Conclusões</b> .....	63
<b>Referências</b> .....	69
<b>4 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	72
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
<b>ANEXOS</b> .....	83
<b>APÊNDICES</b> .....	89

# 1 INTRODUÇÃO

As taxas de resistência que as bactérias gram-negativas vêm apresentando frente aos antimicrobianos, principalmente aos  $\beta$ -lactâmicos, têm aumentado significativamente. No ambiente hospitalar, inúmeros fatores contribuem para o aumento das infecções por microrganismos resistentes, entre eles, a pressão seletiva dos antimicrobianos, a terapia antimicrobiana empírica inadequada, longos períodos de hospitalização e fatores relacionados ao paciente, como doenças de base e sistema imunológico debilitado (BUSH, 2001; TENOVER, 2006; COHEN et al., 2008; KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS, 2008; MARAGAKIS, PERL, 2008).

Dentre os mecanismos de resistência destacam-se: i) os mecanismos de impermeabilidade aos antimicrobianos; ii) alteração do sítio de ação, como a alteração de proteínas ligadoras de penicilinas e iii) a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas capazes de clivar o núcleo ativo dos agentes  $\beta$ -lactâmicos, permitindo assim que a parede bacteriana possa ser formada (BUSH, 2001; WALSH et al., 2005). As principais  $\beta$ -lactamases em bactérias gram-negativas são as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), as  $\beta$ -lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC) e as carbapenemases (LIVERMORE, 1995; NORDMANN, POIREL, 2002). As metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS) fazem parte desse último grupo e são bastante temidas por seu amplo espectro de atividade contra os  $\beta$ -lactâmicos (WALSH et al., 2005).

Várias implicações clínicas e epidemiológicas derivam do surgimento e da rápida disseminação desses diversos mecanismos de resistência, principalmente quando eles ocorrem em patógenos de grande importância clínica, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e enterobactérias. A produção de M $\beta$ L, por exemplo, determina, muitas vezes, que a terapêutica efetiva dar-se-á apenas com o uso de polimixinas. Essa escassez de alternativas para o tratamento ocorre, visto que as M $\beta$ LS apresentam resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos (exceto ao monobactâmico aztreonam) e aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (BUSH, 2001; WALSH et al., 2005; CORNAGLIA et al., 2007).

A detecção laboratorial das infecções por isolados produtores de M $\beta$ L tem grande importância na determinação da melhor opção de tratamento para cada paciente, na menor pressão seletiva e no controle das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (BERTONCHELI, 2008). Entretanto, faz-se necessário a padronização de um método acurado, pois não existe, nesse contexto, um consenso entre os diferentes autores e até o

momento, nem o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), nem outros comitês internacionais, sugerem um teste para a detecção dessa resistência (ANDRADE et al., 2007; PICÃO, 2007).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes metodologias para a detecção de M $\beta$ L em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos do presente estudo, frente a diversos antimicrobianos, através do método de difusão do disco e automação;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) através da metodologia da microdiluição em caldo frente ao antimicrobiano polimixina B;
- Avaliar os agentes quelantes ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 0,5M) e ácido 2-mercaptopropiônico (MPA não diluído e 1,4mM), utilizando as metodologias de disco combinado e disco aproximação, na detecção fenotípica de isolados produtores de M $\beta$ L;
- Determinar, entre ceftazidima e imipenem, qual o melhor substrato para os testes fenotípicos de disco aproximação e disco combinado;
- Avaliar as distâncias 1,5, 2,0 e 2,5 cm no teste de disco aproximação;
- Pesquisar, através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), a presença dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub> que codificam as M $\beta$ LS SPM-1 e IMP-1;
- Correlacionar os resultados do método genotípico (PCR) com os resultados obtidos através dos testes fenotípicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características gerais de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

*P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. caracterizam-se essencialmente como patógenos oportunistas (COHEN et al., 2008; MARAGAKIS, PERL, 2008; STRATEVA, YORDANOV, 2009). São bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose, amplamente distribuídos no ambiente hospitalar. A *P. aeruginosa* é facilmente identificada a partir de meios de isolamento primário, pois suas colônias apresentam aspectos distintos, tais como a produção de pigmentos (piocianina, fluoresceína, piomelanina, entre outros), odor semelhante a uvas, bordas irregulares e brilho metálico. Além disso, testes como o da citocromo oxidase (positivo), motilidade (positivo) e o crescimento a 42 °C podem colaborar para a identificação desta espécie. Já as espécies de *Acinetobacter*, por sua vez, apresentam colônias não pigmentadas em ágar sangue, teste negativo para a enzima citocromo oxidase e motilidade negativa. O crescimento a 42 °C corrobora para a distinção entre a espécie de *A. baumannii* (cresce a 42°C) das demais espécies desse gênero (não crescem nessa temperatura) (KONEMAN et al., 2008).

A *P. aeruginosa* tem demonstrado grande capacidade em desenvolver mecanismos de resistência, sendo considerado o microrganismo com maior número de instrumentos a fim de desafiar a atividade de agentes antimicrobianos. A habilidade apresentada por esse patógeno em impedir que o antimicrobiano alcance o seu alvo de ação pode ser observada, inclusive, frente a antimicrobianos muito potentes, tais como cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e os carbapenêmicos (RICE, 2006; STRATEVA, YORDANOV, 2009). Outro fator muito importante apresentado por *P. aeruginosa*, é a formação de biofilme, o que torna ainda mais complicado o tratamento, especialmente de infecções associadas a dispositivos médicos, como os cateteres e as próteses (RICE, 2006).

Espécies de *Acinetobacter*, predominantemente *A. baumannii*, têm sido relatadas com grande frequência como agentes etiológicos em infecções hospitalares, principalmente em pacientes graves, como aqueles de unidades de terapia intensiva (UTIs) (KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS, 2008; MARAGAKIS, PERL, 2008). Além disso, a presença de mecanismos de resistência, intrínsecos ou adquiridos, somada à capacidade de

sobrevivência em superfícies secas são características que ajudam a esclarecer a habilidade que esse patógeno possui em causar surtos. Todos esses fatores são responsáveis por tornar ainda maior a preocupação para o controle das IRAS, quando do isolamento de *Acinetobacter* spp. (FOURNIER, RICHET, 2006; MARAGAKIS, PERL, 2008; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008).

Nesse sentido, as medidas mais eficazes reportadas para reduzir a disseminação das IRAS bem como os possíveis surtos, são as precauções de contato rigorosas, a aplicação de rotinas de vigilância a fim de identificar colonizadores, a descontaminação do ambiente juntamente com a intensificação de medidas educativas como a lavagem das mãos pelos profissionais da saúde, e o gerenciamento apropriado do tratamento das infecções (MARCHAIM, 2007; COHEN, 2008; KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS, 2008; CHOI et al., 2010).

## **2.2 O papel das $\beta$ -lactamases na resistência bacteriana**

As  $\beta$ -lactamases representam um dos mecanismos de resistência mais comuns e importantes desenvolvidos pelas bactérias gram-negativas. Este grupo de enzimas compreende um conjunto bastante complexo e diverso, sendo que, até o início do ano de 2010, mais de 890  $\beta$ -lactamases haviam sido identificadas (BUSH, JACOBY, 2010; DRAWZ, BONOMO, 2010). Elas consistem em enzimas que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, inativando-o e impedindo, assim, que ele entre em contato com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001; TENOVER, 2006; BUSH, JACOBY, 2010).

Ambler classificou as  $\beta$ -lactamases de acordo com sua estrutura primária em quatro classes, classes A a D, as quais foram agrupadas em serina- $\beta$ -lactamases (classes A, C e D) e metalo- $\beta$ -lactamases (classe B), de acordo com diferenças em seus mecanismos catalíticos. As classes A, C e D possuem um resíduo de serina no local ativo da enzima, enquanto as enzimas de classe B possuem um resíduo de cisteína e utilizam íons zinco para romper o anel  $\beta$ -lactâmico (BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001).

A importância da produção de  $\beta$ -lactamases evidencia-se pelo fato de que os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos representam a classe mais utilizada clinicamente, devido à sua

baixa toxicidade e à grande variedade de compostos disponíveis. Incluem-se, nessa classe, as penicilinas, as cefalosporinas, o monobactâmico aztreonam e os carbapenêmicos (SANDERS, SANDERS, 1992; KONEMAN et al., 2008).

### 2.2.1 Surgimento da resistência às cefalosporinas de amplo espectro

A introdução das cefalosporinas na prática clínica ocorreu na década de 1960. Através de modificações na estrutura do núcleo dessa molécula, visando aprimorar a atividade bacteriana e melhorar as propriedades farmacológicas, desenvolveram-se as cefalosporinas de amplo espectro, como ceftazidima e cefepime (MOOSDEEN, 1997). Estas permaneceram, durante muitos anos, como terapia de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas. Entretanto, a emergência de mecanismos de resistência, como AmpC e ESBL, limitou o uso desses agentes no tratamento dessas infecções (SANDERS, SANDERS, 1992; JEAN, 2002; MOOSDEEN, 1997).

### 2.2.2 Surgimento da resistência aos carbapenêmicos

A disseminação dos microrganismos produtores de AmpC e ESBL intensificou o uso dos carbapenêmicos e a década de 1980 marcou o advento desta classe de  $\beta$ -lactâmicos como uma nova opção de tratamento das infecções bacterianas graves. Porém, a resistência aos carbapenêmicos começou a ser observada nas enterobactérias, em *P. aeruginosa* e em *Acinetobacter* spp. (SANDERS, SANDERS, 1992; WALSH et al., 2005; ZARRILLI et al., 2009). Há, inclusive, relato publicado no ano de 1986, descrevendo o surgimento de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem ainda durante o tratamento (QUINN et al., 1986).

A resistência apresentada pelos BGN-NF frente aos carbapenêmicos pode ocorrer devido à produção de carbapenemases, as quais apresentam a capacidade de hidrolizar, ao menos parcialmente, imipenem e meropenem. Com base em estudos moleculares, foram classificadas, segundo Ambler, em: Classe A (penicilinases), Classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinases). A primeira inclui as carbapenemases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); a segunda inclui as M $\beta$ LS, alvo do presente estudo; e a terceira classe

inclui as oxacilinas, como a OXA-23 bastante frequente em *A. baumannii*. As enzimas das classes A e D utilizam um sítio ativo de serina para a hidrólise do  $\beta$ -lactâmico, podendo também ser denominadas serina  $\beta$ -lactamases. As enzimas da classe B, por sua vez, requerem íons zinco como cofatores e, por essa razão, são chamadas de metalo- $\beta$ -lactamases (BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995; NORDMANN, POIREL, 2002; WALSH et al., 2005; QUEENAN, BUSH, 2007; BERTONCHELI, HÖRNER, 2008; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008; BUSH, JACOBY, 2010; DRAWZ, BONOMO, 2010).

Outros mecanismos que podem levar à resistência aos carbapenêmicos em BGN-NF são a perda de porina, ou seja, a redução da expressão de proteínas de membrana externa, e as bombas de efluxo, as quais exportam o antimicrobiano do espaço periplasmático para o meio externo. Estes dois últimos mecanismos podem ocorrer combinados (WALSH et al., 2005; TAM et al., 2007; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008; DRAWZ, BONOMO, 2010; XAVIER et al., 2010).

## 2.3 Metalo- $\beta$ -lactamases

### 2.3.1 Epidemiologia das M $\beta$ Ls

As M $\beta$ Ls foram identificadas, originalmente, como enzimas produzidas intrinsecamente por alguns microrganismos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis*, *Aeromonas* spp. São as chamadas M $\beta$ Ls cromossômicas ou intrínsecas, as quais permaneceram por muitos anos sem muita importância clínica (WALSH et al., 2005; BERTONCHELI, HÖRNER, 2008; BUSH, JACOBY, 2010).

Contudo, desde a identificação da primeira M $\beta$ L adquirida (móvel), em um isolado de *P. aeruginosa*, no Japão em 1991, as M $\beta$ Ls têm sido identificadas em isolados clínicos em todo o mundo. Além dos BGN-NF, os genes que codificam as M $\beta$ Ls já foram observados em outros patógenos de importância clínica como as espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *Serratia marcescens*, *K. pneumoniae*, entre outras (BERTONCHELI, HÖRNER, 2008; BUSH, JACOBY, 2010). Além disso, os microrganismos produtores destas enzimas têm sido responsáveis por prolongar a permanência hospitalar além de elevar as taxas de mortalidade (BUSH, 2001; NORDMANN,

POIREL, 2002; SADER et al., 2005; WALSH et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2005; TENOVER, 2006; ZAVASCKI et al., 2006; QUEENAN, BUSH, 2007; BERTONCHELI, HÖRNER, 2008).

Até o momento são conhecidas seis subclasses de MβLs adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo-β-lactamase), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase) e, mais recentemente, NDM-1 (New Delhi metalo-β-lactamase), codificada pelo gene *bla*<sub>NDM-1</sub> detectado em um isolado de *K. pneumoniae*, na Índia (TOLEMAN et al., 2002; QUEENAN, BUSH, 2007; BERTONCHELI, HÖRNER, 2008; YONG et al., 2009).

A subclasse SPM-1 foi descrita por Toleman et al., em 2002, no Brasil. A amostra clínica de *P. aeruginosa* havia sido isolada no ano de 1997 no complexo Hospitalar São Paulo (TOLEMAN et al., 2002). No mesmo ano, Pellegrino et al., descrevem a disseminação de um clone de *P. aeruginosa* multirresistente em cinco hospitais do estado do Rio de Janeiro (PELLEGRINO et al., 2002). A disseminação de um clone epidêmico de *P. aeruginosa* produtora da MβL SPM-1, em diversas regiões brasileiras, foi relatada em 2003 (GALES et al., 2003).

Durante anos, a ocorrência de isolados produtores de MβL do tipo IMP ficou restrita ao Japão, no entanto, sua ocorrência tem sido relatada em diferentes países, inclusive no Brasil (TOLEMAN et al., 2002; WALSH et al., 2005; QUEENAN, BUSH, 2007; BERTONCHELI, HÖRNER, 2008). Essa disseminação aconteceu da mesma maneira com a MβL do tipo SPM-1, a qual parecia estar restrita ao Brasil (GALES et al., 2003; QUEENAN, BUSH, 2007; BERTONCHELI, HÖRNER, 2008), entretanto, em 2010, descreveu-se o primeiro relato da MβL do tipo SPM-1, em um isolado de *P. aeruginosa*, na Europa (SALABI et al., 2010).

### 2.3.2 Elementos genéticos móveis

A grande capacidade de disseminação de elementos genéticos móveis nos quais as MβLs são comumente encontradas é preocupante, uma vez que estes eventos poderiam alcançar maiores proporções de disseminação, até mesmo entre diferentes espécies. Essa capacidade de propagação deve-se à localização dos genes que codificam as MβLs, os quais podem estar inseridos em plasmídeos ou em íntegrans, e os íntegrans, por sua vez, podem

estar inseridos em plasmídeos ou no próprio DNA cromossomal (BENNETT, 1999; NORDMANN, POIREL, 2002; WALSH et al., 2005).

Íntegrans são elementos genéticos capazes de capturar genes que fazem parte de cassetes gênicos, via recombinação sítio-específica entre dois sítios: um localizado no íntegron e outro, no cassete (Figura 1) (BENNETT, 1999). Os cassetes gênicos são pequenas moléculas de DNA que podem estar na forma livre, circular ou não replicada, que se deslocam de um sítio genético para outro, se inserindo em grandes moléculas de DNA, tais como os plasmídeos ou o cromossomo bacteriano. Os íntegrans foram descobertos a partir da análise dos plasmídeos de resistência e dos transposons que transportam vários genes de resistência; assim, um íntegron pode carrear genes de resistência para mais de uma classe de antimicrobiano (BENNETT, 1999; WALSH et al., 2005).

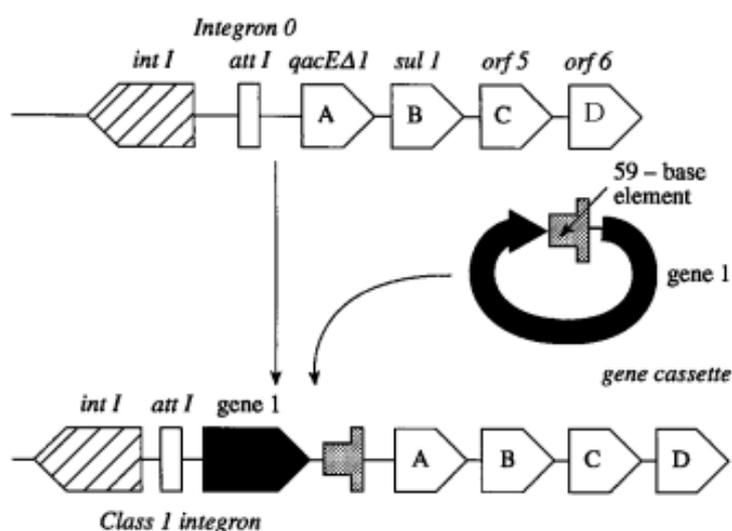


Figura 1 – Estrutura representativa de um íntegron de classe 1: Gene cassete – pequeno pedaço de DNA circular, compreendendo um único gene junto com um sítio de recombinação, o elemento 59-base. Íntegron – capaz de procurar (capturar) genes cassetes, via uma recombinação sítio-específica entre dois sítios: um localizado no íntegron e outro, no cassete. Um íntegron pode carrear genes de resistência para mais de uma classe de antimicrobiano (BENNETT, 1999).

Em virtude dessa capacidade de disseminação e do amplo espectro de ação, as MβLs representam um mecanismo de resistência muito importante e, nesse sentido, um dos principais interesses em detectar as MβLs seria restringir o uso de carbapenênicos, os quais

permanecem, atualmente, como a terapia de escolha para pacientes com infecção hospitalares graves ou aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes a penicilinas e cefalosporinas disponíveis, mas que, nesse caso, não seriam efetivos (WALSH et al., 2005; BERTONCHELI, 2008; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008).

### 2.3.3 Mecanismo de ação e inibidores de MβLs

As MβLs são enzimas que inativam os antimicrobianos β-lactâmicos através da hidrólise da ligação C-N do anel β-lactâmico; possuem diferentes aminoácidos que definem a estrutura do seu sítio ativo o qual é coordenado por pelo menos um íon-zinco. Esse íon coordena duas moléculas de água que servem como nucleófilos e hidrolisam a ligação amida do anel β-lactâmico. Além disso, as MβLs possuem um sítio ativo de amplo encaixe que pode acomodar diferentes substratos β-lactâmicos, justificando seu amplo espectro de atividade frente aos antimicrobianos, inclusive frente aos inibidores de β-lactamases, tais como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (WALSH et al., 2005; DRAWZ, BONOMO, 2010).

As razões pelas quais os compostos inibidores de β-lactamases são ineficazes contra as MβLs podem ser explicadas pelas sutis, embora significantes, variações na conformação do sítio de ação das mesmas. Esta é uma das razões que dificulta a implantação e o desenvolvimento de inibidores eficazes clinicamente contra todos os tipos de MβLs. A outra e mais significativa razão é que as MβLs possuem o sítio ativo muito similar ao de algumas enzimas que possuem extrema importância para o desempenho de funções celulares nos mamíferos. Um exemplo é a enzima glioxalase II, que possui a mesma proteína encontrada em várias partes dos resíduos ligados aos íons zinco nas MβLs e, dessa maneira, possuem a conformação do sítio ativo muito semelhante (DAYASU, 2001; DRAWZ, BONOMO, 2010). Dessa forma, a dificuldade de utilização clínica de inibidores eficazes reside no fato das interações tóxicas que podem ser desenvolvidas devido à arquitetura semelhante de enzimas humanas e das próprias MβLs (WALSH et al., 2005; DRAWZ, BONOMO, 2010).

Nesse contexto, diversos compostos têm sido sintetizados e avaliados como inibidores de MβLs, incluindo: derivados do tiol (ácido mercaptopropiônico, ácido mercaptoacético), derivados de carboxilatos de piridina, análogos de carbapenêmicos,

produtos naturais tricíclicos, compostos succínicos, entre outros (PAYNE et al., 1997; DRAWZ, BONOMO, 2010).

#### 2.3.4 Detecção fenotípica de M $\beta$ Ls

Vários métodos fenotípicos para a detecção de microrganismos produtores de M $\beta$ L têm sido estudados e todos esses métodos são baseados na inativação e/ou inibição dessa enzima (ARAKAWA et al., 2000; YONG et al., 2002; PITOUT et al., 2005; PICÃO, 2007). Uma vez que as M $\beta$ Ls necessitam de cátions divalentes no sítio ativo para atuarem adequadamente, elas podem ser inibidas por agentes quelantes, como o EDTA, ou pela alteração na conformação do sítio ativo da enzima pelos derivados do tiol, como o MPA (PAYNE et al., 1997; WALSH et al., 2005). Nestas metodologias, a zona de confluência entre o inibidor de M $\beta$ L (IM $\beta$ L) e o substrato enzimático (antimicrobiano), difundidos no ágar, é caracterizada pela inibição do crescimento bacteriano, pois a enzima perde sua habilidade de clivar o anel  $\beta$ -lactâmico (ARAKAWA et al., 2000; YONG et al., 2002; PICÃO, 2007; SCHEFFER, 2008).

##### 2.3.4.1 Teste de disco aproximação

O teste de disco aproximação (DA) é o teste fenotípico mais utilizado, consiste na aproximação de um disco contendo substrato e outro contendo o IM $\beta$ L. O surgimento de deformações do halo do antimicrobiano em direção ao disco contendo o inibidor, ou o aparecimento de sinergismo entre os dois discos indica a produção de M $\beta$ L (Figura 2) (ARAKAWA, 2000; PICÃO, 2007; PICÃO et al., 2008; SCHEFFER, 2008).

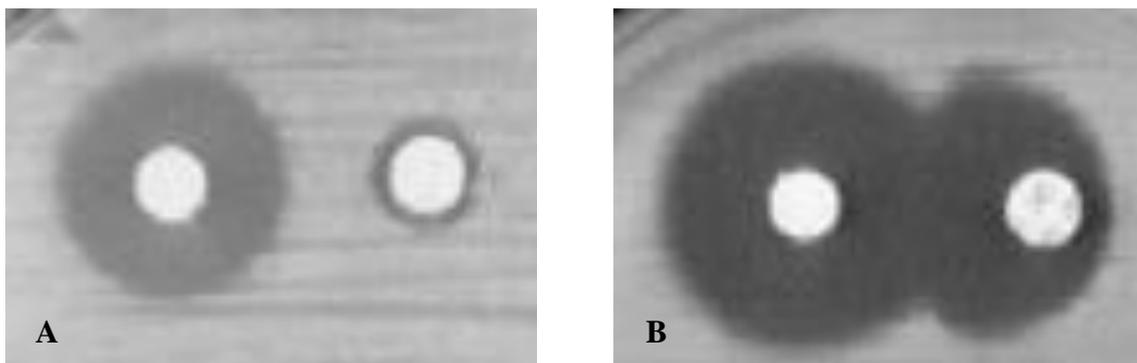


Figura 2 – Teste de DA: A imagem **A** mostra um resultado negativo (disco de papel filtro impregnado com MPA - esquerda e disco de ceftazidima - direita). A imagem **B** mostra um resultado positivo (sinergismo) (disco de papel filtro impregnado com MPA - esquerda e disco de ceftazidima – direita) (ARAKAWA et al., 2000).

#### 2.3.4.2 Teste de disco combinado

Outro teste bastante utilizado é o teste de disco combinado (DC); esta técnica é fundamentada na maior zona de inibição apresentada pelos discos de agentes  $\beta$ -lactâmicos contendo IM $\beta$ L quando comparada àquela produzida pelos discos de  $\beta$ -lactâmicos isoladamente (Figura 3) (PICÃO, 2007; PICÃO et al., 2008). O aumento a ser considerado positivo, entre os discos do substrato e o disco contendo o IM $\beta$ L, não é consenso entre os diferentes autores, sendo que os pontos de corte mais utilizados variam entre 4 e 7mm (YONG, 2002; FRANKLIN, LIOLIOS, PELEG, 2006; SCHEFFER, 2008; PICÃO et al., 2008).

O teste do disco combinado é, segundo Franklin et al., o método fenotípico mais adequado para a detecção de microrganismos produtores de M $\beta$ L, inclusive aqueles sensíveis aos carbapenêmicos (FRANKLIN, LIOLIOS, PELEG, 2006). No entanto, o modo de preparação dos discos pode influenciar os resultados, os quais devem ser interpretados com cautela (ANDRADE et al., 2007).

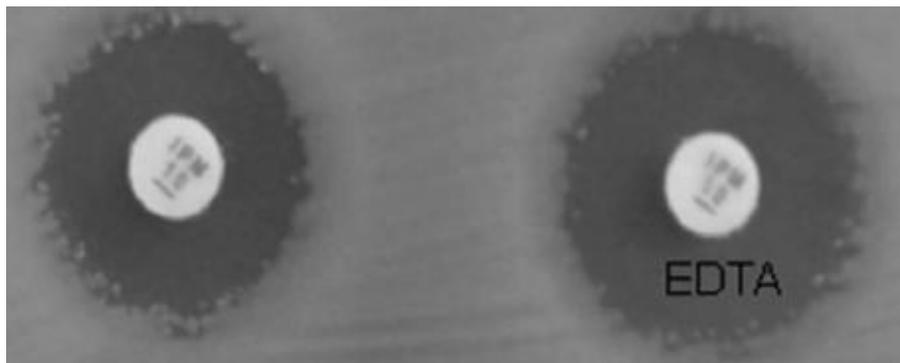


Figura 3 – Teste fenotípico de DC: disco de imipenem (a esquerda) sem adição de EDTA e disco de imipenem (a direita) com a adição do EDTA. O aumento nos halos de inibição do crescimento bacteriano no disco contendo imipenem + EDTA é comparado com o halo do disco de imipenem sem o EDTA (PICÃO et al., 2008).

#### 2.3.4.3 Teste de Hodge modificado

O teste de Hodge modificado, descrito por Lee et al., em 2001, foi desenvolvido a partir do teste de Hodge utilizado na detecção da produção de penicilinase por isolados de *Neisseria gonorrhoeae* e outras espécies bacterianas. As modificações no teste original consistiram na substituição da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pela cepa *E. coli* ATCC 25922 e substituição do disco de penicilina 10U pelo disco do antimicrobiano imipenem 10 $\mu$ g (Figura 4) (LEE et al. 2001). Este teste, no entanto, apresenta baixa especificidade para a detecção de isolados produtores de M $\beta$ Ls, pois pode resultar positivo quando da presença de qualquer carbapenemase, ou seja, todas as pertencentes às classes A (penicilinases), B (M $\beta$ Ls) ou D (oxacilinases) de Ambler (QUEENAN, 2007).

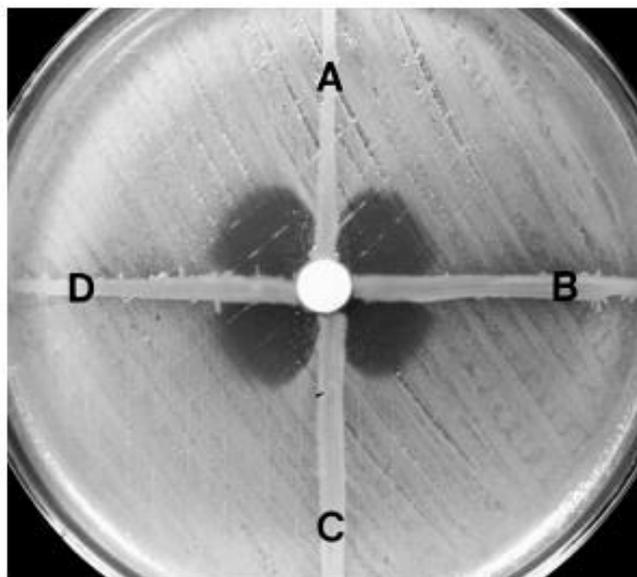


Figura 4 – Teste de Hodge modificado: placa de ágar Mueller Hinton inoculada com a cepa *E. coli* ATCC 25922 e disposição de um disco central de imipenem. A e C representam resultados positivos (a hidrólise do imipenem provocada pelo microrganismo em teste permite o crescimento da cepa *E. coli* ATCC 25922, levando à distorção da zona de inibição). B e D representam resultados negativos (LEE et al., 2001).

#### 2.3.4.4 Teste de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo para a detecção de M $\beta$ L foi descrito, em 2002, por Magliavacca et al. O teste consistiu na submissão do isolado clínico à presença dos inibidores EDTA 0,4mM juntamente com fenantrolina 0,04mM. Comparou-se os valores da CIM apresentada pelo isolado clínico na presença e na ausência dos inibidores e o ponto de corte utilizado foi a diminuição de 4 diluições na CIM, quando da presença dos inibidores (MAGLIAVACCA et al., 2002).

#### 2.3.4.5 *Etest*<sup>®</sup> M $\beta$ L

Pela facilidade de aplicação para a maioria dos laboratórios, o *Etest*<sup>®</sup> M $\beta$ L (Figura 5) é recomendado, entretanto, é de alto custo. O *Etest*<sup>®</sup> consiste em uma fita, de plástico não-

poroso, calibrada com valores crescentes de concentração do antimicrobiano. Uma extremidade da fita é impregnada com imipenem e a outra com imipenem e o inibidor de M $\beta$ L EDTA. A redução da CIM em três ou mais diluições, dependendo da padronização utilizada, na presença do EDTA é interpretada como um teste positivo (WALSH et al., 2005).



Figura 5 – *E-test*<sup>®</sup> M $\beta$ L: A leitura do teste é realizada medindo-se a intersecção das elipses nas duas metades, ou seja, na seção apenas com o imipenem (direita), e na seção do imipenem com o EDTA (esquerda) (WALSH et al., 2005).

### 2.3.5 Detecção genotípica de M $\beta$ Ls

Dentre as técnicas moleculares para a detecção de M $\beta$ Ls, a técnica de sequenciamento é considerada padrão ouro; entretanto é trabalhosa e dispendiosa, além de exigir experiência para a interpretação dos dados. Já a técnica da PCR, além de ser específica para a família de genes pesquisada, é de fácil execução. No entanto, requer iniciadores (*primers*) de DNA específicos e não detecta diferenças entre as variantes nem variantes novas (WALSH et al., 2005).

Os resultados obtidos com o uso da PCR são bastante satisfatórios e têm sido utilizados, em muitos estudos, para confirmar a presença do gene nos resultados positivos obtidos através dos testes fenotípicos (SENDA et al., 1996; ARAKAWA et al., 2000; LEE et al., 2001; YONG et al., 2002; LINCOPAN et al., 2005; MAGALHÃES, LINS, MAGALHÃES, 2005; FRANKLIN, LIOLIOS, PELEG, 2006; ZAVASCKI et al., 2006;

BERGÈS et al., 2007; CORNAGLIA et al., 2007; PICÃO, 2007; QUEENAN, BUSH, 2007; AKTAS, KAYAKAN, 2008; KARTHIKA et al., 2009; WIRTH et al., 2009).

### 2.3.6 Opções terapêuticas para as infecções por microrganismos produtores de MβLs

Diante do amplo espectro de ação e da elevada capacidade de disseminação das MβLs, as opções terapêuticas das infecções causadas por microrganismos produtores dessas enzimas têm sido limitadas. Embora em alguns estudos os carbapenêmicos continuem ativos, sua utilidade clínica continua incerta (WALSH et al., 2005). Como alternativas têm-se relatado o uso de agentes antimicrobianos combinados e o uso das polimixinas (WALSH et al., 2005; KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS 2008; LANDMAN et al., 2008). Alguns estudos têm demonstrado a atividade dos antimicrobianos aztreonam ou piperacilina-tazobactam (SADER et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006; ZAVASCKI et al., 2007). Sader et al., analisaram amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com bacteremia, do Hospital São Paulo (Brasil), durante os anos 2000 e 2001, e relataram que todos os isolados produtores da MβL do tipo IMP-1 foram sensíveis ao aztreonam (SADER et al., 2005). Em outro estudo realizado com isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos isoladas do Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina, entre os anos de 2003 e 2005, todas as amostras produtoras de MβLs foram sensíveis à piperacilina-tazobactam (SCHEFFER et al., 2010). No entanto, a terapia antimicrobiana adequada para o tratamento das infecções por microrganismos produtores de MβLs continua desconhecida (WALSH et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2009).

#### 2.3.6.1 Polimixinas

Descobertas em 1947, as polimixinas são naturalmente sintetizadas por *Bacillus polymyxa*. Elas agem sobre a parede celular bacteriana de gram-negativos, levando a alterações na permeabilidade devido ao deslocamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , ocorre assim, um efeito detergente que causa o rompimento da integridade da membrana e, conseqüentemente, a morte celular (WALSH et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2007; LANDMAN et al., 2008).

As polimixinas são ativas contra *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* é usualmente sensível, enquanto que o complexo *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia pseudomallei* são resistentes a esta classe de antimicrobianos (ZAVASCKI et al., 2007). Além da atividade antimicrobiana, as polimixinas também exercem ação antiendotoxina através da neutralização do lipídeo A do lipopolissacarídeo das bactérias gram-negativas (DRABICK et al., 1998).

Dentre as cinco polimixinas conhecidas (A, B, C, D e E), apenas as polimixinas B e E (colistina) têm uso na prática clínica. A polimixina B difere da colistina pela alteração de um único aminoácido (D-fenilalanina substituí D-leucina). A colistina é encontrada comercialmente em duas formas, sulfato de colistina (usada para descontaminação intestinal) e colestimetato de sódio (para uso intravenoso, intratecal, intramuscular e inalatório), e a polimixina B é disponível na forma de sulfato (utilizada tópica, intravenosa e intratecalmente) (WALSH et al., 2005; FALAGAS, KASIAKOU, 2006; ZAVASCKI et al., 2007; LANDMAN et al., 2008).

Devido aos efeitos tóxicos, principalmente a nefrotoxicidade, o uso dessa classe de antimicrobianos foi sendo gradualmente abandonado nos anos 80, exceto para o tratamento da fibrose cística. Estudos relatam, no entanto, que as polimixinas não são tão tóxicas quanto se acreditava, além disso, a rápida disseminação das MβLs somada ao seu amplo espectro de ação têm reintroduzido as polimixinas na prática clínica (WALSH et al., 2005; FALAGAS, KASIAKOU, 2006; ZAVASCKI et al., 2007; KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS 2008).

Com o isolamento cada vez mais frequente de *P. aeruginosa* resistente a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente e com o aumento do uso das polimixinas na prática clínica, a emergência da resistência a este agente é preocupante (GALES, JONES, SADER, 2006; ZAVASCKI et al., 2007; LANDMAN et al., 2008; ZAVASCKI et al., 2009). Já no ano de 2006, Gales et al. sugeriram que com a crescente utilização do uso das polimixinas, o aparecimento de resistência poderia tornar-se uma preocupação (GALES, JONES, SADER, 2006).

### 2.3.6.2 Agentes antimicrobianos combinados

A combinação de agentes antimicrobianos para o tratamento das infecções causadas por microrganismos produtores de MβLs tem sido bastante empregada. Os principais objetivos da terapia combinada são: produzir efeito sinérgico a fim de maximizar a atividade antimicrobiana, melhorar a penetração dos antimicrobianos no sítio da infecção e impedir o surgimento de resistência durante a terapia (KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS, 2008).

Relatou-se, nesse contexto, aumento de até duas vezes na sobrevivência dos pacientes infectados com *P. aeruginosa* produtora de MβLs quando da instituição da terapia combinada adequada (PARKINS et al., 2006). Fugimura et al., sugeriram o uso de piperacilina-tazobactam associado ao aminoglicosídeo amicacina para o tratamento de doenças pulmonares causadas por *P. aeruginosa* produtora de MβLs (FUGIMURA et al., 2009). Em outro estudo, foi relatada a produção de efeitos antimicrobianos *in vitro*, quando da combinação de três antimicrobianos, aztreonam, ceftazidima e amicacina sobre isolados de *P. aeruginosa* produtores de MβLs (SHIGE HARU et al., 2009).

## 3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

### 3.1 MANUSCRITO 1

#### COMMUNICATION<sup>1</sup>

**Evaluation of bacterial growth inhibition by mercaptopropionic acid in metallo- $\beta$ -lactamase detection on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***

Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo ácido mercaptopropiônico na detecção de metalo- $\beta$ -lactamases em *Acinetobacter baumannii* multirresistente

**Running title:** Bacterial inhibition by mercaptopropionic acid

**Letícia Eichstaedt Mayer, Rosmari Hörner, Maisa Kräulich Tizotti, Rosiéli Martini, Magda Cristina Souza Marques Roehrs and Cláudia Barbisan Kempfer**

---

<sup>1</sup> Manuscrito aceito para publicação pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em 24/11/2010

## ABSTRACT

**Introduction:** Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) has been reported all over the world. **Methods:** We evaluated the inhibitory effect of mercaptopropionic acid (MPA) upon bacterial growth through comparison between disk diffusion and broth dilution methodology with the minimum inhibitory concentration (MIC) determination among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Results:** The MPA inhibited growth on the strains significantly. **Conclusions:** The use of MPA can affect the results in the phenotypic methods of MBL detection.

**Keywords:** Drug resistance. *Acinetobacter baumannii*. Microbial sensitivity tests.

## RESUMO

**Introdução:** Metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) têm sido reportadas em todo o mundo. **Métodos:** Avaliamos o efeito inibitório do ácido mercaptopropiônico (AMP) sobre o crescimento bacteriano mediante a comparação entre a difusão em disco e a metodologia de diluição em caldo com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) entre cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*.

**Resultados:** O AMP inibiu o crescimento das cepas do presente estudo de maneira significativa.

**Conclusões:** O uso do AMP pode afetar os resultados dos métodos de detecção fenotípica de MBL.

**Palavras-chaves:** Resistência a medicamentos. *Acinetobacter baumannii*. Testes de sensibilidade microbiana.

Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) has been reported all over the world and its fast spread has not been accompanied by standardization of a suitable method for phenotypic detection in laboratory<sup>1,2</sup>. The proliferation of MBLs-producing strains must be regarded as a potential public health problem because of limited therapeutic options, increased morbi-mortality rates and a serious concern about infection control<sup>3-5</sup>. In this context, *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic gram-negative pathogen with increasing relevance among nosocomial infections<sup>1,3,6</sup>. The phenotypic methods to detect metalloenzyme producers are based in the fact that those enzymes are affected by the removal of zinc from the active site, and can be performed by chelating agents<sup>1,2</sup> or by alteration of the active site of the enzyme caused by thiol-based compounds<sup>7</sup>, mercaptopropionic acid (MPA), for instance.

Therefore, the fact that the metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor (IMBL) may possess its own inhibitory activity against bacterial growth in phenotypic test should be taken into account. Depending on the tested concentration of IMBL, the interpretation of test results may be compromised<sup>4</sup>.

In this study, we evaluated the inhibitory effect of MPA upon bacterial growth through comparison between disk diffusion and broth dilution methodology with the MIC determination among multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* strains.

A total of 30 MDR *A. baumannii* isolated was tested. The strains are part of the bacterioteca of the Bacteriology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (MBL-negative control) and *P. aeruginosa* SPM-1 (MBL-positive control) were included as controls.

The broth microdilution method was developed according to the criteria of the CLSI<sup>8</sup> but instead of antimicrobial agent solution we used 20µL of MPA, which was dispensed into the first well, obtaining the concentration of 0.74mg/L. Dilutions were carried out in subsequent wells to obtain the following concentrations: 0.37mg/L, 0.185mg/L, 0.0925mg/L, 0.0463mg/L, 0.0231mg/L, 0.0116mg/L, 0.0058mg/L, 0.0029mg/L and 0.0014mg/L.

In order to determine the minimum bactericidal concentration (MBC) strains inhibited from the visual reading of MIC were subcultured in Mueller Hinton agar and incubated for at least 24h in a bacteriological incubator at  $35 \pm 2$  °C.

The evaluation of the MPA activity by the disk diffusion method was performed by applying a filter paper disk on a plate of Mueller Hinton agar, previously inoculated with a bacterial suspension equivalent to the 0.5 McFarland standard. Three microliters (3µL) of MPA (undiluted) were added on the filter paper disk. The diameter of inhibition zone produced by the MPA in the tested strains was measured after incubation at  $35 \pm 2$  °C for 24h.

The inhibitor effect of MPA on bacterial growth in the strains studied was evaluated according to the size of the inhibition zone. The inhibition zones ranged for 14mm to 28mm; the halo of 21mm was the most frequent (n = 7) (23.3%). Picão et al<sup>4</sup> reported an increase in the size of the inhibitor zones produced by MPA (from 0.3 to 12.4mm).

The MIC 0.0116mg/L (n = 16) (53.3%) was the most frequent. The MBC of most strains was 0.0231mg/L (n = 20) (66.7%). In most of the strains tested, the bactericidal effect was observed a dilution greater than the MIC (MIC = 0.0116mg/L and MBC = 0.0231mg/L).

We concluded that there aren't assays in national or international literature using technique of MIC to evaluate the activity of MPA against *A. baumannii* growth. The MPA inhibited bacterial growth on the strains analyzed in our study significantly, which can affect the results in the phenotypic methods of MBL detection. Our results demonstrated that the use of MPA as IMBL should be rethought. In the case of preliminary results, a larger number of strains will be analyzed.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there is no conflict of interest.

### **FINANCIAL SUPPORT**

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministry of Education, Brazil, and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Federal University of Santa Maria.

## REFERENCES

1. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier J, et al. Metallo- $\beta$ -Lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:380-388.
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:306-325.
3. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1254-1263.
4. Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GM, Mendes RE, et al. Metallo- $\beta$ -Lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2028-2037.
5. Zavascki AP, Barth AL, Gonçalves ALS, Moro ALD, Fernandes JF, Martins, AF, et al. The influence of metallo- $\beta$ -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:387-392.
6. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3:335-341.
7. Payne DJ, Bateson JH, Gasson BC, Proctor D, Khushi T, Farmer TH, et al. Inhibition of Metallo- $\beta$ -Lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 1:135-140.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically. Seventh edition: Approved Standard M7-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

## 3.2 MANUSCRITO 2

### ***Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.: produção de AmpC e ESBL e perfil de sensibilidade no Hospital Universitário de Santa Maria<sup>2</sup>**

#### **Resumo**

**Objetivos:** verificar a produção de AmpC e ESBL e avaliar o perfil de sensibilidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria. **Métodos:** durante o período de abril a junho de 2009 foram isoladas 92 *P. aeruginosa* e 22 *Acinetobacter* spp. A identificação bacteriana foi efetuada utilizando automação (MicroScan – Siemens). A avaliação da sensibilidade frente aos antimicrobianos foi realizada por difusão do disco e automação. A metodologia de microdiluição em caldo foi utilizada para determinação da concentração inibitória mínima da polimixina B. Testes fenotípicos para avaliação de mecanismos de resistência AmpC e ESBL também foram executados. **Resultados:** Entre os isolados de *Acinetobacter* spp., 17/22 (77,3%) foram provenientes de UTIs e, 17/22 (77,3%) eram do trato respiratório. Multirresistência foi detectada em 63,6% dos isolados de *Acinetobacter* spp., sendo que 59,1% foram sensíveis à gentamicina, 22,7% ao imipenem e 27,3% ao meropenem. Os testes fenotípicos para a detecção de AmpC e ESBL foram negativos nos isolados de *Acinetobacter* spp. Entre os isolados de *P. aeruginosa* 35/92 (38%) foram provenientes de UTIs e 24/92 (26,1%), da unidade de pneumologia, sendo que 50/92 (54,3%) foram isoladas a partir de amostras do trato respiratório. Dentre os isolados de *P. aeruginosa* 74/92 (80,4%) foram AmpC positivas. Nenhum isolado de *P. aeruginosa* apresentou teste de sinergismo positivo para ESBL. Todos os isolados de *Acinetobacter* spp. foram sensíveis ao antimicrobiano polimixina B. No entanto, redução da sensibilidade à polimixina B em *P. aeruginosa* parece começar a ser observada em nossa Instituição. **Conclusões:** Testes fenotípicos rápidos e simples realizados simultaneamente com a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos são

---

<sup>2</sup> Manuscrito a ser submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

essenciais para a instituição da terapia empírica adequada, influenciando diretamente na morbimortalidade dos pacientes críticos.

*Descritores: Pseudomonas aeruginosa. Acinetobacter. Testes de sensibilidade microbiana.*

## **Abstract**

**Objectives:** Verify the production of AmpC and ESBL and evaluate the susceptibility profile of strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated at the University Hospital of Santa Maria. **Methods:** During the period April to June 2009, 114 strains were isolated, 92 *P. aeruginosa* and 22 *Acinetobacter* spp. The bacterial identification was performed using automation. The evaluation of sensitivity against antimicrobial agents was performed by disk diffusion and automation. The broth microdilution was used to determine the minimum inhibitory concentration of polymyxin B. Phenotypic tests for evaluation of the AmpC and ESBL resistance mechanisms were also executed. **Results:** Between the strains of *Acinetobacter* spp., 17/22 (77.3%) were from ICU and in 17/22 (77.3%) were respiratory tract. Multidrug resistance was detected in 63.6% of these strains of *Acinetobacter* spp., and 59.1% were sensitive to gentamicin, imipenem 22.7% and 27.3% to meropenem. Phenotypic tests for the detection of AmpC and ESBLs were negative in strains of *Acinetobacter* spp. Among the strains of *P. aeruginosa* 35/92 (38%) were from ICU and 24/92 (26.1%), pulmonology unit, and 50/92 (54.3%) were isolated from samples of the respiratory tract. Among the strains of *P. aeruginosa* 74/92 (80.4%) were AmpC positive. No strains of *P. aeruginosa* demonstrated synergy test positive for ESBL. All strains of *Acinetobacter* spp. were sensitive to the antibiotic polymyxin B. However, reduced sensitivity to polymyxin B in *P. aeruginosa* appears to begin to be observed at our institution. **Conclusions:** Rapid and simple phenotypic tests performed simultaneously with the evaluation of antimicrobial susceptibility is essential to establish of appropriate empirical therapy, directly influencing the mortality of critically ill patients.

*Descriptors: Pseudomonas aeruginosa. Acinetobacter. Microbial sensitivity tests.*

## Introdução

*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. são bacilos gram-negativos não-fermentadores da glicose amplamente distribuídos na natureza e no ambiente hospitalar.<sup>1</sup> O aumento de sua frequência na etiologia das infecções adquiridas nos hospitais despertou recente atenção por parte dos clínicos e pesquisadores em geral. Além disso, a resistência que ambos os gêneros apresentam frente a diferentes antimicrobianos, somada à sua habilidade em desenvolver novos mecanismos de resistência, inclusive aos carbapenêmicos, comprometeu seriamente o tratamento dos pacientes infectados com estes patógenos.<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>

As infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. incluem pneumonia, infecções do trato urinário e feridas, podendo progredir para septicemia.<sup>8</sup> Estas bactérias são consideradas patógenos emergentes com envolvimento frequente nas infecções de pacientes das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Por infectar facilmente estes hospedeiros imunocomprometidos, a instituição imediata da efetiva terapia empírica está diretamente relacionada com a sobrevivência dos mesmos.<sup>2,3,4,7,9</sup>

Portanto, conhecer os padrões locais de sensibilidade que esses dois gêneros apresentam influi diretamente na morbimortalidade dos pacientes críticos, contribuindo no direcionamento das estratégias de controle de infecção e na escolha da terapia antimicrobiana empírica mais adequada.<sup>9</sup> A limpeza, desinfecção de ambientes, materiais e equipamentos, além da importância da lavagem das mãos pelos profissionais de saúde são medidas essenciais para impedir a infecção cruzada de ambos microrganismos. Por consequência, bactérias multirresistentes presentes no ambiente são oportunistas em pacientes imunodeprimidos, podendo desencadear surto de infecção hospitalar.<sup>10</sup>

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de AmpC e ESBL e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no período de abril a junho de 2009.

## Materiais e métodos

O HUSM é um hospital escola com 330 leitos, constituindo referência para a região central do Rio Grande do Sul.

Durante o período de abril a junho de 2009 no Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, foi isolado um total de 114 microrganismos, dos quais 92 eram *P. aeruginosa* e 22 *Acinetobacter* spp. A identificação foi realizada utilizando a automação – MicroScan® – Siemens. Os microrganismos foram armazenados em caldo triptona de soja 15% de glicerol à -20 °C.

A avaliação da sensibilidade frente aos antimicrobianos foi efetuada utilizando a automação e a difusão do disco. Nesta última metodologia (convencional) foram testados para os dois gêneros: amicacina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem e piperacilina-tazobactam; apenas para *Acinetobacter* spp.: ampicilina-sulbactam e sulfametoxazol-trimetoprima e, apenas para *P. aeruginosa*: aztreonam, norfloxacina e polimixina B. O meio ágar Mueller Hinton e os discos de antimicrobianos utilizados no presente estudo eram das marcas Himedia® e Sensidisc® – DME, respectivamente. As cepas utilizadas para o controle de qualidade dos discos foram: *E.coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 28753 e *E. coli* ATCC 35218, conforme orientações do *Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI*.<sup>11</sup>

Testes fenotípicos presuntivos foram efetuados para a detecção da cefalosporinase cromossomicamente codificada (tipo AmpC) - AmpC induzível e  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (*Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase – ESBL*), mediadas por plasmídeos. Para AmpC, os discos de imipenem e cefoxitina foram dispostos a 20 mm (centro a centro) do disco de ceftazidima central. A indução da produção de AmpC promove o achatamento do halo da cefalosporina de 3ª geração, o que significa teste positivo para AmpC. Para a detecção de ESBL, discos de ceftriaxona, ceftazidima, cefepime e aztreonam foram dispostos a 20 mm (centro a centro) de um disco central de amoxicilina-ácido clavulânico. O aparecimento de uma zona de sinergismo entre amoxicilina-ácido clavulânico e pelo menos um dos antimicrobianos dispostos a sua volta caracteriza teste de *screening* positivo para ESBL.

Os isolados clínicos do presente estudo também foram testados pelo método de microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à polimixina B (sulfato de polimixina B 500.000 UI. Equivalência: 1mg = 10000 UI) adquirida

comercialmente e frente ao sal sulfato de polimixina B (potência = 8142 U/mg). Foram testadas 89 isolados de *P. aeruginosa* e 22 isolados de *Acinetobacter* spp. Os isolados que apresentaram perfil intermediário (CIM = 4 µg/mL) e/ou resistente (CIM ≥ 8µg/mL) a pelo menos uma das polimixinas testadas foram, posteriormente, submetidas ao *Etest*<sup>®</sup> para a polimixina B (AB Biodisk). Estes isolados clínicos foram testados no primeiro semestre de 2010 e os testes de microdiluição em caldo com a polimixina comercial foram repetidos no segundo semestre do mesmo ano, após estes isolados ficarem estocadas em caldo tripton de soja 15% de glicerol a -20°C. O objetivo da repetição dos testes (seis meses depois) foi verificar se o perfil intermediário e/ou resistente apresentado por alguns isolados poderia ser devido à pressão seletiva à qual estavam sendo submetidos *in vivo*. Os testes foram realizados em triplicata em meio caldo Mueller Hinton (Himedia<sup>®</sup>).

## Resultados

Dos 22 isolados de *Acinetobacter* spp., a maior parte deles, 17 (77,3%), foi proveniente de UTIs (UTI adulto e UTI-RN) e 17 (77,3%) foram oriundos do trato respiratório (escarro e secreção traqueal). A multirresistência (considerada aqui como sensibilidade a apenas um ou sensibilidade a nenhum antimicrobiano) foi apresentada por 14 dos 22 isolados (63,6%). As taxas de sensibilidade frente ao meropenem e imipenem foram, respectivamente, 27,3% e 22,7%; Enquanto que para o antimicrobiano gentamicina os isolados apresentaram 59,1% de sensibilidade (Tabela 1). Nenhum isolado de *Acinetobacter* spp. deste estudo apresentou resultado positivo para os testes fenotípicos de detecção de AmpC e ESBL.

Em relação aos isolados de *P. aeruginosa*: 35 dos 92 (38%) foram provenientes de UTIs (UTI adulto, UTI pediátrica e UTI-RN) e 24 dos 92 da unidade de pneumologia (26,1%). Grande parte deles, 50 dos 92 (54,3%), foi isolada a partir de amostras do trato respiratório (secreção traqueal, escarro e lavado broncoalveolar). O fenótipo AmpC foi apresentado por 74 (80,4%) isolados de *P. aeruginosa*. Considerando as unidades individualmente, 86% dos isolados da UTI e 67% da unidade de pneumologia apresentaram o fenótipo AmpC e imipenem foi melhor indutor no teste. Além disso, foi observado que a maior parte dos isolados positivos para o mecanismo de resistência AmpC, apresentou também inibição entre ceftriaxona e amoxicilina-ácido clavulânico, visualizada por um

achatamento no halo da ceftriaxona. Foi encontrada freqüente heterorresistência ao imipenem, detectada pelo crescimento de colônias dentro do halo, especialmente nos isolados AmpC positivos. 16 de 92 (17,4%) e 27 de 92 (29,3%) dos isolados foram resistentes ao meropenem e imipenem, respectivamente. Somente uma amostra foi resistente à polimixina B (Tabela 2). Nenhum isolado de *P. aeruginosa* apresentou teste de sinergismo positivo para ESBL.

A comparação das metodologias efetuadas para a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos, difusão do disco e automação, está apresentada na Tabela 3.

Todos os isolados de *Acinetobacter* spp. do presente estudo foram sensíveis tanto à polimixina B comercial, quanto ao sal da polimixina B e a maioria apresentou CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados das CIMs dos isolados de *P. aeruginosa* frente à polimixina B comercial e frente a seu sal estão apresentados no Quadro 1. Na Tabela 4 estão listados os 11 dos 89 (12,3%) isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram perfil intermediário ou resistente através da microdiluição em caldo frente à polimixina comercial e/ou frente ao sal de polimixina. Estes 11 isolados foram testados frente ao *Etest*<sup>®</sup> para a polimixina B. A fim de avaliar se houve mudança no perfil de sensibilidade dos isolados clínicos, os mesmos foram retestados através da microdiluição em caldo, no segundo semestre de 2010 (Tabela 4).

Tabela 1 – Perfis de sensibilidade dos 22 isolados de *Acinetobacter* spp. frente a 12 antimicrobianos através da difusão do disco

Antimicrobiano <sup>a</sup>	Sensíveis, n (%)	Intermediárias, n (%)	Resistentes, n (%)
Gentamicina (A)	13 (59,1)	2 (9,1)	7 (31,8)
Ampicilina-Sulbactam (A)	6 (27,3)	1 (4,5)	15 (68,2)
Meropenem (A)	6 (27,3)	-	16 (72,7)
Cefepime (B)	5 (22,7)	5 (22,7)	12 (54,5)
Imipenem (A)	5 (22,7)	3 (13,6)	14 (63,6)
Piperacilina-Tazobactam (B)	4 (18,2)	1 (4,5)	17 (77,3)
Sulfametoxazol-Trimetoprima (B)	4 (18,2)	1 (4,5)	17 (77,3)
Amicacina (B)	4 (18,2)	-	18 (81,8)
Ciprofloxacina (A)	4 (18,2)	-	18 (81,8)
Levofloxacina (A)	4 (18,2)	-	18 (81,8)
Ceftazidima (A)	3 (13,6)	1 (4,5)	18 (81,8)
Ceftriaxona (B)	1 (4,5)	3 (13,6)	18 (81,8)

<sup>a</sup> Grupo a que pertence o antimicrobiano, de acordo com o CLSI 2010.

Tabela 2 – Perfis de sensibilidade dos 92 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* frente a 13 antimicrobianos através da difusão do disco

Antimicrobiano <sup>a</sup>	Sensíveis, n (%)	Intermediárias, n (%)	Resistentes, n (%)
Polimixina B (O)	91 (98,9)	-	1 (1,1)
Cefepime (B)	81 (88,0)	4 (4,3)	7 (7,6)
Amicacina (B)	77 (83,7)	4 (4,3)	11 (12,0)
Gentamicina (A)	77 (83,7)	3 (3,3)	12 (13,0)
Levofloxacina (B)	76 (82,6)	2 (2,2)	14 (15,2)
Norfloxacina (U)	76 (82,6)	1 (1,1)	15 (16,3)
Ciprofloxacina (B)	74 (80,4)	4 (4,3)	14 (15,2)
Meropenem (B)	73 (79,3)	3 (3,3)	16 (17,4)
Piperacilina-Tazobactam (B)	71 (77,2)	-	21 (22,8)
Imipenem (B)	63 (68,5)	2 (2,2)	27 (29,3)
Aztreonam (B)	59 (64,1)	28 (30,4)	5 (5,4)
Ceftazidima (A)	6 (6,5)	-	86 (93,5)

<sup>a</sup> Grupo a que pertence o antimicrobiano, de acordo com o CLSI 2010.

Tabela 3 – Perfis de sensibilidade da difusão do disco e da automação (MicroScan<sup>®</sup> - Siemens) e concordância de resultados entre as duas metodologias

Microrganismo Antimicrobiano	Difusão do Disco			MicroScan			C <sup>a</sup> (%)
	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	
<i>Acinetobacter</i> spp							
Amp-Sulb <sup>b</sup>	6 (27,3)	1 (4,5)	15 (68,2)	6 (33,3)	3 (16,7)	9 (50,0)	61,1
Ceftazidima	3 (13,6)	1 (4,5)	18 (81,8)	3 (14,3)	1 (4,8)	17 (80,9)	100
Gentamicina	13 (59,1)	2 (9,1)	7 (31,8)	13 (61,9)	-	8 (38,1)	76,2
<i>P. aeruginosa</i>							
Aztreonam	59 (64,1)	28 (30,4)	5 (5,4)	45 (65,2)	5 (7,2)	19 (27,5)	65,2
Cefepime	81 (88,0)	4 (4,3)	7 (7,6)	51 (66,2)	10 (13,0)	16 (20,8)	67,5
Gentamicina	77 (83,7)	3 (3,3)	12 (13,0)	53 (68,8)	15 (19,5)	9 (11,7)	74,0
Pip-Tazo <sup>c</sup>	71 (77,2)	-	21 (22,8)	57 (74,0)	-	20 (26,0)	74,0

<sup>a</sup> Concordância – resultados iguais.

<sup>b</sup> ampicilina-sulbactam.

<sup>c</sup> piperacilina tazobactam.

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente.

CIM µg/mL	Polimixina comercial n (%)	Polimixina Sal n (%)	Perfil de Sensibilidade Polimixina comercial	Perfil de Sensibilidade Sal
≤0,25	34 (38,2)	23 (26,1)	Sensível 82 (92,1%)	Sensível 83 (94,3%)
0,5	18 (20,2)	12 (13,6)		
1	20 (22,5)	31 (35,2)		
2	10 (11,2)	17 (19,3)		
4	6 (6,7)	3 (3,4)	Intermediário 6 (6,7%)	Intermediário 3 (3,4%)
8	-	1 (1,15)	Resistente 1 (1,1%)	Resistente 2 (2,3%)
16	1 (1,1)	-		
32	-	-		
64	-	1 (1,15)		
TOTAL	89* (100)	88*	89* (100)	88* (100)

Quadro 1 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e perfis de sensibilidade apresentados pelos isolados de *P. aeruginosa*, frente à polimixina comercial e frente a seu sal.

\* o número total de isolados testados foi diferente em virtude da perda de um isolado durante a realização dos testes.

Tabela 4 – Isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram perfil intermediário e resistente através da microdiluição em caldo com a polimixina B comercial e/ou com o sal de polimixina B, *Etest*<sup>®</sup> para polimixina B e repetição da microdiluição em caldo com a polimixina B comercial

Isolado N°	1° Semestre 2010		<i>Etest</i> <sup>®</sup> Polimixina (µg/mL)	2° Semestre 2010
	CIM Polimixina Comercial (µg/mL)	CIM Polimixina Sal (µg/mL)		CIM Polimixina Comercial (µg/mL)
P. 20	4 (I)	≤0,25 (S)	1 (S)	1 (S)
P. 22	4 (I)	≤0,25 (S)	4 (I)	8 (R)
P. 51	2 (S)	8 (R)	12 (R)	0,25 (S)
P. 52	4 (I)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
P. 56	4 (I)	1 (S)	4 (I)	0,5 (S)
P. 67	4(I)	4(I)	1,5 (S)	1 (S)
P. 68	4 (I)	0,5 (S)	4 (I)	4 (I)
P. 81	≤0,25 (S)	64 (R)	4 (I)	16 (R)
P. 87	0,5 (S)	4 (I)	4 (I) *	4 (I)
P. 89	0,5 (S)	4 (I)	1,5 (S)	2 (S)
P. 107	16 (R)	0,5 (S)	4 (I)	8 (R)

\* Colônia Heterorresistente em 24 µg/mL.

S = Sensível. I = Intermediário. R = Resistente.

## Discussão

*P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter* representam patógenos gram-negativos emergentes cujos alvos são os pacientes imunodeprimidos, como os de UTIs ou de centros oncológicos.<sup>2</sup> Além disso, a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos compromete seriamente o tratamento, com relatos de isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistente a todos os antimicrobianos testados.<sup>2,12</sup>

Esta resistência ocorre principalmente por AmpC induzível,  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), serina e metalo- $\beta$ -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, resistência a quinolonas, alterações nas porinas, sistemas de bombas de efluxo e alterações na constituição da membrana, levando a resistência às polimixinas.<sup>2,13</sup>

**Perfil de sensibilidade – *Acinetobacter* spp.** Os carbapenêmicos constituem a terapia de eleição no tratamento de *Acinetobacter* spp. multirresistentes em vários hospitais.<sup>9,10</sup> Porém, no nosso estudo, eles não representaram uma escolha efetiva (Tabela 1). Para essa bactéria, os relatos a respeito de sua sensibilidade são diferenciados: num estudo realizado em um hospital de Taiwan, 51 a 56% foram sensíveis;<sup>5</sup> em outro, realizado em Hospitais dos Estados Unidos de 1998 a 2001, a sensibilidade foi maior que 90%;<sup>14</sup> 70,4% de sensibilidade ao meropenem na Europa e 83,6% na América Latina, foram as taxas encontradas em 2621 isolados de *Acinetobacter* spp., pelo programa de vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana (*Antimicrobial surveillance program – SENTRY*) no período de 2001 a 2004;<sup>15</sup> num hospital do sul da Índia em 2007, nenhum isolado foi sensível ao imipenem e somente 11% foram sensíveis ao meropenem.<sup>16</sup> No Brasil, a rede nacional de monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde (Rede RM), em análise de infecções primárias da corrente sanguínea de pacientes de terapia intensiva, no período de 2006 a 2008, 56% e 58% dos *Acinetobacter* spp. foram sensíveis a imipenem e meropenem, respectivamente, e quando as taxas foram estratificadas por região, a sensibilidade na região Sul foi 25% e 21% para os mesmos antimicrobianos, respectivamente.<sup>17</sup> Percentuais bastante semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Paralelamente, surtos de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos têm sido relatados em diversas regiões do mundo: Barcelona-Espanha em 1997 e 1998;<sup>4</sup> Uberlândia-Brasil em 2001 e 2002;<sup>3</sup> Johannesburgo-África em 2002;<sup>12</sup> Curitiba-Brasil em 2003;<sup>18</sup> Busan-Coreia em 2004;<sup>6</sup> Cali, Bogotá, Medellín e Pereira-Colômbia em 2005;<sup>19</sup> Seul-Coreia em 2006 e 2007;<sup>20</sup> Ansan-Coreia em 2007 e 2008;<sup>21</sup> Madrid-Espanha em 2009.<sup>22</sup>

Além disso, a sensibilidade a outros antimicrobianos também tem sido baixa: 29% de sensibilidade a ampicilina-sulbactam em Taiwan em 1999<sup>5</sup> e 56,7% a piperacilina-tazobactam nos EUA, em 2001.<sup>14</sup> Em nosso estudo, a sensibilidade a ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam foi 27,3% e 18,2%, respectivamente.

Embora o elevado índice de resistência que os isolados de *Acinetobacter* spp. apresentaram frente aos antimicrobianos testados, gentamicina mostrou-se como a melhor alternativa para o tratamento (59,1% de sensibilidade) (Tabela 1).

**Perfil de sensibilidade – *P. aeruginosa*.** *P. aeruginosa* é conhecida por ser uma bactéria com grande capacidade de adquirir mecanismos de resistência.<sup>23</sup> Segundo o programa SENTRY, em seu estudo realizado em um período de 5 anos (1997 a 2001), a resistência aos antimicrobianos em geral, nos isolados de *P. aeruginosa*, aumentou nos países da América Latina.<sup>24</sup> No presente estudo, *P. aeruginosa* apresentou boa sensibilidade frente a: polimixina B, cefepime, amicacina, gentamicina, levofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina e meropenem (Tabela 2). Resultados semelhantes também foram encontrados em hospitais dos Estados Unidos por Karlowsky et al.<sup>14</sup>

A detecção fenotípica de ESBL em amostras de *P. aeruginosa* não é preconizada pelo CLSI. Este mecanismo foi descrito recentemente (anos 90) e os estudos mostram baixa sensibilidade e especificidade no teste *screening*, ao contrário do que ocorre com a família *Enterobacteriaceae*. Isso pode ocorrer devido à presença simultânea de metalo- $\beta$ -lactamases ou oxacilinases, por mecanismos combinados de resistência como a impermeabilidade de membrana e bombas de efluxo; além disso, a hiperexpressão de AmpC pode dificultar a detecção de ESBL em *P. aeruginosa*. Todos estes fatores podem levar a subestimação da verdadeira prevalência deste mecanismo de resistência.<sup>8,23</sup> Por isso, a escolha de cefepime para a terapêutica no tratamento dos isolados produtores de AmpC em nossa Instituição, estaria comprometida, caso a presença de ESBL não tenha sido detectada. Além disso, o uso de carbapenêmicos deve ser cauteloso, pois esta classe de antimicrobiano induz fortemente a produção de AmpC, porém não sofrem a ação direta desta enzima.<sup>25</sup>

**Difusão do disco e automação na determinação da sensibilidade aos antimicrobianos.** A partir da Tabela 3 pode-se observar que os percentuais de resultados concordantes variam bastante entre o método de difusão do disco e automação dependendo do gênero e do antimicrobiano testados. Cefotaxima, por exemplo, apresentou 100% de concordância nos resultados entre ambos os métodos nas amostras de *Acinetobacter* spp.; já a concordância com o aztreonam nas amostras de *P. aeruginosa* foi de 65,2%.

**Redução do perfil de sensibilidade à polimixina B em *P. aeruginosa*.** O isolamento cada vez mais frequente de *P. aeruginosa* resistente a praticamente todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente, tem reintroduzido o uso das polimixinas na prática clínica. Outros fatores que contribuem para o aumento do seu uso são os relatos de sucesso no tratamento e as evidências de que essa classe de antimicrobiano é menos tóxica que relatado anteriormente.<sup>26,27,28</sup> Entretanto, casos de isolados clínicos resistentes a este antimicrobiano vêm sendo relatados.<sup>15,29,30,31</sup>

Em 2006, Gales et al. sugeriram que com a crescente utilização do uso das polimixinas, o aparecimento de resistência poderia tornar-se uma preocupação. O programa Sentry avaliou, entre os anos de 2001 e 2004, 54731 bacilos gram-negativos isolados de diversas partes do mundo. Os índices de resistência de *P. aeruginosa* frente à polimixina B foram 2,9% na região Ásia-Pacífico e 1,1% na Europa, América Latina e América do Norte. Interessantemente, estes isolados resistentes foram detectados em 20 países e a maioria deles apresentou CIM de 4 µg/mL.<sup>15</sup> Os índices de resistência (1,1 e 2,3% - polimixina comercial e seu sal, respectivamente) e perfil de sensibilidade intermediário (6,7 e 3,4% - polimixina comercial e seu sal, respectivamente) encontrados pelo presente estudo (Quadro 1), representam o início de um problema terapêutico em nossa Instituição, pois novos agentes antimicrobianos para o tratamento das infecções em questão não estão disponíveis atualmente.<sup>27</sup>

O percentual de sensibilidade apresentado pelo disco de polimixina B foi bastante elevado, 98,9% (Tabela 1). Entretanto, cabe salientar que a acurácia deste teste tem sido questionada devido à baixa difusão da polimixina no ágar.<sup>29,32</sup> Por outro lado, a presença de colônias no interior da zona de inibição do crescimento bacteriano, tanto através do teste de difusão do disco, quanto através da fita de *Etest*<sup>®</sup> para polimixina B demonstra o fenômeno da heterorresistência, o qual pode não ser detectado pelo método de microdiluição em caldo, embora este último seja considerado o método padrão ouro.<sup>29</sup> Isso pode ocorrer principalmente devido a quantidade de microrganismos heterorresistentes presentes no poço, a qual pode ser insuficiente para ocasionar a turvação do meio.

Sugerem-se, nesse contexto, dois mecanismos distintos de resistência da *P. aeruginosa* frente à polimixina. Um deles resulta da adaptação gradual da bactéria na presença do antimicrobiano. Nesse caso, trata-se de uma resistência adquirida, a qual é revertida quando a bactéria passa a crescer em meio sem a presença deste antimicrobiano. O outro mecanismo envolve a mutação genética e é hereditário.<sup>15,33,34</sup> Na Tabela 4 observa-se que os isolados P.20, P.51, P.52, P.56, P.67 e P. 89 apresentaram perfil intermediário ou

resistente na primeira bateria de testes (1º semestre de 2010), já quando os testes foram repetidos, no 2º semestre de 2010, apresentaram perfil sensível. Esse comportamento pode sugerir a presença do primeiro mecanismo de resistência citado neste parágrafo, ou seja, o microrganismo passa a não expressar o fenótipo resistente com o fim da exposição ao antimicrobiano. Contudo, os isolados que apresentaram CIM de 4 µg/mL (intermediárias) ou 2 µg/mL (sensíveis) podem ter sido classificados erroneamente, uma vez que uma variação  $\pm$  um  $\log_2$  pode ocorrer na determinação da CIM. Trata-se do erro intrínseco do método que deve ser levado em consideração quando os resultados obtidos através dessa técnica são analisados.<sup>15</sup>

### Considerações finais

*P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. são, atualmente, patógenos oportunistas capazes de expressar uma grande variedade de mecanismos que conferem resistência a uma ampla faixa de agentes antimicrobianos, como demonstrou o presente estudo. Dificuldades na detecção dos diversos mecanismos de resistência, como AmpC e ESBL e, provável, subnotificação pode aumentar a incidência e a prevalência desses mecanismos de resistência.<sup>23</sup> Além disso, devido a elevada taxa de AmpC encontrada no presente estudo, optou-se por considerar ceftazidima resistente nestes isolados, pois além da dificuldade na leitura do diâmetro do halo (achatamento), pode haver falha terapêutica ainda que, *in vitro*, este antimicrobiano apresente sensibilidade.<sup>25</sup>

A partir desse estudo sustenta-se a presença de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* como patógenos oportunistas, principalmente em unidades hospitalares nas quais há a presença de pacientes imunocomprometidos. *Acinetobacter* spp. apresentou-se multirresistente, tanto para antimicrobianos de primeira escolha, imipenem e meropenem, quanto para outros, piperacilina – tazobactam e ampicilina – sulbactam, sendo que gentamicina foi o antimicrobiano que apresentou maior sensibilidade. Já a elevada taxa de produção de AmpC nos isolados de *P. aeruginosa* preocupa, devido a limitação da terapia efetiva. Ao associar diferentes metodologias para determinação da sensibilidade aos antimicrobianos, um método complementa o outro, aumentando a segurança na liberação do laudo. Neste contexto, estudos com a finalidade de determinar a prevalência e o perfil de

sensibilidade local devem ser continuamente incentivados, pois a partir deste conhecimento a escolha da terapia empírica adequada é favorecida.

## Referências

1. Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, Teixeira LM, Mondino SSB. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(3):177-84.
2. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2006;43(2 suppl):S49-56.
3. Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdallah VOS, Gontijo-Filho PP. Nosocomial outbreaks due to *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit (NICU) of the Uberlândia Federal University Hospital. *Braz J Microbiol*. 2003;34(1 suppl):27-8.
4. Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez MA, Ayats J, Argerich J, et al. Emergence and Rapid Spread of Carbapenem Resistance during a Large and Sustained Hospital Outbreak of Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(11):4086-95.
5. Jean SS, Teng LJ, Hsueh PR, Ho SW, Luh KT. Antimicrobial susceptibilities among clinical isolates of extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria in a Taiwanese University Hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:69-76.
6. Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, et al. Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. *J. Microbiol*. 2006;44(4):423-31.
7. Ye JJ, Huang CT, Shie SS, Huang PY, Su LH, Chiu CH, et al. Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors for Appearance of Imipenem Resistant Strains on Patients Formerly with Susceptible Strains. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e9947.
8. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido/Washington C. Winn Jr. ... [et al.] ; revisão técnica Eiler Fritsch Toros ; tradução Eiler Fritsch Toros [et al.]. 6.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

9. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):1254-63.
10. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:751-62.
11. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth information supplement, document M100-S20. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2010.
12. Marais E, Jong G, Ferraz V, Maloba B, Dusé AG. Interhospital transfer of pan-resistant *Acinetobacter* strains in Johannesburg, South Africa. *Am J Infect Control*. 2004;32(5):278-81.
13. Bush K, Jacoby GA. Update Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
14. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(5):1681-8.
15. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(4):315-21.
16. Karthika RU, Rao RS, Sahoo S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, et al. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. *J Med Microbiol*. 2009;58:430-5.
17. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM. Boletim Informativo. 1.<sup>a</sup> ed.; 2009.
18. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3403-6.

19. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2001-4.
20. Yang HY, Lee HJ, Suh JT, Lee KM. Outbreaks of Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing OXA-23  $\beta$ -Lactamase in a Tertiary Care Hospital in Korea. *Yonsei Med J*. 2009;50(6):764-70.
21. Choi WS, Kim SH, Jeon EG, Son MH, Yoon YK, Kim JY, et al. Nosocomial Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Intensive Care Units and Successful Outbreak Control Program. *J Korean Med Sci*. 2010;25:999-1004.
22. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, et al. OXA-24 Carbapenemase Gene Flanked by XerC/XerD-Like Recombination Sites in Different Plasmids from Different *Acinetobacter* Species Isolated during a Nosocomial Outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2724-7.
23. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(8):2385-92.
24. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother*. 2003;52:140-1.
25. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.
26. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*, 2006;10(R27):1-13.
27. Solh AAE, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:229-38.
28. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation R. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*. 2007;1-10.
29. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):449-65.

30. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP. Decreased Susceptibility to Polymyxin B during Treatment for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1611-12.
31. Zavascki AP, Li J; Nation RL, Superti SV, Barth AL, Ramos F, et al. Stable Polymyxin B Susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. despite Persistent Recovery of These Organisms from Respiratory Secretions of Patients with Ventilator-Associated Pneumonia Treated with This Drug. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):3064-65.
32. Heijden IM, Levin AS, Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, et al. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007;6(8):1-7.
33. Barrow K, Kwon DH. Alterations in Two-Component Regulatory Systems of *phoPQ* and *pmrAB* Are Associated with Polymyxin B Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5150-54.
34. Moore RA, Chan L, Hancock REW. Evidence for Two Distinct Mechanisms of Resistance to Polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;26(4):539-45.

## 4 MANUSCRITO 3

### Detecção de MβL em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.<sup>3</sup>

#### Resumo

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença das MβLs do tipo IMP-1 e SPM-1 em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e avaliar a diferentes testes para a detecção fenotípica desse mecanismo de resistência. 79 isolados clínicos de *P. aeruginosa* e 22 de *Acinetobacter* spp. foram submetidos aos testes fenotípicos de disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge modificado. Através da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi detectada a presença dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub> em 4,95 % e ,8,91 % dos isolados, respectivamente. Todos os isolados que apresentaram o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> eram do gênero *Acinetobacter*. Detectou-se, pela primeira vez, a presença do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> em isolados de *Acinetobacter* spp. A subjetividade e a grande variabilidade de resultados apresentados pelos métodos fenotípicos de detecção de MβL inviabilizou a determinação do melhor teste para a detecção dessa resistência.

#### Abstract

The aim of this study was to verify the presence of MβLs type IMP-1 and SPM-1 in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated at the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) and evaluate the different tests for the detection of phenotypic resistance mechanism. 79 strains of *P. aeruginosa* and 22 strains of *Acinetobacter* spp. were tested for phenotypic double-disc synergy test, combined disc test and modified Hodge synergy test. By PCR we detected the presence of genes *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> at 4.95% and 8.91% strains, respectively. All strains with the gene *bla*<sub>IMP-1</sub> were from the genus *Acinetobacter*. Was

---

<sup>3</sup> Manuscrito a ser submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

detected the first time the gene *bla*<sub>SPM-1</sub> in strains of *Acinetobacter* spp. The subjectivity and variability of results obtained by phenotypic methods of detecting impaired MβL determining the best test for the detection of this resistance.

## Introdução

A importância clínica dos bacilos gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) tem aumentado significativamente em virtude da gravidade das infecções, do aumento das taxas de morbimortalidade nos pacientes acometidos por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e das elevadas taxas de resistência que estes microrganismos vêm apresentando aos antimicrobianos. A detecção preliminar da resistência é importante para o controle das infecções e para a orientação terapêutica adequada (MAGALHÃES, LINS, MAGALHÃES, 2005).

Diversos mecanismos descrevem a resistência das bactérias gram-negativas frente aos β-lactâmicos. Entre eles destacam-se: i) os mecanismos de impermeabilidade às drogas, seja por alterações das proteínas de membrana externa ou por bombas de efluxo; ii) alteração do sítio de ação, como a alteração de proteínas ligadoras de penicilinas e iii) a produção de β-lactamases, enzimas capazes de clivar o núcleo ativo destes agentes, permitindo assim que a parede bacteriana possa ser formada (WALSH et al., 2005).

A detecção de algumas β-lactamases em bactérias gram-negativas merece atenção, especialmente as β-lactamases de espectro estendido (ESBL), as β-lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC) e as carbapenemases (LIVERMORE, 1995). Dentre as carbapenemases, as mais temidas por seu amplo espectro de atividade contra os β-lactâmicos são as metalo-β-lactamases (MBL) (WALSH et al., 2005).

Várias implicações clínicas e epidemiológicas derivam do surgimento e da rápida disseminação de MBL em patógenos de grande importância clínica, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e enterobactérias. Quando há presença desta enzima a terapêutica efetiva dá-se, muitas vezes, apenas com o uso de polimixinas, já que as MBL apresentam resistência a todos β-lactâmicos (exceto ao monobactâmico aztreonam) e aos inibidores de β-lactamases, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (BUSH, 2001; WALSH et al., 2005).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos representam a classe mais utilizada clinicamente devido à sua baixa toxicidade e à grande variedade de compostos disponíveis. Esta classe inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (KONEMAN et al., 2008). Nesse sentido, um dos principais interesses em detectar as MBL seria contra indicar o uso de carbapenêmicos, os quais constituem a terapia de escolha para pacientes com infecção hospitalares graves ou aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes a penicilinas e cefalosporinas disponíveis (WALSH et al., 2005; BERTONCHELI, 2008).

Em virtude disso, a detecção desses isolados produtores de MBL tem grande importância na determinação da melhor opção de tratamento para cada paciente, na menor pressão seletiva e no controle das IRAS (BERTONCHELI, 2008).

Os hospitais-escola têm apresentado maior número de infecções do que outros hospitais, por tratar-se de hospitais de referência nas regiões onde se localizam, recebem um grande número de pacientes e albergam, frequentemente, os pacientes mais graves. Além disso, a clientela usuária pertence, normalmente, a uma camada populacional mais carente, economicamente, que, além da doença específica, traz consigo deficiências relativas ao seu estado nutricional, higiênico... repercutindo em debilidades no sistema imunológico (PEREIRA, MORIYA, GIR, 1996).

Necessita-se, nesse contexto, da padronização de um método acurado para a detecção laboratorial das infecções por BGN-NF produtores de MBL, pois não existe, um consenso entre os diferentes autores e até o momento, nem o 'Clinical Laboratory Standards Institute' (CLSI), nem outros comitês internacionais, sugerem um teste para a detecção desta resistência (PICÃO, 2007).

## **Material e Métodos**

**Seleção dos microrganismos.** Durante o período de abril a junho de 2009 foram isoladas no Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, 79 *P. aeruginosa* e 22 *Acinetobacter* spp. A identificação foi realizada utilizando a automação – MicroScan® – Siemens. Os isolados foram armazenadas em caldo triptona de soja 15% de glicerol à -20 °C.

**Testes fenotípicos.** Os testes fenotípicos para pesquisa de M $\beta$ L foram realizados em placa de ágar Mueller Hinton (Himedia®) previamente inoculada com uma suspensão do isolado

clínico em concentração equivalente à escala 0,5 de *McFarland*. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C durante 24h.

**Teste fenotípico de disco aproximação.** Foram utilizados os antimicrobianos ceftazidima (Sensidisc<sup>®</sup> – DME) e imipenem (Sensidisc<sup>®</sup> – DME) como substratos. Sobre discos de papel filtro adicionou-se 3µL do IMβL: EDTA 0,5 M; MPA 1,4 mM e MPA não diluído. As distâncias testadas foram 1,5 cm; 2,0 cm e 2,5 cm para cada IMβL. O surgimento de sinergismo no halo de inibição de crescimento da bactéria teste na região do ágar onde houve a difusão do IMβL foi considerado positivo para a produção de MβL.

**Teste fenotípico de disco combinado.** Neste método dois discos de imipenem (Sensidisc<sup>®</sup> – DME) e dois discos de ceftazidima (Sensidisc<sup>®</sup> – DME) foram utilizados como substratos. Sobre um dos discos foram adicionados 3µL do IMβL. Foram testados: EDTA 0,5M e MPA não diluído e MPA 1,4mM. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura dos halos de inibição. Considerou-se teste positivo um aumento  $\geq 7$ mm na zona de inibição apresentada pelos discos de substratos β-lactâmicos contendo o IMβL quando comparada àquela produzida pelos discos de β-lactâmicos isoladamente.

**Teste de Hodge modificado.** Uma placa contendo ágar Mueller Hinton (Himedia<sup>®</sup>) foi inoculada com uma suspensão em concentração equivalente à escala 0,5 de *McFarland* da cepa *E. coli* ATCC 25922. No centro desta placa foi disposto o disco de um carbapenêmico (foram testados, imipenem, meropenem e ertapenem). Com o auxílio de uma alça 3-5 colônias do isolado clínico foram inoculadas em linha reta até a borda do disco. Após o período de incubação, (24h a  $35 \pm 2$  °C), o crescimento bacteriano foi analisado. Um maior crescimento na intersecção da linha com a zona de inibição foi considerado positivo para a produção de carbapenemase.

**Testes genotípicos.** A técnica da PCR para detecção da presença ou ausência dos genes que codificam as MβLs foi realizada utilizando-se os *primers* específicos para a amplificação dos genes de MβL *bla*<sub>IMP-1</sub> e *bla*<sub>SPM-1</sub>.

**Extração do DNA.** A extração do DNA foi realizada através do método de fervura e através do método com brometo de cetil trimetil amônio (CTAB – cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) a partir da adaptação de protocolos já estabelecidos (VAN SOOLINGEN et al., 1991; AUSUBEL et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2004; FRESCHI, CARVALHO, OLIVEIRA, 2005; SCHEFFER, 2008; AGUILAR, 2009; OLIVEIRA, 2009). Além da extração do DNA dos isolados clínicos, procedeu-se à extração do DNA de cepas controles: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (controle negativo), *P. aeruginosa* SPM-1 (controle positivo para a detecção do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>) e *P. aeruginosa* IMP-1 (controle positivo para a

detecção do gene *bla<sub>IMP-1</sub>*). O DNA extraído através dos dois métodos foi quantificado utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c<sup>®</sup> (Thermo Scientific). Posteriormente, procedeu-se à diluição do DNA em tampão Tris-EDTA (TE), a fim de obter-se a concentração final de 50 ng/μL a ser utilizada na reação em cadeia da polimerase.

**Extração por fervura.** O protocolo de extração do DNA utilizando-se a fervura foi adaptado a partir dos métodos descritos por Aguilar (2009), Freschi, Carvalho, Oliveira (2005), Nogueira et al. (2004) e Scheffer (2008) (NOGUEIRA et al., 2004; FRESCHI, CARVALHO, OLIVEIRA, 2005; SCHEFFER, 2008; AGUILAR, 2009). A partir do crescimento *overnight* em meio não seletivo (utilizou-se ágar triptona de soja) preparou-se uma suspensão com 4 a 5 colônias do isolado clínico e 500μL de água milli Q autoclavada. Posteriormente, essa suspensão foi fervida por 15 minutos e, em seguida, submetida a banho de gelo durante 5 minutos. Após centrifugação a 11000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e congelado a -20 °C.

**Extração com CTAB.** A extração com CTAB foi realizada conforme adaptações estabelecidas por Oliveira, 2009 (OLIVEIRA, 2009), o qual realizou modificações nos protocolos descritos por van Soolingen et al., 1991 e por Ausubel et al., 1998 (VAN SOOLINGEN et al., 1991; AUSUBEL et al., 1998). Para o presente estudo, as modificações realizadas nesse protocolo elaborado por Oliveira, 2009 foram o cultivo inicial da bactéria em ágar triptona de soja e a retirada da etapa da utilização da enzima RNase.

**Reação em cadeia da polimerase.** Após a padronização das reações, a PCR foi realizada utilizando-se os termocicladores PCR Express<sup>®</sup> (Thermo Hybaid) e MJ96G<sup>®</sup> (Biocycler).

**Gene *bla<sub>SPM-1</sub>*.** Para a detecção da presença do gene *bla<sub>SPM-1</sub>* foi utilizado o par de primers 5'– CCTACAATCTAACGGCGACC –3' e 5'– TCGCCGTGTCCAGGTATAAC –3' para a amplificação de uma sequência de 650 pares de bases (pb) (QUEENAN, BUSH 2007). A mistura da PCR (mix) foi preparada utilizando-se 2,5 μL do DNA 50 ng/μL (amostra), 2,5 μL de tampão de reação 10X (Fermentas), 0,5 μL de kit dNTP set 10mM (Ludwig Biotec), 1,5 μL MgCl<sub>2</sub> 25mM (Fermentas), 1 μL primer SPM-1 *forward* 10 pmol/μL, 1 μL primer SPM-1 *reverse* 10 pmol/μL, 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U/μL (Fermentas), e água para completar volume final de 25 μL. As condições da reação foram as seguintes: 5 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (52 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), finalizando com um período de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

**Gene *bla<sub>IMP-1</sub>*.** Para a detecção da presença do gene *bla<sub>IMP-1</sub>* foi utilizado o par de primers 5'– TGAGCAAGTTATCTGTATTC –3' e 5'– TTAGTTGCTTGGTTTTGATG –3' para a

amplificação de uma sequência de 740 pares de bases (pb) (QUEENAN, BUSH 2007). A mistura da PCR (mix) foi preparada utilizando-se 2,5 µL do DNA 50 ng/µL (amostra), 2,5µL de tampão de reação 10X (Fermentas), 0,5 µL de kit dNTP set 10mM (Ludwig Biotec), 2,0 µL MgCl<sub>2</sub> 25mM (Fermentas), 1 µL primer SPM-1 *forward* 10 pmol/µL, 1 µL primer SPM-1 *reverse* 10 pmol/µL, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U/µL (Fermentas), e água para completar volume final de 25 µL. As condições da reação foram as seguintes: 5 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (44 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), finalizando com um período de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

**Eletroforese em gel de agarose.** A avaliação dos amplicons de cada reação foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Para cada amostra, 10 µL do produto da PCR foi misturado com 2 µL do tampão de carregamento (*loading buffer*). Dez microlitros dessa mistura, de cada amostra, foram aplicados na cavidade do gel sendo o mesmo submetido a uma tensão de 5 volts/cm durante uma hora e meia em um sistema de eletroforese horizontal. Após a corrida eletroforética, os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em luz UV e seus tamanhos foram comparados com os respectivos controles e com o marcador de peso molecular (Ladder 100 pb – Ludwig Biotec).

**Cepas controle.** As cepas controle utilizadas foram: *Klebsiella pneumoniae* IMP-1, *P. aeruginosa* IMP-1, *P. aeruginosa* SPM-1 e *K. pneumoniae* KPC-1 (para o teste de Hodge modificado), cedidas gentilmente pelo Laboratório Médico Santa Luzia de Florianópolis – SC.

## Resultados e discussão

Através da PCR foi detectada a presença dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub> em 4,95 % e 8,91 % dos isolados, respectivamente. Em relação ao método de extração, 5 isolados de *Acinetobacter* spp. extraídos por fervura produtores de SPM-1 não foram detectadas. E um isolado produtor de IMP-1 do mesmo gênero bacteriano extraído com CTAB não foi detectado.

A Tabela 1 mostra a comparação entre os resultados obtidos pelos testes fenotípicos (disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge modificado) nas amostras positivas pelos testes genotípicos. O teste do disco combinado, tanto com EDTA 0,5M quanto com o MPA não diluído, com os dois substratos, ceftazidima e imipenem, detectou oito dos nove isolados clínicos produtores de MβL do tipo IMP-1. Por outro lado, o teste de disco aproximação não detectou nenhum microrganismo produtor desse tipo de MβL.

Embora tenha sido analisado, no presente estudo, um grande número de variações nas metodologias dos testes fenotípicos, tais como distâncias diferentes (1,5 cm, 2,0 cm e 2,5 cm), tipo de IMβL em diferentes concentrações (EDTA 0,5M, MPA 1,4mM e MPA não diluído) e substratos β-lactâmicos (imipenem e ceftazidima); os resultados obtidos foram bastante diversos. A determinação da melhor metodologia para a detecção de isolados produtores de MβLs foi bastante dificultada, especialmente em relação ao teste de disco aproximação, pela subjetividade de leitura dos resultados, pelo grande número de resultados de interpretação duvidosa e devido ao elevado número de resultados falsos positivos.

Os valores de SN, SP, VPP e VPN foram calculados para avaliar a acurácia dos testes fenotípicos segundo a detecção por PCR dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub>. Nas Tabelas 2 e 3 estão representados todos os resultados de SN, SP, VPP e VPN, para a detecção fenotípica de MβL por disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge modificado, para os isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., respectivamente.

Para a detecção da MβL do tipo SPM-1 em *P. aeruginosa* o teste que apresentou melhores resultados foi o teste de disco aproximação com o inibidor MPA não diluído, a distância de 2,0cm combinados ao substrato ceftazidima. Os melhores resultados encontrados por Picão et al., em 2007, na detecção de isolados produtores de MβL, também ocorreram com a utilização da ceftazidima como substrato (PICÃO, 2007). Já para a detecção da MβL do tipo IMP-1 nos isolados de *Acinetobacter* spp. o teste que apresentou melhor sensibilidade

foi o de disco combinado com EDTA 0,5M, entretanto o percentual da especificidade foi de apenas 38,5.

Apesar de os métodos fenotípicos serem mais simples de executar e mais baratos que os métodos genotípicos, eles têm mostrado resultados discordantes dependendo da metodologia empregada, dos substratos  $\beta$ -lactâmicos, dos IM $\beta$ Ls e do gênero bacteriano testado (PICÃO et al., 2008). Estudos realizados por Magalhães et al., em 2005, demonstraram que os IM $\beta$ L, EDTA e MPA, foram igualmente eficientes na neutralização das M $\beta$ Ls (MAGALHÃES, LINS, MAGALHÃES, 2005). Já em trabalhos realizados por Picão et al., em 2008, o MPA proporcionou maior aumento nas zonas de inibição e apresentou melhores resultados (PICÃO et al., 2008). Em estudo realizado em dois hospitais do Rio Grande do Sul (Porto Alegre e Região do Vale dos Sinos), em 2009, no qual foi avaliada a detecção de M $\beta$ L por diferentes testes fenotípicos, concluiu-se que alguns isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1 não foram detectadas pelo teste de disco aproximação utilizando-se ceftazidima e MPA. Para aumentar a sensibilidade dos testes para a detecção da presença de M $\beta$ L os autores sugerem o uso de testes fenotípicos com EDTA ou a combinação de testes (WIRTH et al., 2009).

Ao contrário dos satisfatórios resultados de sensibilidade e especificidade, 100% e 88%, respectivamente, encontrados por Lee et al. (2001), o teste de Hodge modificado, no presente estudo, apresentou resultados de sensibilidade bastante baixos (33% para a detecção de SPM-1 em *P. aeruginosa* e 12,5% para a detecção de IMP-1 em *Acinetobacter* spp.) (Tabelas 2 e 3) (LEE et al., 2001). Apesar de diferentes estudos relatarem elevados valores de sensibilidade para o teste de Hodge modificado, uma desvantagem é a impossibilidade de distinção entre as diferentes classes de carbapenemases (classes A, B e D) que são detectadas através desse teste (LEE, 2001; STUART, 2010).

Outro ponto a ser considerado é que no presente estudo foram incluídos todos os isolados clínicos dos gêneros bacterianos aqui pesquisados, inclusive aqueles sensíveis à ceftazidima e imipenem, pois, conforme relatado por outros estudos, até mesmo isolados sensíveis podem ser produtoras de M $\beta$ Ls (FRANKLIN, LIOLIOS, PELEG, 2006; SCHEFFER, 2008).

IMP-1 e SPM-1 são as principais M $\beta$ Ls disseminadas nos hospitais brasileiros, além disso, acredita-se que o gene *bla*<sub>SPM-1</sub> esteja relacionado apenas à espécie *P. aeruginosa* (GALES et al., 2003; POIREL, NORDMANN, 2006; PICÃO, 2007; SCHEFFER, 2008; FIORILLI et al., 2010; LARANJEIRA et al., 2010). No presente estudo, porém, detectou-se a

presença desse gene em dois isolados de *Acinetobacter* spp. e acredita-se ser este, o primeiro relato da presença do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> nessa espécie bacteriana.

Além disso, cabe ressaltar que todos os isolados que apresentaram o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> eram do gênero *Acinetobacter*. A presença dos genes que codificam as MβLs nesse gênero bacteriano preocupa em virtude do elevado potencial que esse microrganismo apresenta em resistir a dessecação além de adquirir resistência, principalmente através de elementos genéticos móveis como plasmídeos e íntegrans. Esses fatores podem contribuir para que esse microrganismo sirva de reservatório para importantes genes de resistência aos antimicrobianos, como os que codificam as MβLs (HOUANG et al., 2001; FOURNIER, RICHET, 2006; KARAGEORGOPOULOS, FALAGAS, 2008; MARAGAKIS, PERL, 2008; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008).

## Conclusões

A padronização de um método acurado para a detecção de isolados produtores de MβL faz-se necessária, principalmente devido à limitação das opções terapêuticas à grande capacidade de disseminação de elementos genéticos nos quais as MβLs são comumente encontradas.

A partir do presente estudo conclui-se que a interpretação dos resultados dos testes de disco aproximação é mais subjetiva que a do disco combinado, além disso, o elevado número de resultados falso positivos não permite a sua utilização como método de detecção na rotina laboratorial. Além disso, a subjetividade e a grande variabilidade de resultados apresentados pelos métodos fenotípicos de detecção de MβL inviabilizou a determinação do melhor teste para a detecção dessa resistência.

A presença dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub>, nos BGN-NF *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. em nossa Instituição é preocupante, principalmente pelo fato de que estes microrganismos podem atuar como reservatórios dos mecanismos de resistência estudados.

Tabela 1 - Comparação entre os resultados obtidos pelos testes fenotípicos (disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge) nas amostras positivas pelos testes genotípicos

Isolado n°	PCR		Disco Aproximação						Disco Combinado			Teste Hodge	
	SPM	IMP	EDTA 0,5M 1,5cm	EDTA 0,5M 2,0cm	EDTA 0,5M 2,5cm	MPA 1,4mM	MPA ñ diluído 1,5cm	MPA ñ diluído 2,0cm	MPA ñ diluído 2,5cm	EDTA 0,5M	MPA 1,4mM		MPA ñ diluído
P. 54	+	—	Caz +	—	—	—	Caz Duv	Caz +	Caz Duv	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—
P. 64	+	—	Caz +	—	—	—	Caz Duv	Caz +	Caz +	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	Etp +
P. 68	+	—	Caz e Ipm Duv	Caz e Ipm Duv	—	—	—	Caz +	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—
A. 88	+	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm Duv	—	—	—	—	—
A. 100	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm Duv	—	—	Caz +	—
A. 19	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A. 31	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	Ipm +	Caz e Ipm +	—
A. 34	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—
A. 47	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—
A. 60	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—
A. 92	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—
A. 102	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	Etp e Ipm +
A. 111	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	Ipm Duv
A. 112	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Caz e Ipm +	—	Caz e Ipm +	—

(Caz) ceftazidima      (Ipm) imipenem      (Etp) ertapanem      (+) positivo      (—) negativo      (Duv) resultado duvidoso

(P.) *Pseudomonas aeruginosa*      (A.) *Acinetobacter* spp.

Tabela 2 – Resultados percentuais de especificidade (SP), sensibilidade (SN), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para a detecção das MβLs do tipo SPM-1 e IMP-1 por disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge modificado, nos 79 isolados de *P. aeruginosa*

		Disco aproximação							Disco combinado			Teste de Hodge
		EDTA 0,5M 1,5cm	EDTA 0,5M 2,0cm	EDTA 0,5M 2,5 cm	MPA 1,4mM (todas as distâncias)	MPA não diluído 1,5cm	MPA não diluído 2,0cm	MPA não diluído 2,5cm	EDTA 0,5M	MPA 1,4mM	MPA não diluído	
SPM-1	SP	85,9	86,7	100	100	94,7	93,2	91,8	72,4	97,4	75	100
	SN	100	—	—	—	—	100	50	100	—	100	33,3
	VPP	20	—	—	—	—	37,5	14,3	12,5	—	13,6	100
	VPN	100	96,3	100	100	98,6	100	98,5	100	96,1	100	97,4
IMP-1	SP	83	87,1	100	100	94,7	89,6	90,7	69,6	97,5	72,1	98,7
	SN	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	VPP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	VPN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Duv. n (%)		20 (25,3%)	17 (21,5%)	15 (18,9%)	0	3 (3,8%)	2 (2,5%)	4 (5,1%)	0	0	0	0
(Duv.) resultados duvidosos		(—) zero ou não puderam ser calculados por resultarem em divisão por zero										

Tabela 3 – Resultados percentuais de especificidade (SP), sensibilidade (SN), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para a detecção das MβLs do tipo SPM-1 e IMP-1 por disco aproximação, disco combinado e teste de Hodge modificado, nos 22 isolados de *Acinetobacter* spp.

		Disco aproximação						Disco combinado			Teste de Hodge	
		EDTA 0,5M 1,5cm	EDTA 0,5M 2,0cm	EDTA 0,5M 2,5 cm	MPA 1,4mM (todas as distâncias)	MPA não diluído 1,5cm	MPA não diluído 2,0cm	MPA não diluído 2,5cm	EDTA 0,5M	MPA 1,4mM		MPA não diluído
SPM-1	SP	100	100	100	100	100	100	100	20	95	10	94,7
	SN	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	—
	VPP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,2	—
	VPN	90,9	90,9	90,9	90,9	90,5	95,2	95,2	66,7	90,5	66,7	90
IMP-1	SP	100	100	100	100	100	100	100	38,5	100	15,4	100
	SN	—	—	—	—	—	—	—	88,9	11,1	88,9	12,5
	VPP	—	—	—	—	—	—	—	50	100	42,1	100
	VPN	59,1	59,1	59,1	59,1	57,1	57,1	57,1	83,3	61,9	66,7	65
Duv. n (%)		0	0	0	0	1 (4,5%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	0	0	0	1 (4,5%)
(Duv.) resultados duvidosos		(—) zero ou não puderam ser calculados por resultarem em divisão por zero										

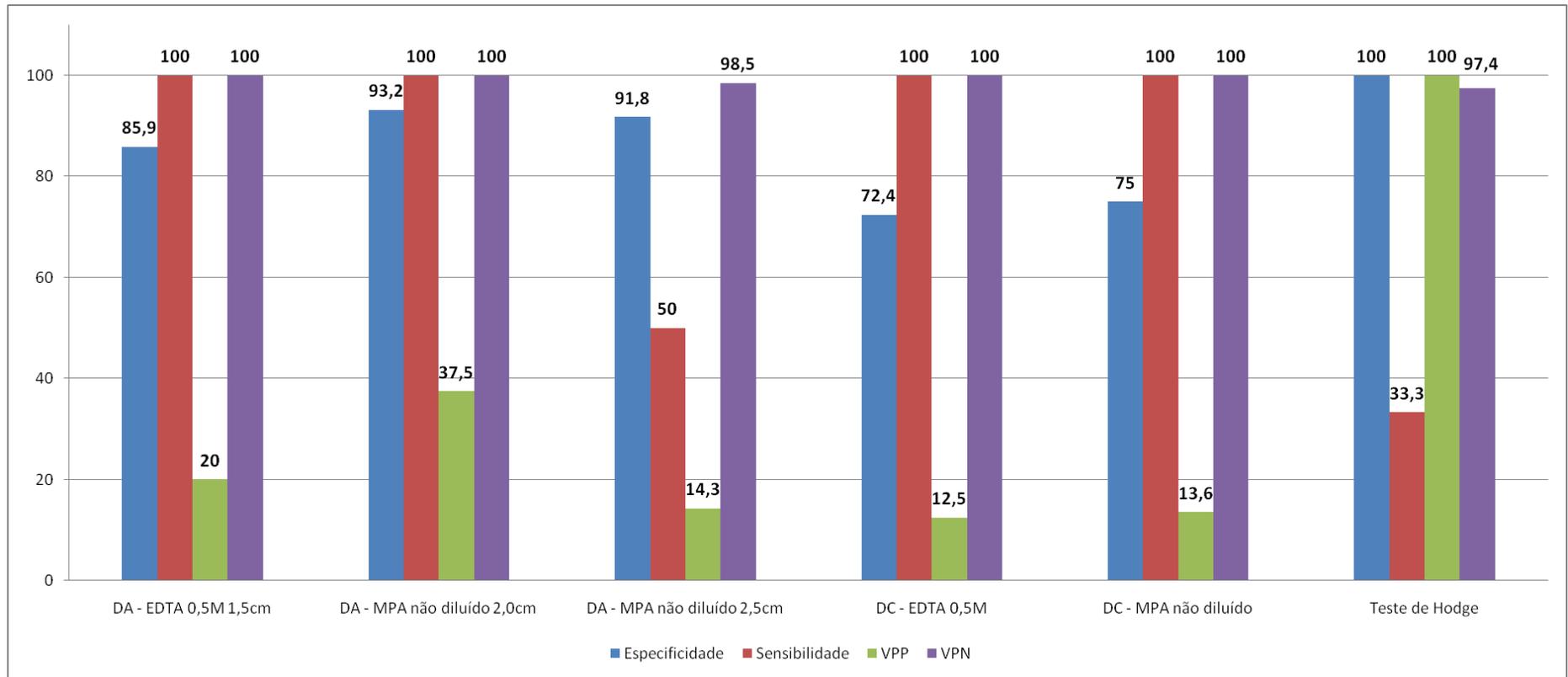


Gráfico 1 – Maiores percentuais de sensibilidade obtidos através dos testes fenotípicos disco aproximação (DA), disco combinado (DC) na detecção da MβL tipo SPM-1 nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*

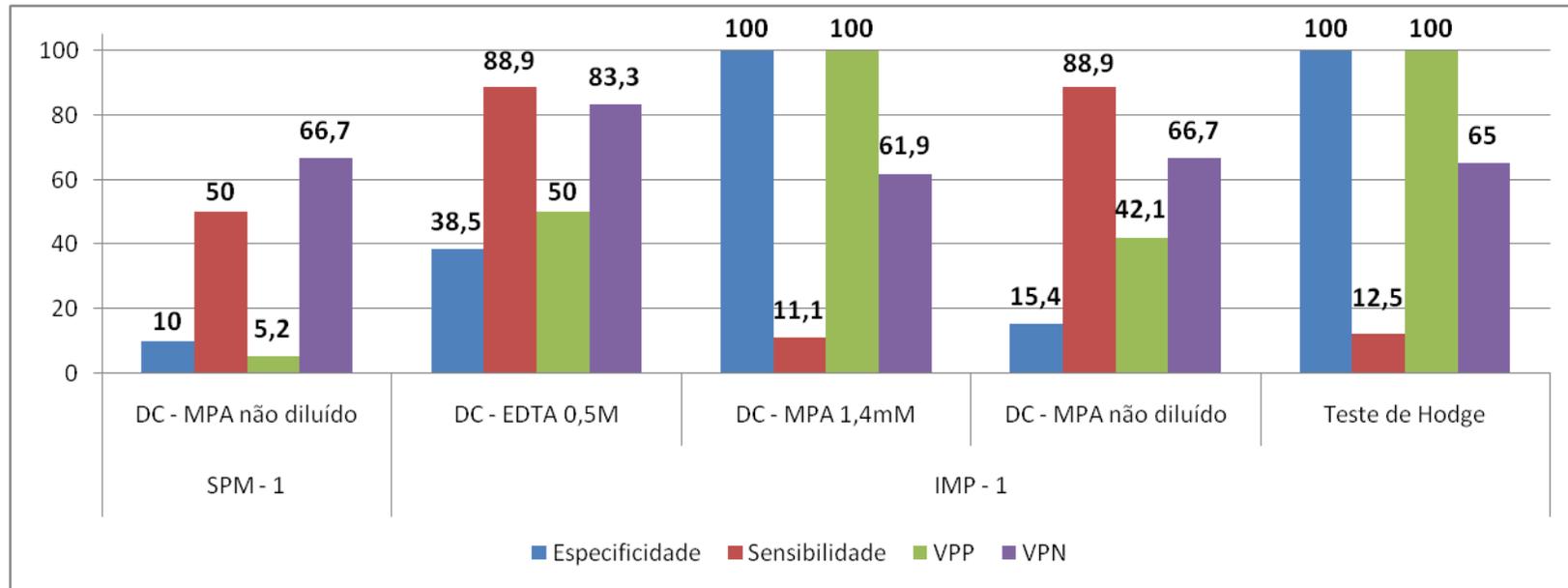


Gráfico 2 – Maiores percentuais de sensibilidade obtidos através dos testes fenotípicos disco aproximação (DA), disco combinado (DC) na detecção da MβL tipo SPM-1 e IMP-1 nos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

## Referências

AGUILAR, M. A. P. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Farmácia – Análises Clínicas. São Paulo, 2009.

AUSUBEL, F. et al. **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons, Inc., 1998.

BERTONCHELI, C. M.; **Identificação de Metallo-beta-Lactamases em Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores Isolados no Hospital Universitário de Santa Maria**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Santa Maria, 2008.

BUSH, K. New  $\beta$ -lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p. 1085-1089, 2001.

FIORILLI, G. et al. Emergence of metallo- $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter* spp. clinical isolates from Argentina. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v.23, n.2, p.100-102, 2010.

FRANKLIN, C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A. Y. Phenotypic Detection of Carbapenem-Susceptible Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p.3139-3144, 2006.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. **Clinical of Infectious Diseases**, v.42, p.692-699, 2006.

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

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.699-702, 2003.

HOUANG, E. T. S. et al. Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p. 228-234, 2001.

KARAGEROGOPOULOS, D. E.; FALAGAS, M. E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **The Lancet Infectious Diseases**. v.8, p.751-762, 2008.

LARANJEIRA, V. D. S. et al. Pesquisa de *Acinetobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- $\beta$ -lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande de Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.4, p. 462-464, 2010.

- LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.7, p.88-102, 2001.
- LIVERMORE, D.M.  $\beta$ -lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.557-584, 1995.
- MAGALHÃES, V.; LINS, A. K.; MAGALHÃES, M. Metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.123-125, 2005.
- MARAGAKIS, L. L.; PERL T. M. Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. **Antimicrobial Resistance**, v.46, p.1254-1263, 2008.
- NOGUEIRA, C. A. M. et al. Desempenho de *kits* comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.6, n.2, p.35-48, 2004.
- OLIVEIRA, C. F. **Prevalência das famílias TEM, SHV, CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Santa Maria, 2009.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.
- PEREIRA, M. S.; MORIYA, T. M.; GIR, E. Infecção hospitalar nos hospitais escola: uma análise sobre seu controle. **Revista Latino-americana de enfermagem**, v.4, n.1, p. 45-62, 1996.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology Infection**, v.12, n.9, p.826-836, 2006.
- PICÃO, R. C. et al. Metallo- $\beta$ -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.46, n.6, p.2028-2037, 2008.
- PICÃO, R. C.; **Avaliação Comparativa da Acurácia de Diferentes Testes Fenotípicos para a Detecção de Amostras Produtoras de Metallo- $\beta$ -lactamases.** Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação Ciências Básicas em Infectologia. São Paulo, 2007.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.3, p.440-458, 2007.
- SCHEFFER, M. C. **Genotipagem e pesquisa de metallo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.** Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Dissertação (Mestrado). Curitiba, 2008.

STUART, J. C. et al. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p. 205-210, 2010.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.11, p.2578-2586, 1991.

WALSH, T. R. et al. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p. 306-325, 2005.

WIRTH, F. W. et al. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.3, p.170-172, 2009.

## 4 DISCUSSÃO GERAL

*P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter* representam patógenos gram-negativos amplamente distribuídos na natureza e no ambiente hospitalar. Além disso, a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos compromete seriamente o tratamento, com relatos de isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a todos os antimicrobianos testados (BONOMO, SZABO, 2006; FIGUEIREDO et al., 2009).

O aumento de sua freqüência na etiologia das IRAS despertou recente atenção por parte dos clínicos e pesquisadores em geral. Além disso, a resistência que ambos os gêneros apresentam frente a diferentes antimicrobianos, somada à sua habilidade em desenvolver novos mecanismos de resistência, inclusive aos carbapenêmicos, comprometeu seriamente o tratamento dos pacientes infectados com estes patógenos (JEAN, 2002; BONOMO, SZABO, 2006; JEONG, 2006; FIGUEIREDO et al., 2009).

*P. aeruginosa* revela-se como um fenômeno de resistência aos antimicrobianos e demonstra praticamente todos os conhecidos mecanismos enzimáticos e mutacionais de resistência bacteriana. A baixa permeabilidade de sua membrana externa, a expressão consecutiva de várias bombas de efluxo com ampla especificidade de substrato,  $\beta$ -lactamases AmpC cromossômicas e plasmidiais como ESBL além da produção de M $\beta$ L são alguns dos mecanismos de resistência que podem existir simultaneamente ou em várias combinações (STRATEVA, YORDANOV, 2009).

Nesse contexto, verificou-se, no presente estudo, que os isolados de *P. aeruginosa* estudados apresentaram elevada taxa de produção de AmpC. A resistência aos carbapenêmicos encontrada já não assegura mais esta classe de antimicrobianos na listagem da terapia empírica das infecções causadas por *P. aeruginosa*. Além disso, em relação ao perfil de sensibilidade do antimicrobiano polimixina B, apesar da maioria dos bacilos gram-negativos multirresistentes ser sensível a esse antimicrobiano, a resistência devido ao aumento do seu uso tem se mostrado um problema emergente (GALES, JONES, SADER; 2006). Nosso estudo revelou que a resistência à polimixina B está presente nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* de nossa Instituição.

A grande capacidade de disseminação de elementos genéticos nos quais as M $\beta$ LS são comumente encontradas é preocupante, uma vez que esses eventos poderiam alcançar maiores proporções de disseminação, até mesmo entre diferentes espécies. Isto acarretaria um

importante impacto clínico, pois limitaria as opções terapêuticas para os casos de IRAS causadas por bacilos gram-negativos, tais como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias, restringindo-as às polimixinas (CORNAGLIA et al., 2007).

Através da PCR foi detectada a presença dos genes *bla<sub>SPM-1</sub>* e *bla<sub>IMP-1</sub>* em 4,95 % e 8,91 % dos isolados, respectivamente. Todos os isolados clínicos que apresentaram o gene *bla<sub>IMP-1</sub>* eram do gênero *Acinetobacter*. Dado que preocupa, em virtude da possibilidade de *Acinetobacter* spp. atuar, em nossa Instituição, como reservatório desse mecanismo de resistência.

A detecção laboratorial das infecções por isolados produtores de MβL necessita da padronização de um método acurado, pois não existe, nesse contexto, um consenso entre os diferentes autores e até o momento, nem o CLSI, nem outros comitês internacionais, sugerem um teste para a detecção desta resistência (ANDRADE et al., 2007; PICÃO, 2007; PICÃO et al., 2008). No presente estudo, os resultados obtidos através dos testes fenotípicos de detecção de MβL mostraram-se bastante variados e, em muitos casos, de interpretação duvidosa e subjetiva. Além disso, o poder bactericida do inibidor de MβL, conforme relatado no manuscrito 1 da presente dissertação, pode mascarar os resultados dos testes fenotípicos para a detecção de MβL.

Diante disso, são necessários métodos acurados que possam auxiliar a detecção de microrganismos produtores de MβL, tanto para fins diagnósticos como para fins epidemiológicos, uma vez que o detalhado conhecimento das dimensões deste problema pode ser útil para limitar a sua disseminação (WALSH et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2005; ZAVASCKI et al.; 2006; PICÃO et al., 2008).

## 5 CONCLUSÕES

- A resistência aos carbapenêmicos, tanto em *Acinetobacter* spp., quanto em *P. aeruginosa* já não assegura mais esta classe de antimicrobianos na listagem da terapia empírica;
- A resistência à polimixina B, em isolados de *P. aeruginosa*, está presente em nossa Instituição;
- A interpretação dos resultados dos testes de disco aproximação é mais subjetiva que a do disco combinado, além disso, o elevado número de resultados falso positivos não permite a sua utilização como método de detecção na rotina laboratorial;
- A subjetividade e a grande variabilidade de resultados apresentados pelos métodos fenotípicos de detecção de MβL inviabilizou a determinação do melhor teste para a detecção dessa resistência;
- Os genes que codificam as MβLs, especialmente os genes *bla<sub>SPM-1</sub>* e *bla<sub>IMP-1</sub>*, estão presentes nos BGN-NF *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados a partir de amostras clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);
- Os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. do HUSM podem atuar como reservatórios dos mecanismos de resistência estudados, já que todos os isolados que apresentaram o gene *bla<sub>IMP-1</sub>* eram do gênero *Acinetobacter*;
- No presente estudo detectou-se pela primeira vez a presença do gene *bla<sub>SPM-1</sub>* em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, M. A. P. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros.** Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Farmácia – Análises Clínicas. São Paulo, 2009.

AKTAS, Z.; KAYAKAN Ç. B. Investigation of metallo- $\beta$ -lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.40, p.320-325, 2008.

ANDRADE, S. A. et al. Influence of Disk Preparation on Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Isolates by the Combined Disk Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.2058-2060, 2007.

ARAKAWA, Y. et al. Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.40-43, 2000.

AUSUBEL, F. et al. **Current protocols in molecular biology.** John Wiley & Sons, Inc., 1998.

BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic constructin kit for bactéria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.1-4, 1999.

BERGÈS, L. et al. Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and Etest for detecion of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, n.4, p.812-813, 2007.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p.577-599, 2008.

BERTONCHELI, C. M.; **Identificação de Metallo-beta-Lactamases em Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores Isolados no Hospital Universitário de Santa Maria.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Santa Maria, 2008.

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.S49-S56, 2006.

BUSH, K. New  $\beta$ -lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.

CHOI, W.S. et al. Nosocomial Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Intensive Care Units and Successful Outbreak Control Program. **Journal of Korean Medical Sciences**, v.25, p.999-1004, 2010.

Clinical and Laboratory Institute – Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S19 (ISBN 1-56238-556-9) Clinical and Laboratory Institute – 940 - West Valley Road – Suite 1400 - Wayne, Pennsylvania 19087 - 1898 USA, 2009.

COHEN, A. L. et al. Recommendations for Metrics for Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings: SHEA/HICPAC Position Paper. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.10, p.901-913, 2008.

CORNAGLIA, G. et al. Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.380-388, 2007.

DAYASU, H. et al. Expansion of the zinc metallo-hidrolase family of the  $\beta$ -lactamase fold. **Federation of European Biochemical Societies**, v.503, p.1-6, 2001.

DRABICK, J. J. et al. Covalent Polymyxin B Conjugate with Human Immunoglobulin G as an Antidotoxin Reagent. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v.43, n.3, p.583-588, 1998.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of  $\beta$ -lactamases Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p.160-201, 2010.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*, v.10, n.1, p.1-13, 2006.

FIGUEIREDO, D. Q.; et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45,n.3, p.177-84, 2009.

FOURNIER, P. E.; RICHEL, H. The epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities. **Clinical of Infectious Diseases**, v.42, p.692-699, 2006.

FRANKLIN, C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A. Y. Phenotypic Detection of Carbapenem-Susceptible Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p.3139-3144, 2006.

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

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.4, p.315-321, 2006.

JEAN, S.-S. et al. Antimicrobial susceptibilities among clinical isolates of extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria in a Taiwanese University Hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.69-76, 2002.

JEONG, S. H. et al. Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. **Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p.423-31, 2009.

KARAGEORGOPOULOS, D. E.; FALAGAS, M. E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **The Lancet Infectious Diseases**. v.8, p.751-762, 2008.

KARLOWSKY, J. A. et al. Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.5, p.1681-1688, 2003.

KARTHIKA, R. U. et al. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.430-435, 2009.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**/Washington C. Winn Jr. ... [et al.] ; revisão técnica Eiler Fritsch Toros ; tradução Eiler Fritsch Toros [et al.]. 6.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

LANDMAN, D. et al. Polymyxins Revisited. **Clinical Microbiol Reviews**, v.21, n.3, p.449-465, 2008.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.7, p.88-102, 2001.

LINCOPAN, N. et al. First Isolation of Metallo- $\beta$ -lactamase-Producing Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a Patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.516-519, 2005.

LIVERMORE, D.M.  $\beta$ -lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.557-584, 1995.

MAGALHÃES, V.; LINS, A. K.; MAGALHÃES, M. Metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.123-125, 2005.

MAGLIAVACCA, R. et al. Simple microdilution Test for Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase Production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.11, p.4388-4390, 2002.

MARAGAKIS, L. L.; PERL T. M. Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. **Antimicrobial Resistance**, v.46, p.1254-1263, 2008.

MARCHAIM, D. et al. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p.1551-1555 2007.

MOOSDEEN, F. The Evolution of Resistance to Cephalosporins. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, p.487-493, 1997.

NOGUEIRA, C. A. M. et al. Desempenho de *kits* comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.6, n.2, p.35-48, 2004.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.6, p.321-331, 2002.

OLIVEIRA, C. F. **Prevalência das famílias TEM, SHV, CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Santa Maria, 2009.

PAYNE, D. J. et al. Inhibition of Metallo- $\beta$ -Lactamases by a Series of Mercaptoacetic Acid Thiol Ester Derivatives. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.41, n.1, p.135-140, 1997.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. 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. et al. Metallo- $\beta$ -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.46, n.6, p.2028-2037, 2008.

PICÃO, R. C.; **Avaliação Comparativa da Acurácia de Diferentes Testes Fenotípicos para a Detecção de Amostras Produtoras de Metallo- $\beta$ -lactamases.** Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação Ciências Básicas em Infectologia. São Paulo, 2007.

PITOUT, J. D. D. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- $\beta$ -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.3129-3135, 2005.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.3, p.440-458, 2007.

QUINN, J. P. et al. Emergence of resistance to Imipenem During Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.2, p.289-294, 1986.

RICE, L. B. Challenges in Identifying New Antimicrobial Agents Effective for Treating Infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, suppl.2, p.S100-S105, 2006.

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

SALABI, A. EL. et al. First Report of the Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v.54, n.1, p.582, 2010.

SANDERS, C. C.; SANDERS, Jr. W. E.  $\beta$ -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Global Trends and Clinical. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p.824-839, 1992.

SCHEFFER, M. C. **Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos**. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Dissertação (Mestrado). Curitiba, 2008.

SCHEFFER, M. C. et al. Intrahospital spread of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.4, p.367-371, 2010.

SENDA, K. et al. PCR Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in Gram-Negative Rods Resistant to Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactams. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.2909-2913, 1996.

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

TAM, V. H. et al. Prevalence, mechanisms, and risk factor of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p.309-314, 2007.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, n.6A, p.S3-S10, 2006.

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

VAN SOOLINGEN, D. et al. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.11, p.2578-2586, 1991.

WALSH, T. R. et al. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p. 306-325, 2005.

WELDHAGEN, G. F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.8, p.2385-2392, 2003.

WIRTH, F.W. et al. Metallo- $\beta$ -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.3, p.170-172, 2009.

XAVIER, D. E. et al. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -Lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-7, 2010.

YONG, D. et al. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.10, p.3798-3801, 2002.

YONG, D. et al. Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, 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.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. **Journal of Infection Developing Countries**, v.3, n.5, p.335-441, 2009.

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

ZAVASCKI, A. P. et al. The influence of metallo- $\beta$ -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.387-392, 2006.

ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin b for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p.1-10, 2007.

ZAVASCKI, A. P. et al. Stable Polymyxin B Susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. despite Persistent Recovery of These Organisms from Respiratory Secretions of Patients with Ventilator-Associated Pneumonia Treated with This Drug. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.9, p.3064-3065, 2009.

## **ANEXOS**

**ANEXO A – Registro no Comitê de Ética em Pesquisa**

Título do Projeto de Pesquisa: “Identificação de metalo-beta-lactamases no HUSM”

Número de Processo: 23081.01728/2006 – 17

Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 0145.0.243.000-06

Pesquisador Responsável: Rosmari Hörner

Projeto Aprovado em: 05/12/2006

## **ANEXO B – Carta de Apresentação do Manuscrito 1**

### **Evaluation of bacterial growth inhibition by mercaptopropionic acid in metallo- $\beta$ -lactamase detection on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***

Letícia Eichstaedt Mayer, Rosmari Hörner\*, Maisa Kräulich Tizotti, Rosiéli Martini, Magda

Cristina Souza Marques Roehrs, Cláudia Barbisan Kempfer

Bacteriology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, n.1000, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

Letícia Eichstaedt Mayer – e-mail: ticiamayer@yahoo.com.br

Rosmari Hörner – e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

Maisa Kräulich Tizotti – e-mail: maisa\_tizotti@yahoo.com.br

Rosiéli Martini – e-mail: rosifarma@gmail.com

Magda Cristina Souza Marques Roehrs – email: magdafarm@gmail.com

Cláudia Barbisan Kempfer – e-mail: claudiabkempfer@yahoo.com.br

\*Corresponding author: Conde de Porto Alegre, St, Santa Maria, RS, 97015110, Brazil.

Tel/Fax: +55-55-32225291; E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

**Funding:** This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Ministry of Education, Brazil, and Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE, Federal University of Santa Maria.

## ANEXO C – Carta de Aceite do Manuscrito 1



---

### [RSBMT] Avaliação Editorial de Submissão - Aceito

Quarta-feira, 24 de Novembro de 2010

De: Dalmo Correia <dalmo@rsbmt.ufsm.edu.br> [Adicionar a contatos](#)

10:59:19

Para: Rosmari - Hörner <rosmari.ufsm@gmail.com>

Cc: rosmari.ufsm@gmail.com; ticiamayer@yahoo.com.br; maisa\_tizotti@yahoo.com.br; rosifarma@gmail.com; magdafarm@gmail.com; claudiabkempfer@yahoo.com.br

Prezado(a) Dr.(a) Rosmari Hörner

Informamos a conclusão da avaliação do manuscrito "Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo ácido mercaptopropiônico na detecção de metalo- $\beta$ -lactamases em *Acinetobacter baumannii* multirresistente." Nossa decisão é aceitar. Vossa Senhoria será comunicada de cada etapa do processo editorial.

Atenciosamente,  
Prof. Dalmo Correia

-----  
Avaliador A: Trabalho bem conduzido.

1. O artigo está dentro do escopo da revista?  
Sim.
2. Adequação do Título:  
O título está adequado.
3. Adequação do Resumo:  
O resumo está adequado.
4. Relevância e precisão dos métodos, resultados e discussão:  
O método está adequado. Os resultados são relevantes.
5. Adequação de Referências:  
As referências estão adequadas.
6. Qualidade das figuras e tabelas:  
N.s.A.

---

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical  
<http://submission.scielo.br/index.php/rsbmt>

## **ANEXO D – Resumos Publicados em Anais de Congressos**

KUHN, F. T. ; KRONBAUER, M. ; BERTONCHELI, C. M. ; ROEHRS, M. C. S. M. ; DOMINGUES, V. O. ; RIGATTI, F. ; MAYER, L. E. ; HÖRNER, R. . Avaliação da atividade bacteriostática e bactericida do MPA e sua influência nos métodos de disco aproximação e disco combinado no screening para MBL em cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes.. In: In: Primeiro Congresso Latino-Americano de resistência Microbiana - Segunda Jornada Gaúcha de Antimicrobianos e Segunda Jornada de Infecção dos Vales do Taquari e Rio Pardo., 2009, Santa Cruz do Sul - RS. Primeiro Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana - Programa e Livro de Resumos, 2009. p. p. 17.

KRONBAUER, M. ; MAYER, L. E. ; RIGATTI, F. ; PONTELLI, M. C. ; KEMPFER, C. B. ; HÖRNER, R. . Variações na metodologia de disco aproximação para a detecção de MBL. In: 24 Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria, 2009, Santa Maria - RS. Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

SANTOS, S. O. ; MAYER, L. E. ; SANTOS, C. D. S. ; VEIT, A. R. ; KRONBAUER, M. ; KUHN, F. T. ; RIGATTI, F. ; PONTELLI, M. C. ; ROEHRS, M. C. S. M. ; HÖRNER, R. . *Pseudomonas aeruginosa*: Produção de AmpC e perfil de sensibilidade em um hospital terciário. In: XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana, 2010, Porto Alegre - RS - Brasil. XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana - Cd de resumos, 2010.

MAYER, L. E. ; BERTICELLI, C. R. ; DOMINGUES, V. O. ; KRONBAUER, M. ; KUHN, F. T. ; PONTELLI, M. C. ; RIGATTI, F. ; ROEHRS, M. C. S. M. ; VEIT, A. R. ; HÖRNER, R. . Inibição do Crescimento Bacteriano pelo MPA em cepas de *A. baumannii* MDR na pesquisa de MBL. In: XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana, 2010, Porto Alegre - RS - Brasil. Cd de resumos, 2010.

HÖRNER, R. ; MAYER, L. E. ; MARTINI, R. ; TIZOTTI, M.K. ; KEMPFER, C. B. ; SANTOS, S. O. ; RODRIGUES, M.A. ; VEIT, A. R. ; KUHN, F. T. ; GUARNERI, R. . Influência do EDTA na pesquisa de MBL pelo teste do Disco Combinado. In: 2º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2010, Florianópolis - SC. 2º SIMC - CD-Rom, 2010.

MAYER, L. E. ; VEIT, A. R. ; KEMPFER, C. B. ; SOUSA, L.U. ; ROEHRS, M. C. S. M. ; TIZOTTI, M.K. ; MARTINI, R. ; SANTOS, S. O. ; MIELKE, T. P. ; HÖRNER, R. . *Pseudomonas aeruginosa* resistente à polimixina B. In: 2º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2010, Florianópolis - SC. 2º SIMC - CD-Rom, 2010.

SANTOS, S. O. ; VEIT, A. R. ; KEMPFER, C. B. ; KUHN, F. T. ; MAYER, L. E. ; SOUSA, L.U. ; ROEHRS, M. C. S. M. ; KRONBAUER, M. ; TIZOTTI, M.K. ; RODRIGUES, M.A. ; MARTINI, R. ; MIELKE, T. P. ; HÖRNER, R. . Detecção de carbapenemases pelo teste do Hodge em BGN-NF. In: II Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), 2010, Uruguaiana. Anais do II Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), 2010.

MAYER, L. E. ; SOUSA, L.U. ; SANTOS, S. O. ; MIELKE, T. P. ; VEIT, A. R. ; ROEHRS, M. C. S. M. ; KEMPFER, C. B. ; TIZOTTI, M.K. ; KUHN, F. T. ; HÖRNER, R. . Detecção de MBL em *Acinetobacter* spp. por disco combinado. In: Farmápolis - XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, 2010, Florianópolis - SC. Anais do XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, 2010.

MAYER, L. E. ; SOUSA, L.U. ; SANTOS, S. O. ; MIELKE, T. P. ; VEIT, A. R. ; KUHN, F. T. ; RODRIGUES, M.A. ; KEMPFER, C. B. ; MARTINI, R. ; HÖRNER, R. . Disco aproximação na pesquisa de MBL em *Pseudomonas aeruginosa*. In: Farmápolis - XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, 2010, Florianópolis - SC. Anais do XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, 2010.

MARTINI, R. ; HÖRNER, R. ; MAYER, L. E. ; SANTOS, S. O. ; TIZOTTI, M.K. ; KUHN, F. T. . Avaliação do perfil de sensibilidade de *Acinetobacter* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria. In: 25ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM - 25ª JAI, 2010, Santa Maria - RS. Anais 25ª JAI, 2010.

## **APÊNDICES**

## Apêndice A – Técnica da Microdiluição em Caldo – Polimixina B

Concentração de bactérias preconizada no CLSI:  $5 \times 10^5$  UFC/mL

Concentração inicial do antimicrobiano: 5120  $\mu\text{g/mL}$

Volume final em cada poço: 200  $\mu\text{L}$

Bactérias por poço:  $1 \times 10^5$  UFC

### 1- Diluição do Antimicrobiano:

Diluir o composto, anotar a cor da solução. Observar mudança de coloração da solução, precipitação ou mudança na turvação, pois isso pode indicar degradação do antimicrobiano.

1.1 Diluição da Polimixina (sal): (Dado: potência = 8142 U/mg)

$$1\text{mg} - 10.000 \text{ U}$$

$$X - 8142 \text{ U}$$

$$X = 0,8142 \text{ mg/mg} = 814,2 \mu\text{g/mg}$$

Peso (mg) = vol (mL) x conc. ( $\mu\text{g/mg}$ ) / Potência ( $\mu\text{g/mL}$ )

Peso (mg) = 5 mL x 5120 / 814,2

$$\text{Peso (mg)} = 31,44\text{mg} = 0,0314\text{g}$$

Pesar 0,0314g de polimixina (sal) e diluir em balão de 5 mL com água para injeção.

1.2 Diluição da Polimixina B (comercial): Dados: (bulário eletrônico da ANVISA)

- frasco/ampola = 500.000 UI

- para o sulfato de polimixina B, a equivalência mg/UI é: 1mg ..... 10.000 UI

- após reconstituição, a solução tem uma estabilidade de 72 horas quando conservada sob refrigeração, entre 2 e 8°C.

$$1\text{mg} - 10.000 \text{ UI}$$

$$50 \text{ mg} - 5\text{mL}$$

$$x - 500.000 \text{ UI}$$

$$x - 1\text{mL}$$

$$x = 50 \text{ mg (peso do frasco/ampola)}$$

$$x = 10 \text{ mg/mL}$$

Ressuspender o conteúdo do frasco/ampola em 5 mL de água para injeção.

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$10 \text{ mg/mL} \cdot V1 = 5,12 \text{ mg/mL (5120 } \mu\text{g/mL)} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 2,56 \text{ mL} = 2560\mu\text{L}$$

Pipetar 2560 $\mu\text{L}$  da polimixina ressuspensa e colocar em balão volumétrico de 5mL, completar o volume com água para injeção.

### 2. Diluição da bactérias: (em um frasco pequeno de penicilina ou em um tubo de ensaio)

- Com o isolado bacteriano crescido *overnight* preparar um inóculo com turvação visual equivalente à escala 0,5 de McFarland: com aproximadamente 4mL de sol. salina estéril em tubo estéril, + colônias bacterianas de  $\pm$  mesmo tamanho, morfologia e cor. Ler no espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm.

- A turvação padrão da escala 0,5 de McFarland possui aprox.  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Para chegar a essa concentração, a leitura da turvação deve ficar entre 0,08 a 0,10 de absorbância.
- Caso tenha alcançado esta turvação padrão, preparar o inóculo pipetando 40  $\mu$ L (0,04 mL) desta solução 0,5 de McFarland do isolado bacteriano e diluir em um tubo estéril com 3,96 mL de caldo Mueller Hinton (3960  $\mu$ L). (Diluição final do inóculo:  $1 \times 10^6$  UFC/mL).

### 3. Pipetagem Microdiluição em Caldo

- Pipetar 180  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton no 1° poço da microplaca e 100 $\mu$ L nos 9 poços seguintes (total de 12 poços).
- Adicionar 20  $\mu$ L do antimicrobiano diluído em 1 no 1° poço da microplaca (180  $\mu$ L + 20  $\mu$ L = dilui 1:10 o antimicrobiano = 512  $\mu$ L/mL). Homogeneiza com a pipeta e transfere 100  $\mu$ L deste 1° poço para o poço seguinte, assim procedendo até o 10° poço da microplaca, sendo que os últimos 100  $\mu$ L são descartados (faz-se 11 diluições).
- Por último adiciona-se os 100  $\mu$ L do inóculo bacteriano em cada poço da microplaca, já ajustado conforme indicado na diluição das bactérias. Homogeneiza-se com movimentos circulares e incuba-se a  $35 \pm 2^\circ$  C por 24 h. Realizar a técnica em triplicata.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
<b>Caldo MH (<math>\mu</math>L)</b>	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Composto 5120 <math>\mu</math>g/mL (<math>\mu</math>L)</b>	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diluição anterior (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Retira 100 para o 2°</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 <b>retira 100</b>
<b>Inóculo (<math>\mu</math>L)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Volume final (<math>\mu</math>L)</b>	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>Concentração final (<math>\mu</math>g/mL)</b>	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

**Controle do Antimicrobiano:** igual ao 1° poço, porém ao invés do inóculo colocar 100  $\mu$ L de Caldo MH.

**C+:** 100  $\mu$ L de Caldo MH + 100  $\mu$ L de inóculo.

**C-:** 200  $\mu$ L de Caldo MH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	C■
B	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	C-
C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	C+
D												
E												
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	C●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	C-
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	C+

■ POLIMIXINA COMERCIAL

● POLIMIXINA SAL

## Apêndice B – Solução EDTA 0,5M

Peso molecular = 372,24g

1 mol – 372,24g – 1000mL

0,5M – 186,12g – 1000mL

X – 50mL

X = 9,3g de EDTA

Pesar 9,3g de EDTA, colocar num béquer com cerca de 40mL de água destilada. Acertar o pH com NaOH, pH=8,0 (a solução deverá ficar transparente quando chegar ao pH correto). Completar até 50mL com água destilada. Autoclavar e guardar na geladeira.

**Apêndice C – Solução MPA 1,4Mm**

Peso molecular = 106,14g

Dado (rótulo) = 1,2Kg = 1L

$$1 \text{ mol} - 106,14\text{g}$$

$$X = 1200\text{g}$$

$$X = 11,3 \text{ mol (em 1L)} = 11,3\text{M} = 11300\text{mM}$$

$$11300\text{mM} - 1\text{L}$$

$$1,4\text{mM} - x$$

$$X = 0,00012\text{L} = 0,12\text{mL} = 120 \mu\text{L}$$

$$120 \mu\text{L} - 1000\text{mL}$$

$$60 \mu\text{L} - 500\text{mL}$$

$$6 \mu\text{L} - 50\text{mL}$$

Medir 6  $\mu\text{L}$  de MPA e completar o volume com água Milli Q.

## Apêndice D – Protocolo de Extração de DNA por Fervura

- Cultivar os isolados bacterianos em ágar não seletivo, em estufa a  $35 \pm 2$  °C por 18 a 24h.
- Em um microtubo, tipo *ependorff*, com 500µL de água milli Q autoclavada, preparar uma suspensão bacteriana densa utilizando-se 4 a 5 colônias bem isoladas.
- Agitar a suspensão em agitador tipo vortex e colocar os tubos em banho-maria a 100°C por 15min.
- Submeter o microtubo ao choque térmico (em gelo) por 5 minutos;
- Centrifugar por 10 minutos a 11000 rpm;
- Transferir o sobrenadante (DNA) para outro microtubo e congelar a -20 °C.

Protocolo adaptado a partir das referências:

- Aguilar MAP. 2009. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. Dissertação. Universidade de São Paulo. Orientadora: Profa. Dra. Elsa Mazae Mamizuka.
- Freschi CR, Carvalho LFOS, Oliveira CJB. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by Polymerase Chain reaction (PCR). Braz J Microbiol. 2005. 36:363-67.
- Nogueira CAM, Momesso CAS, Machado RLD, Almeida MTG, Rossit ARB. Desempenho de *kits* comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. Rev Panam Infectol. 2004. 6(2):35-8.
- Scheffer MC. 2008. Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Orientadora: Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa.

## Apêndice E – Protocolo de extração de DNA com CTAB

- 1 - Cultivar os isolados bacterianos em ágar não seletivo a  $35 \pm 2$  °C por 18-24h. Os controles (negativo e positivo) devem ser incluídos a cada realização do protocolo.
- 2 - Transferir pelo menos uma alçada de células para um tubo de microcentrifuga (*eppendorff*) contendo 400 µL de tampão TE 1x, homogeneizar a suspensão.
- 3 - Adicionar 50 µL de lisozima 10 mg/mL, vórtex e incubar por 24hs a 37 °C.
- 4 - Adicionar 75 µL de SDS / proteinase K mix (70 µL de SDS 10% + 5 µL proteinase K 10 mg/mL), vórtex por pouco tempo e incubar por 10 minutos à 65 °C.
- 5 - Adicionar 100 µL de NaCl 5M.
- 6 - Adicionar 100 µL de solução CTAB/NaCl pré-aquecida à 65°C (pré-aqueça a solução de CTAB/NaCl em banho-maria à 65°C; a solução fica menos viscosa e mais fácil de pipetar). Vórtex até o líquido tornar-se branco (leite). Incubar por 10 minutos a 65°C.
- 7 – Adicionar um volume de 750 µL de álcool isoamílico/clorofórmio (1:24), vórtex por pelo menos 10 segundos e centrifugar à temperatura ambiente por 5 minutos à 12000 rpm.
- 8 – Transferir o sobrenadante aquoso em quantidades de 180 µL para um tubo de microcentrifuga usando uma pipeta (uma camada esbranquiçada separa as duas fases).
- 9 – Adicionar isopropanol na proporção de 0,6 volume em relação ao sobrenadante obtido no passo anterior. Colocar 30 minutos à -20 °C.
- 10 – Centrifugar durante 15 minutos à temperatura ambiente à 12000 rpm.
- 11 – Descartar a maioria do sobrenadante, virando o *eppendorff*, deixar aproximadamente 20 µL do sedimento.
- 12 – Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado e inverter o tubo algumas vezes.
- 13 – Centrifugar 5 minutos à temperatura ambiente à 12000 rpm. Descartar o sobrenadante, novamente virando o *eppendorff* e deixar aproximadamente 20 µL acima do sedimento.
- 14 – Deixe o sedimento secar até completa evaporação do etanol.
- 15 – Eluir o sedimento em 20 a 50 µL (dependendo da concentração de DNA desejada) de tampão TE 1x. Colocar 20 minutos em banho-maria à  $35 \pm 2$  °C para melhor homogeneização.
- 16 – Armazenar o DNA a -20°C para posterior uso. Uma rápida estimativa da concentração de DNA pode ser feita em eletroforese curta (agarose 0,8%). A banda não precisa ser homogênea, entretanto observar se não há DNA fragmentado nem arraste de RNA.