

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DETECÇÃO DE GENES DE METALO-BETA-LACTAMASES EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

**FELIPE LIRA DE SÁ CAVALCANTI**

RECIFE  
2010

**FELIPE LIRA DE SÁ CAVALCANTI**

**DETECÇÃO DE GENES DE METALO-BETA-LACTAMASES EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior  
(Departamento de Genética – CCB/UFPE)

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Maria Camargo de Moraes  
(Departamento de Patologia – ICB/UPE)

RECIFE  
2010

**Cavalcanti, Felipe Lira de Sá**

**Detecção de genes de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* / Felipe Lira de Sá Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2010.**

**66 folhas : il., fig.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.**

**Inclui bibliografia e anexo.**

**1. Bactérias 2. Bacteriologia médica 3. Microrganismos patogênicos 4. Bactérias patogênicas 5. Enzimas I. Título.**

**616.9201**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/ CCB – 2010- 086**

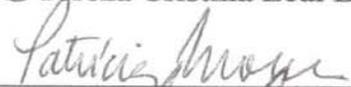
**FELIPE LIRA DE SÁ CAVALCANTI**

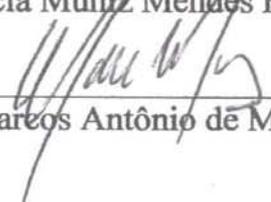
**DETECÇÃO DE GENES DE METALO-BETA-LACTAMASES EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

**BANCA EXAMINADORA**

**Membros titulares:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tereza Cristina Leal Balbino

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

Aprovada em 05/03/10

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe Avani, minha tia Aucilene e meu irmão Renato, por mais uma vez serem meu porto seguro e a razão pela qual continuo tendo forças para lutar pela nossa felicidade, apesar de todos os problemas.*

“A nossa felicidade será naturalmente proporcional à felicidade que fizermos para os outros”.

Allan Kardec

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup> Márcia Morais, pela orientação, incentivo e por estar presente em mais uma conquista da minha vida acadêmica;

Ao Prof. Marcos Morais, pela oportunidade e por me permitir usufruir de suas contribuições e experiência;

A Prof<sup>a</sup> Marinalda Vilela, pela parceria, carinho e amizade sem iguais;

Aos amigos, colegas e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular de Vírus do ICB/FCM-UPE. Em especial a Carol e Bia, pelo apoio constante durante todos os meses de trabalho e pesquisa;

A Paloma, minha nova amiga, pela ajuda na padronização do PFGE e a Prof<sup>a</sup> Cristina Balbino, por ter acreditado em mim e no meu trabalho;

A Juh Fonseca, pela nossa grande amizade que vence qualquer barreira, sempre;

Aos meus colegas do PPGCB, por compartilharem comigo momentos de estudo e descontração nestes dois anos de curso;

Ao Laboratório de Bacteriologia do HUOC, por ceder os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e a todos que lá trabalham, pelo apoio técnico;

Aos professores e funcionários do ICB/UPE e do CCB/UFPE que de alguma forma contribuíram na minha formação;

Ao CNPq/FACEPE pelo apoio financeiro;

A espiritualidade amiga pela ajuda e Deus pela permissão.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	01
LISTA DE FIGURAS	02
RESUMO	03
ABSTRACT	04
1. INTRODUÇÃO	05
2. JUSTIFICATIVA	06
3. OBJETIVOS	07
3.1 Objetivo geral	07
3.2 Objetivos específicos	07
4. REVISÃO DA LITERATURA (CAPÍTULO 1)	08
4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08
4.1.1 Características gerais	08
4.1.2 Patogenia e fatores de virulência	11
4.1.3 Tratamento	12
4.2 Epidemiologia das infecções bacterianas	12
4.3 Antibióticos beta-lactâmicos	14
4.4 Resistência bacteriana	16
4.5 Resistência aos carbapenêmicos e produção de carbapenemases	18
4.5.1 Carbapenemases de classe A	18
4.5.2 Carbapenemases do tipo OXA	19
4.5.3 Carbapenemases de classe B ou metalo-beta-lactamases	20
4.6 Métodos para detecção da produção de metalo-beta-lactamases	25
4.7 Epidemiologia molecular	25
4.8 Ocorrência de metalo-beta-lactamases no Nordeste	28
4.9 As metalo-beta-lactamases como desafio terapêutico	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
6. ARTIGO CIENTÍFICO (CAPÍTULO 2)	44
6.1 Summary	46

6.2 Introduction	47
6.3 Methods	48
6.4 Results	50
6.5 Discussion	54
6.6 Acknowledgments	55
6.7 References	56
7. CONCLUSÕES	59
8. ANEXO	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AIM</b>	imipenemase da Austrália
<b>AMI</b>	amicacina
<b>ATCC</b>	Coleção de Cultura Tipo Americana
<b>AZT/ATM</b>	aztreonam
<b>CAZ</b>	ceftazidima
<b>CIP</b>	ciprofloxacina
<b>CLSI</b>	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ESBL</b>	beta-lactamase de espectro estendido
<b>GEN</b>	gentamicina
<b>GIM</b>	imipenemase da Alemanha
<b>HUOC</b>	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
<b>IMI</b>	imipenem
<b>IMP</b>	imipenemase
<b>KHM</b>	metalo-beta-lactamase do Hospital de Kyorin
<b>KPC</b>	carbapenemase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>MBL</b>	metalo-beta-lactamase
<b>MDR</b>	resistência a múltiplas drogas
<b>MIC</b>	concentração inibitória mínima
<b>MPP</b>	ácido 2-mercaptopropiônico
<b>OXA</b>	oxacilinase
<b>pb</b>	pares de base
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PFGE</b>	eletroforese em gel de campo pulsado
<b>PIP/TAZ</b>	piperacilina/tazobactam
<b>POL</b>	polimixina B
<b>SIM</b>	imipenemase de Seul
<b>SPM</b>	metalo-beta-lactamase de São Paulo
<b>VIM</b>	imipenemase de Verona

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** – Foto de microscopia eletrônica da *Pseudomonas aeruginosa*.  
(Fonte: <http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa>) 08
- Figura 2** – Diferentes pigmentos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* em Ágar Muller-Hinton. (Fonte: autor) 09
- Figura 3** – Mapa do genoma da *Pseudomonas aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000). 10
- Figura 4** – Estruturas químicas dos beta-lactâmicos (1-4), sítios de ação das beta-lactamases (5), e estruturas químicas dos inibidores de beta-lactamases usados na prática clínica (6-8) (Babic *et al.*, 2006). 15
- Figura 5** – Imipenem (*N*-formimidoil-thienamicina) (Rodloff *et al.*, 2006). 15
- Figura 6** – Estrutura tridimensional da metalo-beta-lactamase SPM-1 (Bebrone, 2007). 23
- Figura 7** – Dados dos exemplares de cada uma das variantes encontradas nas cinco subclasses de MBLs adquiridas descritas até 2006 (Picoli, 2008). 24

## RESUMO

A resistência aos carbapenêmicos pode dar-se através de vários mecanismos, incluindo a expressão de beta-lactamases do tipo carbapenemases. Metalo-beta-lactamases (MBLs) constituem o grupo mais clinicamente importante das carbapenemases, na medida em que elas hidrolisam praticamente todos os beta-lactâmicos e, em alguns casos, também os monobactams (devido a outros mecanismos associados), o que implica em uma vasta redução das opções terapêuticas atualmente disponíveis. O objetivo deste trabalho foi detectar a produção de MBLs em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes tanto a imipenem quanto a ceftazidima, verificar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos mais utilizados grupos de antibióticos comercialmente disponíveis, investigar a ocorrência dos genes *bla<sub>SPM-1</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>* e realizar a tipagem molecular dos isolados MBL positivos. Foram analisadas 61 amostras do biênio 2002/2003 e 12 amostras do biênio 2008/2009, identificadas em um hospital de ensino. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI. A identificação dos isolados MBL positivos seguiu o método de disco-difusão proposto por Arakawa. A detecção dos genes *bla<sub>SPM-1</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>* foi feita por análise de PCR usando iniciadores específicos. A análise dos fragmentos das macrorestrições do DNA genômico foi feita por PFGE. Os resultados mostraram que 86,3% (63/73) dos isolados resistentes a imipenem e ceftazidima foram confirmados como MBL positivos pelo teste fenotípico. O gene *bla<sub>SPM-1</sub>* foi encontrado em 61 destes isolados. Nenhuma das amostras testadas possuía o gene *bla<sub>IMP</sub>*. Quanto aos ensaios de susceptibilidade, foi observado que dos anos 2002 e 2003: 100% dos isolados eram resistentes a ciprofloxacina, gentamicina e amicacina; 44% eram resistentes a piperacilina/tazobactam e 56% mostraram sensibilidade a esta droga. Dos anos 2008 e 2009: 100% dos isolados eram resistentes a ciprofloxacina e gentamicina; 91,6% eram resistentes a amicacina; 8,4% mostraram resistência intermediária a este aminoglicosídeo; 83,3% eram resistentes a piperacilina/tazobactam e 16,7% mostraram sensibilidade a este antimicrobiano. Quando as duas principais drogas para tratamento de infecções causadas por cepas MBL positivas foram analisadas, dos isolados de 2002/2003, apenas 1,63% foram resistentes ao aztreonam; 62,2% tiveram resistência intermediária e 36% mostraram sensibilidade. Dos isolados de 2008/2009, 83,4% foram resistentes e 16,6% apresentaram resistência intermediária, com nenhum isolado mostrando sensibilidade. Quanto à polimixina B, todos os isolados deste trabalho eram sensíveis. A análise dos fragmentos das macrorestrições dos isolados mostrou um único tipo de PFGE (A), com sete subtipos (A1 a A7). Estes achados sugerem que a produção de MBLs mediada por um clone único epidêmico continua sendo um importante mecanismo de resistência aos carbapenems no hospital estudado, como confirmado pela detecção do gene SPM. Além disso, o perfil de pan-resistência encontrado também alerta para a possível presença de múltiplos mecanismos de resistência nos isolados bacterianos, o que sinaliza uma necessidade urgente por estratégias de vigilância e melhoria das práticas de controle de infecções.

Palavras-chave: carbapenemases, metalo-beta-lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*

## ABSTRACT

Carbapenem resistance may be conferred through various mechanisms, including the expression of beta-lactamase carbapenemases. Metallo-beta-lactamases constitute the most clinically important group of carbapenemases since they hydrolyse virtually all beta-lactams and, in some cases, also monobactams (due to other mechanisms associated), which implies in a vast reduction of therapeutic options currently available. The aim of this work was to detect the production of MBLs in the *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant both to imipenem and ceftazidime, to verify the susceptibility profile of the isolates to the most used groups of antibiotics commercially available, to investigate the occurrence of genes *bla<sub>SPM-1</sub>* and *bla<sub>IMP</sub>* and to perform the molecular typing of the MBL positives isolates. We analyzed 61 samples of the biennium 2002/2003 and 12 samples of the biennium 2008/2009, identified in a teaching hospital. Antimicrobial susceptibility was performed according to criteria established by the CLSI. The indentification of MBL positives isolates followed the method of disk-diffusion proposed by Arakawa. The detection of genes *bla<sub>SPM-1</sub>* and *bla<sub>IMP</sub>* was carried out by PCR analysis using specific primers. The analysis of macrorestrictions fragments of genomic DNA was performed by PFGE. The results showed that 86,3% (63/73) of the isolates resistant to imipenem and ceftazidime were confirmed as MBL positives by phenotypic testing. The *bla<sub>SPM-1</sub>* gene was found in 61 of these isolates. None of the tested samples had *bla<sub>IMP</sub>* gene. Regarding to the susceptibility assays, it was observed that from years 2002 and 2003: 100% of the isolates were resistant to ciprofloxacin, gentamicin and amikacin; 44% were resistant to piperacilin/tazobactam and 56% showed sensibility to it. From years 2008 and 2009: 100% of the isolates were resistant to ciprofloxacin and gentamicin; 91,6% were resistant to amikacin; 8,4% showed intermediate resistant to this aminoglycoside; 83,3% were resistant to piperacilin/tazobactam and 16,7% showed sensibility to it. When the two main drugs for treatment of infections caused by MBL positive strains were analyzed, from isolates of 2002/2003, only 1,63% were resistant to aztreonam; 62,2% had intermediate resistance and 36% showed sensibility. From isolates of 2008/2009, 83,4% were resistant and 16,6% had intermediate resistance, with no isolate showing sensibility. Regarding to polimixin B, all the isolates of this work were sensible. The analysis of macrorestrictions fragments of the isolates showed a single PFGE type (A), with seven subtypes (A1 to A7). These findings suggest that the production of MBLs mediated by a unique epidemic clone is still an important mechanism of resistance to carbapanems in our hospital, as confirmed by the detection of SPM gene. Moreover, the profile of pan-resistance found also alert to the possible presence of multiple mechanisms of resistance in bacterial isolates, which demands an urgent need for surveillance strategies and improvement of infections control practices.

Key words: carbapenemases, metallo-beta-lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*

## 1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno clinicamente importante, que pode apresentar resistência intrínseca ou adquirida a vários agentes antimicrobianos, dentre eles os carbapenêmicos. Esses compostos carbapenêmicos são antimicrobianos geralmente utilizados como drogas de escolha no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes a outros beta-lactâmicos, uma vez que possuem grande espectro de atividade e estabilidade à hidrólise pela maioria das beta-lactamases, incluindo as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL).

A resistência aos carbapenêmicos é muitas vezes resultante da produção de metalo-beta-lactamases (MBLs), enzimas capazes de hidrolisar eficazmente estas drogas. As MBLs pertencem ao grupo 3 das beta-lactamases de largo espectro, uma classe de metaloenzimas classificadas com base na habilidade de hidrólise do imipenem e meropenem e na característica de sofrerem inibição da atividade quando na presença de agentes quelantes de íons metálicos. A maioria dessas MBLs confere resistência não somente aos carbapenêmicos, mas também a outros beta-lactâmicos. Além disso, são pobremente inibidas pela presença de inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Os genes responsáveis pela produção de metalo-beta-lactamases são usualmente mediados por integrons carregados em grandes plasmídios, que são transferíveis entre diferentes isolados bacterianos. Esta característica alerta para a importância da identificação destes isolados no efetivo controle da disseminação deste mecanismo de resistência. A detecção de microrganismos produtores de MBLs tem sido relatada em vários países, tais como Japão, Cingapura, Itália, Inglaterra, Portugal e Grécia, além do Brasil e, já há algum tempo, isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos têm sido identificados em Recife, o que conduziu o presente trabalho para a caracterização fenotípica e genotípica destes isolados em relação à capacidade de produção de MBLs e para a análise do perfil clonal obtido.

## 2. JUSTIFICATIVA

Carbapenêmicos são antimicrobianos geralmente utilizados como drogas de escolha no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). A resistência a estas drogas é em grande parte resultante da produção de metalo-beta-lactamases, enzimas capazes de hidrolisar os agentes carbapenêmicos. Microrganismos produtores de metalo-beta-lactamases são usualmente também resistentes às cefalosporinas (ceftazidima, por exemplo) e, em alguns casos, aos monobactâmicos (aztreonam), o que implica em diminuição das opções terapêuticas contra infecções causadas por estes patógenos. Há algum tempo, isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos têm sido identificados em um hospital universitário de Recife, alertando para a importância da detecção precoce da produção de MBLs e do perfil genético destas bactérias. Neste contexto, o presente trabalho deve contribuir para o conhecimento da disseminação e variabilidade dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* que portam genes responsáveis pelo fenótipo de MBL na cidade do Recife. Isto poderá levar ao correto direcionamento das condutas terapêuticas e maior sucesso das iniciativas de vigilância de infecções hospitalares.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Identificar, caracterizar e tipar isolados nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos portadores de genes para metalo-beta-lactamases em um hospital universitário de Recife

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Isolar e identificar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções hospitalares em um hospital universitário de Recife
- Determinar o padrão de susceptibilidade a antimicrobianos em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*
- Determinar a ocorrência da produção de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*
- Investigar a presença de genes de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*
- Verificar o perfil de resistência associada a outros antimicrobianos nos isolados produtores de metalo-beta-lactamases
- Determinar o perfil clonal e avaliar a diversidade genômica dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

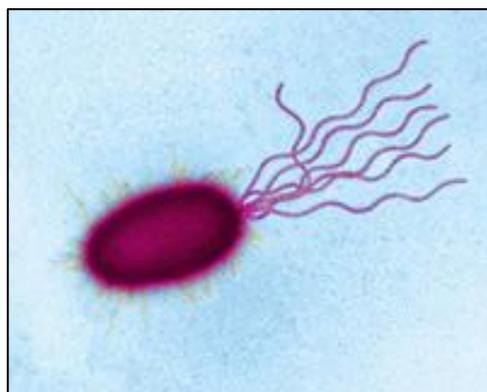
## 4. REVISÃO DA LITERATURA (CAPÍTULO 1)

### 4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 4.1.1. Características gerais

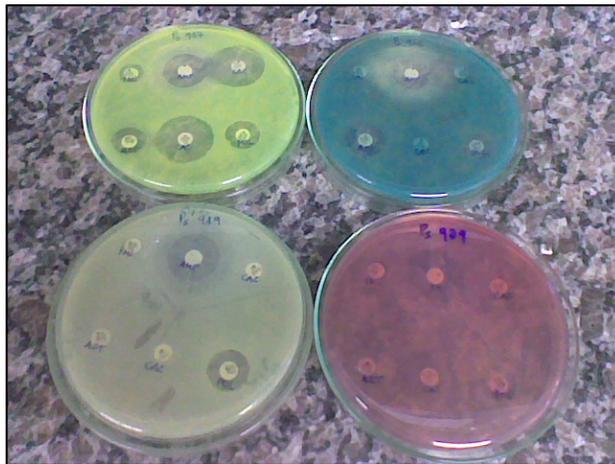
O gênero *Pseudomonas* inclui bactérias pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, ordem *Pseudomonadales*. Têm como habitat natural o meio ambiente, sendo muito encontradas no solo e na água, assim como também podem fazer parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis. São bactérias gram-negativas, móveis por um flagelo polar, aeróbias, mas podendo ser anaeróbias quando utilizam o nitrato como aceptor final de elétrons. Fazem parte do grupo dos microorganismos não-fermentadores dos açúcares e são oxidase positivas (Tortora *et al.*, 2005).

Muitas espécies de *Pseudomonas* produzem pigmentos de coloração variada (piocianina, pioverdina, piomelanina e piorrubina) que são solúveis em água e se difundem no meio de cultura Ágar Muller Hinton. Uma das espécies, *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1), produz uma pigmentação azul-esverdeada característica que ajuda na sua identificação. Outras *Pseudomonas* produzem pigmentos fluorescentes solúveis que fluorescem quando iluminados por luz ultravioleta (Tortora *et al.*, 2005). Acredita-se que a produção de pigmentos (Figura 2) seja um fator de virulência da bactéria (Mims *et al.*, 1999).



**Figura 1** – Foto de microscopia eletrônica da *Pseudomonas aeruginosa*.

(Fonte: <http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa>)



**Figura 2** – Diferentes pigmentos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* em Ágar Muller-Hinton. (Fonte: autor)

*P. aeruginosa* pode ser encontrada em pequeno número na microbiota intestinal normal e também é encontrada na pele humana. Outras espécies de *Pseudomonas* estão disseminadas em qualquer ambiente úmido, mas raramente produzem doença (Jawetz *et al.*, 1995). São bactérias que crescem rapidamente em diversos meios de cultura, em temperaturas que variam entre 37 e 42°C (Brooks *et al.*, 2000).

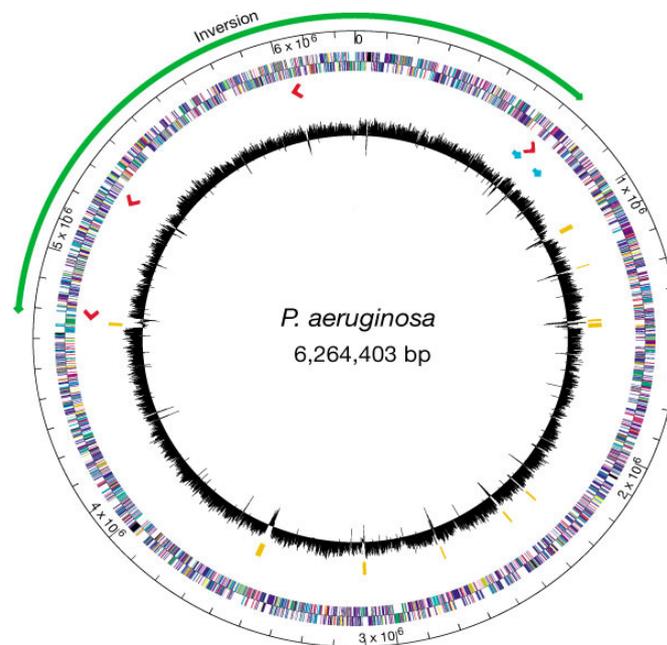
Quanto aos tipos de colônias, *P. aeruginosa* pode se apresentar de três formas: pequenas e ásperas, quando provenientes do meio ambiente, como água ou solo; largas, lisas e de margens planas, quando de origem clínica; e de aparência mucóide em algumas cepas de origem respiratória, em decorrência da produção de muco de alginato, um exopolissacarídeo que auxilia na prevenção da fagocitose e contribui na virulência da bactéria (Siqueira, 2002).

As colônias apresentam em placa um odor adocicado semelhante ao de uva e algumas cepas produzem hemólise em Ágar Sangue (Jawetz *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2000). A identificação laboratorial inclui a observação do aspecto das colônias, odor característico, presença de pigmento, motilidade e testes bioquímicos com os seguintes resultados: fermentação dos açúcares (-); citrato (+); lisina (-); indol (-); oxidase (+); DNase (-) e hemólise do tipo beta (Holt *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 2004).

*P. aeruginosa* é considerada uma bactéria de importância industrial por estar envolvida nos processos de biorremediação, porém é amplamente estudada por ser

considerada um patógeno oportunista por excelência (Tortora *et al.*, 2005). Geralmente só causa infecção quando introduzida em áreas desprovidas das defesas normais ou quando participa de infecções mistas. Infecta ferimentos e queimaduras, produzindo pus azul-esverdeado; meningite, quando introduzida por punção lombar; e infecção urinária, quando introduzida por cateteres e instrumentos ou nas soluções de irrigação. O envolvimento das vias respiratórias, especialmente a partir de respiradores contaminados, resulta em pneumonia necrotizante. Cepas mucóides de *Pseudomonas* acometem particularmente os pacientes portadores de fibrose cística pulmonar. O microorganismo é encontrado com frequência nos casos de otite externa, acometendo nadadores. Em lactentes ou em pessoas debilitadas, a bactéria é capaz de invadir a corrente sanguínea e causar septicemia fatal (Jawetz *et al.*, 1995; Mims *et al.*, 1999).

Esta bactéria tem sido alvo de muitos estudos devido não só à sua habilidade de causar doenças e facilidade em ser multirresistente aos antibióticos, mas também pela sua incrível e bem sucedida potencialidade metabólica e versatilidade ambiental. Seu genoma já foi totalmente mapeado, sendo considerada umas das maiores bactérias já seqüenciadas, com cerca de 5500 genes, codificados entre os 6.264.403 pb (Stover *et al.*, 2000) (Figura 3).



**Figura 3** – Mapa do genoma da *Pseudomonas aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

#### 4.1.2 Patogenia e fatores de virulência

Quando coloniza indivíduos saudáveis, *P. aeruginosa* geralmente é saprófita, podendo fazer parte da microbiota normal ou transitória. Porém em indivíduos imunocomprometidos, se torna um sério patógeno oportunista (Choi *et al.*, 2002; Speert, 2002). É importante causa de infecções em pacientes com câncer, queimados, portadores de diabetes descontrolada, assim como em pacientes hospitalizados e fazendo uso de antibioticoterapia prolongada (Ono, 2002). Também possui importante papel como principal patógeno pulmonar nos casos de fibrose cística (Yagci *et al.*, 2003).

As principais complicações causadas pela bactéria nos seres humanos variam desde otites externas; infecções de feridas em geral; infecção de queimaduras (produzindo nestas últimas, coloração esverdeada característica); infecção de tecidos, ossos e juntas, até infecções do trato urinário, e gastrointestinal. Podem produzir também endocardite, meningite e finalmente, septicemias (Ono, 2002; Mims *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 2000; Todar, 2004).

O processo da doença geralmente começa com alguma alteração nas defesas imunes do hospedeiro. A patogênese da infecção por *P. aeruginosa* é multifatorial, como sugerido pelos vastos determinantes de virulência possuídos pela bactéria. A maioria das infecções são invasivas e toxinogênicas, sendo compostas de três estágios distintos: (1) adesão e colonização; (2) invasão local; e (3) disseminação sistêmica. No entanto, o curso da infecção pode parar em qualquer estágio. Determinantes particulares de virulência bacterianos medeiam cada um desses estágios e são os responsáveis pelos sintomas característicos que acompanham a doença (Todar, 2004).

Os *pili* (fimbrias) estendem-se a partir da superfície celular e promovem a fixação da bactéria às células epiteliais do hospedeiro. As cápsulas de polissacarídeos são responsáveis pelas colônias mucóides observadas em culturas de amostras clínicas de pacientes com fibrose cística. O lipopolissacarídeo, existente em múltiplos imunotipos, é responsável pelas propriedades endotóxicas do microorganismo. A maioria das amostras de *P. aeruginosa* de infecções clínicas produzem enzimas extracelulares, incluindo elastases, proteases e duas hemolisinas: a fosfolipase C termolábil e um glicolípido termoestável (Jawetz *et al.*, 1995).

Muitas amostras de *P. aeruginosa* produzem exotoxina A, que provoca necrose dos tecidos, sendo letal para animais quando inoculada de forma purificada. A toxina bloqueia a síntese de proteínas através de um mecanismo de ação idêntico ao da toxina diftérica, apesar de as estruturas das toxinas não serem idênticas. Observa-se a presença de antitoxinas contra a exotoxina A em alguns soros humanos, especialmente em pacientes que se recuperaram de infecções graves por *P. aeruginosa* (Jawetz *et al.*, 1995; Trabulsi, 1996).

#### 4.1.3 Tratamento

Os isolados clínicos de *P. aeruginosa* são naturalmente resistentes a vários antibióticos beta-lactâmicos, e também às tetraciclinas, cloranfenicol, cotrimoxazol e outros. Os antibióticos mais eficientes são a gentamicina, amicacina, algumas penicilinas semi-sintéticas (carbenicilina) e a polimixina, porém a bactéria pode adquirir resistência a qualquer um destes agentes terapêuticos, com exceção de polimixina. Recomenda-se a realização do antibiograma para seleção do antibiótico a ser usado no tratamento (Trabulsi, 1996).

#### 4.2 Epidemiologia das infecções bacterianas

Durante as últimas décadas, bacilos gram-negativos não-fermentadores, tais como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* se destacaram pela importância no aumento das infecções nosocomiais causadas por esses microorganismos. Isso se deu não só pela resistência intrínseca desses patógenos contra vários agentes antimicrobianos, mas também pela capacidade de desenvolverem novas formas de resistência (Sader & Jones, 2005; Quinteira *et al.*, 2005; Toleman *et al.*, 2005; Linden *et al.*, 2003).

Em geral, *P. aeruginosa* não causa danos à saúde, a não ser de pessoas hospitalizadas e/ou imunocomprometidas. A aquisição da infecção hospitalar se dá com a colonização na admissão, através da terapia antimicrobiana, ou mesmo através da própria equipe hospitalar, que dissemina a bactéria de um paciente para o outro (Blanc *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2004). Como patógeno oportunista associado a uma gama de infecções nosocomiais, cepas desta bactéria causam doença em pacientes

hospitalizados, predominantemente pneumonias, infecções do trato urinário, assim como infecções na pele e em tecidos moles (Giamarellou *et al.*, 2002). O aumento do envolvimento deste organismo ubíquo em infecções é devido a diversos fatores, que incluem o número crescente de procedimentos invasivos e pacientes imunocomprometidos, além do aumento do uso de antibióticos, que tem provocado a seleção de organismos resistentes (Cristino *et al.*, 1999). Pacientes em unidades de terapia intensiva, setores de oncologia, unidades de queimados e enfermarias cirúrgicas freqüentemente mostram isolados multiresistentes, que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade (Giamarellos *et al.*, 2006).

Em hospitais dos Estados Unidos, *P. aeruginosa* é o principal responsável por pneumonias hospitalares nos pacientes internados em UTIs. Também é a quarta causa mais comum de infecções urinárias e o sexto patógeno mais freqüentemente isolado em hemoculturas (NNIS, 1999). De acordo com dados coletados em centros médicos da América Latina, *P. aeruginosa* é o primeiro, terceiro e quinto patógeno mais freqüente nos casos de infecção do trato respiratório inferior, infecção do trato urinário e infecção de corrente sanguínea, respectivamente (Sader *et al.*, 2004).

Em *Acinetobacter spp.*, a prevalência é menor, porém expressiva. Estas bactérias são causa de 1% das infecções de corrente sanguínea e 3% dos casos de pneumonia nos Estados Unidos (NNIS, 1999). Na Europa, *Acinetobacter spp.* é a sétima causa mais comum de infecções em pacientes de UTIs, sendo responsáveis por 8% dos casos de infecção de corrente sanguínea e 10% dos casos de pneumonia (Gales *et al.*, 2001).

O grande genoma da *P. aeruginosa*, cerca de metade do tamanho do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, confere a esta bactéria uma grande versatilidade metabólica e fisiológica que permite que suas células se adaptem e sobrevivam aos mais diversos ambientes, sejam eles ricos ou pobres em matéria orgânica. Essas bactérias são capazes de crescer até mesmo onde praticamente nenhum outro microorganismo é capaz de crescer, como: água destilada, sabões, detergentes e alguns anti-sépticos (Murray *et al.*, 2004; Todar, 2004; Tortora *et al.*, 2005).

### 4.3 Antibióticos beta-lactâmicos

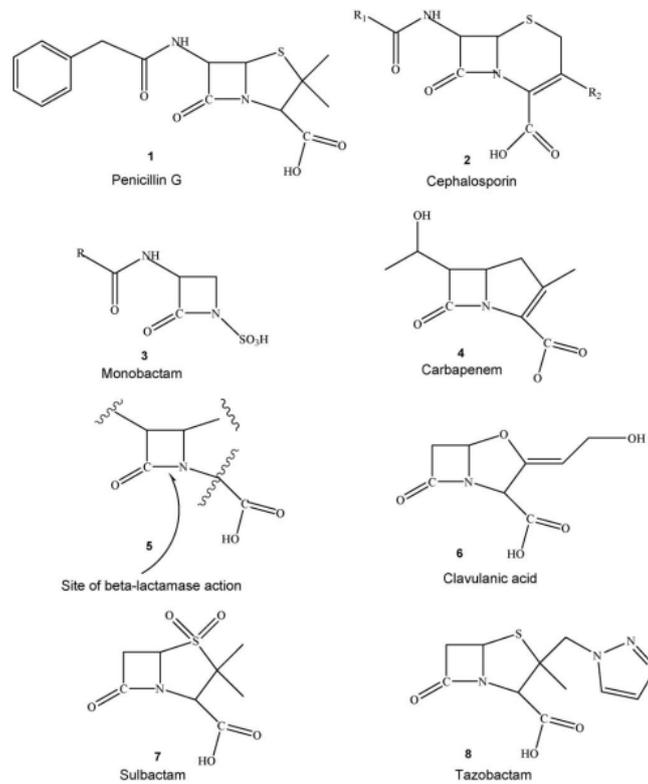
Antibióticos funcionam interagindo com alvos bacterianos específicos, inibindo a síntese da parede celular, inibindo a síntese de proteínas ou impedindo a replicação dos ácidos nucleicos. Para atingir estes objetivos, o antibiótico precisa ter acesso e se ligar ao seu sítio alvo na bactéria (Neu, 1992).

A penicilina G foi o primeiro antibiótico beta-lactâmico introduzido na prática clínica. Com base no sucesso clínico sem precedentes, os antibióticos beta-lactâmicos atualmente incluem: drogas resistentes a penicilinases, amino-, carboxil-, indanil-, e ureido-penicilinas, cefalosporinas de 1ª a 4ª geração, monobactams e carbapenems (Figura 4). A característica mais distinta de um beta-lactâmico é a presença de um anel composto de quatro membros, denominado anel beta-lactâmico (Babic *et al.*, 2006).

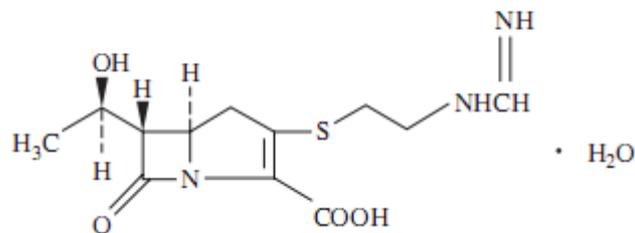
Todos os antibióticos beta-lactâmicos são agentes bactericidas que inibem a síntese da parede celular. Esta é uma estrutura complexa composta de uma rede muito firme de moléculas de peptidoglicano que têm por função a manutenção da forma celular bacteriana, protegendo-a de altas pressões osmóticas internas (Babic *et al.*, 2006).

Os beta-lactâmicos sempre estiveram entre os primeiros agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento de doenças infecciosas. Ao longo do tempo, no entanto, problemas como o desenvolvimento e seleção de organismos resistentes tornaram-se bastante evidentes. A necessidade médica por compostos com atividade de largo espectro, rápida ação bactericida e boa tolerabilidade, foi alcançada com a introdução dos carbapenêmicos (Rodloff *et al.*, 2006).

O imipenem (Figura 5) foi o primeiro antibiótico carbapenêmico selecionado para comercialização, mais de duas décadas atrás, devido a sua alta potência até então, largo espectro de atividade e por apresentar um bom perfil de segurança para o paciente. Desde então, mais de 26 milhões de pacientes têm sido tratados com este antimicrobiano, e até hoje o imipenem continua a desempenhar um papel importante tanto na terapia empírica quanto direcionada, na maioria dos casos de infecções severas e complicadas (Rodloff *et al.*, 2006).



**Figura 4** – Estruturas químicas dos beta-lactâmicos (1-4), sítios de ação das beta-lactamases (5), e estruturas químicas dos inibidores de beta-lactamases usados na prática clínica (6-8) (Babic *et al.*, 2006).



**Figura 5** – Imipenem (*N*-formimidoyl-thienamicina) (Rodloff *et al.*, 2006).

#### 4.4 Resistência bacteriana

Nas últimas décadas, a frequência de resistência às drogas antimicrobianas associado aos sérios problemas causados por patologias infecciosas, tem atingido índices alarmantes. Dos dois milhões de infecções nosocomiais ocorridas a cada ano nos Estados Unidos, 50 a 60% são causadas por cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR). Esta alta taxa de resistência aumenta a mortalidade e morbidade, assim como os custos gerados pela internação e tratamento dos pacientes (Weinstein, 1998; Public Health Initiative Research Institute, 1997).

A emergência e a disseminação de microorganismos resistentes representa a convergência de uma variedade de fatores, que incluem: mutações em genes comuns de resistência, que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas entre bactérias, em que os genes de resistência são transmitidos através de plasmídios; desenvolvimento de condições em ambientes hospitalares em que a pressão seletiva facilita o surgimento de cepas resistentes; proliferação e disseminação global de clones bacterianos multirresistentes e inabilidade de alguns métodos laboratoriais em detectar fenotipicamente mecanismos de resistência emergentes (Tenover *et al.*, 1996; Levin *et al.*, 1997).

São vários os mecanismos de resistência das bactérias e estes dependem de vários fatores que podem estar inter-relacionados ou não. Os mais comuns são: inativação enzimática, em que certas bactérias produzem enzimas que neutralizam a ação dos antimicrobianos; alteração da permeabilidade da membrana pela alteração na expressão dos canais de porina, modificando a penetração e ação dos antibióticos; mecanismo de bomba de efluxo, em que as drogas são expulsas ativamente do interior das células bacterianas, inutilizando-as; e finalmente, alteração do sítio de ligação do antibiótico alvo, que impede que os antibióticos se liguem aos seus sítios específicos de atuação, fazendo com que se tornem ineficientes contra a bactéria (Bryan LE, 1989; Courvalin P, 1994).

Nos últimos anos, tem sido frequente o isolamento de *P. aeruginosa* multirresistentes, o que ocasiona o uso de antibióticos cada vez mais potentes, tais como os carbapenêmicos (Quinteira *et al.*, 2005). Atualmente, estas drogas são importantes opções terapêuticas utilizadas em infecções nosocomiais causadas por *P. aeruginosa*.

Isso se deve à sua elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2b (PBP2b), estabilidade a muitas beta-lactamases, incluindo beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) e beta-lactamases cromossomais (AmpC), e excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (Woodford *et al.*, 2000).

No entanto a maior utilização de carbapenens no ambiente hospitalar reflete em maior pressão seletiva sobre as bactérias nosocomiais e, nos dias atuais, são recuperados com relativa frequência em hospitais brasileiros, isolados clínicos de *P. aeruginosa* sensíveis apenas à polimixina B (Poirel & Nordmann, 2002).

*P. aeruginosa* é intrinsecamente mais resistente do que as Enterobacteriaceae aos antibióticos mais comumente usados devido a uma grande impermeabilidade às drogas. Impermeabilidade esta que, em combinação com um efetivo sistema de bomba de efluxo, determina o fenótipo de resistência multidroga a antibióticos quimicamente não-relacionados, como as fluorquinolonas e os beta-lactâmicos (Nikaido, 1994). A prevalência de isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos beta-lactâmicos varia muito e depende de uma série de fatores, que incluem: o ano do estudo, localização geográfica, tipo de hospital examinado, unidade dentro do hospital e combinações anti-*Pseudomonas* específicas examinadas (Sanders *et al.*, 1992). As mais altas taxas são vistas nos estudos feitos em pacientes acometidos de fibrose cística em UTIs de hospitais terciários. Os alcances da resistência reportados em vários estudos são de 5 a 30% para piperacilina, 0,3 a 19% para ceftazidima, e 10 a 17% para imipenem (Sanders *et al.*, 1992).

Os mecanismos responsáveis pela resistência aos beta-lactâmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* muitas vezes envolvem a produção de beta-lactamases, que podem ser de origem cromossomal ou mediadas por plasmídeos (Thomson *et al.*, 1996). As principais são: beta-lactamases de amplo espectro do tipo classe A, ou ESBLs, que hidrolizam as cefalosporinas de terceira e quarta geração (Nordmann *et al.*, 1998); AmpC ou cefalosporinases do tipo induzível (Sanders, 1992; Bush *et al.*, 1995); classe B, ou metalo-beta-lactamases, que são capazes de hidrolizar todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (Yan *et al.*, 2001); e classe D, que hidrolizam os carbapenêmicos (Bou *et al.*, 2000).

#### 4.5 Resistência aos carbapenêmicos e produção de carbapenemases

Carbapenens, incluindo meropenem e imipenem, são reconhecidos como os mais potentes agentes antimicrobianos com atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (Hurst *et al.*, 2000). Apesar de alguns estudos de ensaios em laboratório terem detectado baixas taxas de resistência a esses agentes em bactérias Gram-negativas, a resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* está aumentando (Fontana *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004). Isto se dá geralmente devido a: a) impermeabilidade que surge pela perda de porina OprD; b) expressão de um sistema de bomba de efluxo ativo na membrana citoplasmática desses organismos; c) ou pela produção de metalo-beta-lactamases (MBLs), que hidrolizam todos os carbapenêmicos (Kohler *et al.*, 1999; Nordmann *et al.*, 2002). A presença destes mecanismos pode potencialmente levar à falha terapêutica se os carbapenens forem usados.

As carbapenemases são enzimas que podem hidrolizar todos os beta-lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos (Poirel & Nordmann, 2002; Livermore, 2002). Segundo a classificação de Ambler, podem se estruturar em três grupos: classe A (grupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros) (Bush *et al.*, 1995), dependentes de serina e inibidas parcialmente por ácido clavulânico, induzíveis e não-transferíveis; classe B (grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros), dependentes do zinco, inibidas por EDTA ou compostos tiólicos, induzíveis ou associadas a plasmídios conjugativos; e classe D, as oxacilinas.

##### 4.5.1 Carbapenemases de classe A

As carbapenemases de classe A podem ser amplamente divididas em cinco grupos maiores, sobretudo com base filogenética: GES, KPC, SME, IMI e NMC-A (Walther-Rasmussen *et al.*, 2007). O maior grupo em termos de número de membros é o da beta-lactamase de largo espectro da Guiana (GES), que compreende agora os seguintes membros possuindo atividades de carbapenemase: GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6. Genes que codificam beta-lactamases do tipo GES têm sido isolados de muitos membros das Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa*, e são encontrados no sudeste da Ásia, América do Sul, África e Europa (Walsh, 2008).

Até o momento, o grupo KPC compreende apenas quatro membros e tem sido ostensivamente encontrado nos Estados Unidos; no entanto, incidências mais recentes (principalmente envolvendo KPC-2) têm ocorrido em Israel, China, Colômbia e Escócia (Walther-Rasmussen *et al.*, 2007). Até bem recentemente e ao contrário da carbapenemase do tipo GES, a do tipo KPC tem sido encontrada apenas em Enterobacteriaceae; no entanto foi recentemente caracterizada em um isolado de *P. aeruginosa* na Colômbia. Curiosamente, todos os relatos de *bla*<sub>KPC</sub> em Enterobacteriaceae indicam disseminação mediada por plasmídeo, ainda que a única ocorrência em *P. aeruginosa* mostre que o gene está localizado no cromossomo (Walsh, 2008).

Em contraste com as enzimas GES, todas as enzimas do tipo KPC demonstram atividade de carbapenemase mesmo que de forma fraca. A estrutura cristalina da KPC-2, determinada no ano passado, revelou uma ligeira mudança na posição da serina 70 (também presente em NMC-A e SME-1). Também há mudança nos resíduos de asparagina 132 e 170, facilitando a ligação dos carbapenems e cefamicinas (Ke *et al.*, 2007).

#### 4.5.2 Carbapenemases do tipo OXA

Oxacilinas são também conhecidas como beta-lactamases de classe D, e sua atividade de carbapenemase é encontrada frequentemente em *Acinetobacter spp.* O nível de atividade hidrolítica exibido pelas carbapenemases do tipo OXA é consideravelmente fraco quando comparado à das MBLs, portanto cepas que produzem essas enzimas podem necessitar de mecanismos adicionais de resistência (diminuição de permeabilidade e bomba de efluxo) para que as concentrações inibitórias mínimas (MICs) para meropenem e imipenem fiquem acima dos pontos de corte clínicos (Towner *et al.*, 2008).

Com base na homologia das seqüências, as carbapenemases OXA podem ser divididas nos seguintes “clusters”: OXA-23 (inclui OXA-27 e OXA-49), OXA-24 (inclui OXA-25, OXA-26 e OXA-40) e OXA-58 (Poirel *et al.*, 2007; Walther *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2006). O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> tanto pode ser cromossomal como mediado por plasmídeo e é encontrado quase sem exceção apenas em *A. baumannii*, sendo a

única exceção um relato em *P. mirabilis* em 2002. Interessantemente, apesar das evidências que membros de *Enterobacteriaceae* podem adquirir e expressar genes OXA, alguns estudos sugerem que existem fatores ainda não conhecidos que parecem restringir sua disseminação em outras famílias bacterianas (Walsh, 2008).

O grupo OXA-23 tem sido reportado no mundo todo, sendo particularmente proeminente em certas regiões geográficas, como tem sido relatado recentemente em Londres (Coelho *et al.*, 2006). O grupo OXA-24 pode ser cromossomal ou mediado por plasmídeo e aparece menos disseminado que o OXA-23, com relatos geralmente restritos à Europa e Estados Unidos (Walsh, 2008). Recentemente, a estrutura cristalina do OXA-24 foi determinada para elucidar por que algumas oxacilinas possuem especificidade pelos carbapenens. No caso do OXA-24, ela é aumentada por uma barreira hidrofóbica criada pelo posicionamento preciso da tirosina (112) e metionina (223) na cadeia lateral (Santillana *et al.*, 2007). Outras enzimas de classe D que possuem atividade de carbapenemase também contêm estas substituições ou resíduos possuindo função similar. O terceiro grupo, o OXA-58, é geneticamente diferente e tem sido reportado em muitos países ao redor do mundo (Walsh, 2008).

#### 4.5.3 Carbapenemases de classe B ou metalo-beta-lactamases

As beta-lactamases de classe B ou metalo-beta-lactamases (MBLs), se caracterizam por apresentarem um ou dois íons de zinco perto do sítio ativo, facilitando o reconhecimento e especificidade para a hidrólise dos carbapenens (Madgwick *et al.*, 1987). Os genes que codificam para estas enzimas se encontram com frequência no cromossomo bacteriano, no entanto estudos recentes descrevem a disseminação de cepas MBL positivas através de elementos genéticos móveis, tais como integrons e plasmídeos conjugativos, que promovem a transferência horizontal de MBLs entre diferentes espécies bacterianas, o que facilita a divergência evolutiva destas enzimas (Ito *et al.*, 1995; Iyobe *et al.*, 1996).

Integron é um grupo especializado de cassetes gênicos cada um dos quais codifica um gene de resistência a antibióticos. O integron normalmente codifica sua própria integrase (*int*) que facilita a inserção do cassete gênico nos sítios de integração (*attI*) do integron (Sacha *et al.*, 2008).

Muitos estudos caracterizando os genes de MBL encontram-os inseridos em integrons de classe 1 comuns (Brizio *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003). Esses integrons são responsáveis pela transferência dos genes *bla* entre espécies divergentes de bactérias Gram-negativas. Já há algum tempo, um aumento no número de genes *bla* tem sido descoberto em integrons (Weldhagen, 2004). Elementos genéticos móveis que contêm integrons são uma importante fonte para a disseminação de genes *bla* e outros determinantes. Integrons não são móveis, porém sua localização em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, permite seu movimento (Bennet, 1999). Genes de beta-lactamases localizados em integrons são freqüentemente acompanhados por genes que codificam resistência a antibióticos não-relacionados (Boucher *et al.*, 2007). As MBLs transferíveis são comumente codificadas por genes carregados por integrons de classe 1 ou 3. Esses integrons por sua vez, podem ser carregados por largos plasmídeos ou serem localizados no cromossomo (Walsh *et al.*, 2005; Pournaras *et al.*, 2002).

As MBLs se destacam por serem capazes de hidrolizar notavelmente os carbapenêmicos. No entanto, não apresentam atividade contra monobactâmicos (aztreonam). As MBLs se classificam em três grupos funcionais: 3a, 3b e 3c. O grupo 3a hidroliza penicilinas e cefalosporinas de terceira geração e a atividade é mais específica e rápida contra os beta-lactâmicos que contra o imipenem; este grupo de enzimas necessita de um suplemento adicional de íons divalentes de zinco para maximizar sua atividade catalítica. As do grupo 3b são chamadas “carbapenemases verdadeiras”, por apresentarem uma alta afinidade para hidrolizar carbapenens, não podendo ser detectadas na presença da cefalosporina cromógena “nitrocefina”. O grupo 3c inclui apenas as MBLs de *Legionella spp.*, sendo enzimas com alta atividade hidrolítica contra cefalosporinas (Wang *et al.*, 1999; Docquier *et al.*, 2002).

Com base na seqüência de aminoácidos, as MBLs se classificam em cinco famílias: IMP, VIM, SPM, GIM e SIM. A família IMP foi encontrada pela primeira vez no Japão, em um isolado de *S. maltophilia* e até o momento já foram descritas 18 variantes. São reportadas mais freqüentemente em *Pseudomonas spp.* e *Serratia spp.* (Franceschini *et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 2004). A MBL VIM foi descrita pela primeira vez em 1999 na Europa e foi encontrada em isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*; posteriormente a variante VIM-2 foi descrita na Coréia em isolados de *Serratia*

*marcescens* e *Acinetobacter spp.* A partir deste momento, foram descritas mais cinco variantes: VIM-3, que foi descrita pela primeira vez em Taiwan, em isolados identificados como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas stutzeri*; VIM-4 em *P. aeruginosa*; VIM-5 identificada na Grécia em *K. pneumoniae*; e recentemente, VIM-6 encontrada em *E. coli* e VIM-7 em *P. aeruginosa*, reportada nos Estados Unidos (Lauretti *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001).

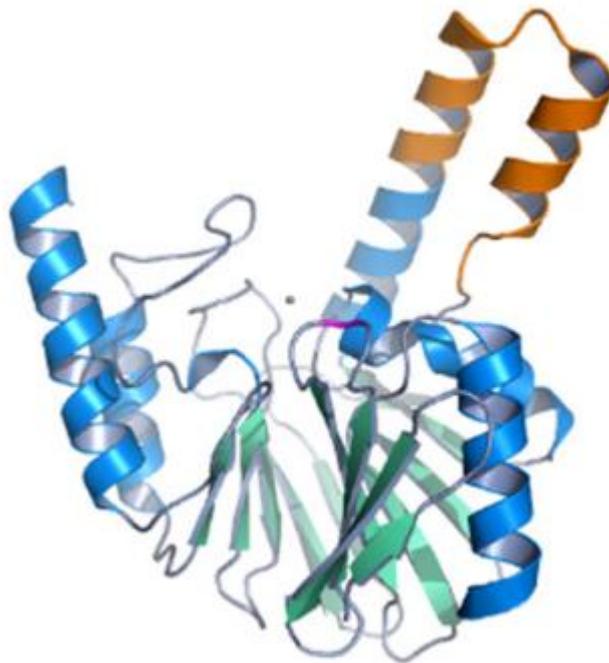
O terceiro grupo, SPM foi encontrado pela primeira vez em um isolado de *P. aeruginosa* recuperado do trato urinário de um paciente hospitalizado em São Paulo, Brasil em 1997. Este isolado foi analisado como parte do programa de vigilância SENTRY e demonstrou conter o novo gene de MBL, denominado *bla*<sub>SPM-1</sub> (Figura 6) (São Paulo MBL) (Toleman *et al.*, 2002). A cepa 48-1997A foi obtida de hemocultura e o paciente em questão era uma menina de quatro anos de idade com leucemia que posteriormente desenvolveu um quadro de infecção. O isolado mostrou ser altamente resistente a todos os antimicrobianos normalmente utilizados como terapia padrão contra Gram-negativos, exceto colistina (Walsh *et al.*, 2005).

Quando a seqüência do SPM-1 foi comparada com a das outras MBLs, foi encontrada uma maior similaridade com a do IMP-1 (35,5%) (Toleman *et al.*, 2002). No entanto o SPM-1 difere significativamente dos grupos IMP e VIM devido principalmente pela presença de uma inserção de 24 aminoácidos logo após o sítio ativo, HFHLD. Esta inserção foi demonstrada ser muito flexível e atua como um “gancho”, provavelmente aumentando a ligação e hidrólise dos beta-lactâmicos (Walsh *et al.*, 2005).

Enquanto a maioria dos genes de MBL (IMP ou VIM) é mobilizada por integrons ou transposons, uma minoria parece ser mobilizada com regiões móveis comuns (CR) que também têm sido associadas com outros elementos móveis chamados regiões STX. O gene que codifica a enzima SPM-1 é associado com dois diferentes tipos de elemento CR (ISCR – região comum IS) (Toleman *et al.*, 2006; Toleman *et al.*, 2002). O gene *bla*<sub>SPM-1</sub> não é parte de um cassete gênico e nem é achado nas vizinhanças de um integron de classe 1 como outros genes de MBL. O gene está localizado e associado a uma variante de ISCR, chamada de ISCR4 (Toleman *et al.*, 2002).

Até agora, o SPM-1 não se disseminou para nenhuma outra espécie bacteriana a não ser a *P. aeruginosa* e para nenhum outro país que não o Brasil. Este gene é, sem

exceção, codificado cromossomicamente e a maioria dos surtos hospitalares é devido a um único clone (Walsh, 2008).



**Figura 6** – Estrutura tridimensional da metalo-beta-lactamase SPM-1 (Bebrone, 2007).

Por sua vez, GIM-1 foi encontrada pela primeira vez no ano de 2002 em cinco isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* oriundos de diferentes pacientes em um centro médico de Düsseldorf, na Alemanha. Esta família apresenta uma relação estreita com a variante IMP-1, mostrando 40% de identidade com a seqüência de aminoácidos de IMP-1, e difere das classes VIM e SPM-1 em 28-31% e 28% respectivamente (Castanheira *et al.*, 2004). GIM-1 não é capaz de hidrolisar o aztreonam nem os inibidores de serino-beta-lactamases. *bla*<sub>GIM-1</sub> pode ser localizado num plasmídeo de 22 kb e num integron de classe 1, que também inclui os cassetes gênicos *aacA4*, *aadA1* e *bla*<sub>OXA-2</sub>. (Strateva *et al.*, 2009). Mais recentemente, SIM-1, codificada pelo gene *bla*<sub>SIM-1</sub> detectado em sete *A. baumannii* isolados de um hospital terciário em Seul, Coréia (Lee *et al.*, 2005) era a última família de MBLs descrita até então (Figura 7).

Enzima	Variante	Microrganismo	País
IMP	IMP-1	<i>S. marcescens</i>	Japão
		<i>Acinetobacter</i> sp.	Argentina, Brasil, Japão
		<i>P. aeruginosa</i>	Japão, Brasil
	IMP-2	<i>A. baumannii</i>	Itália
		<i>P. aeruginosa</i>	Japão
	IMP-3	<i>S. flexneri</i>	Japão
	IMP-4	<i>Acinetobacter</i> sp.	Japão
	IMP-5	<i>A. baumannii</i>	Portugal
	IMP-6	<i>S. marcescens</i>	Japão
	IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Canadá
	IMP-8	<i>K. pneumoniae</i>	Taiwan
	IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	China
	IMP-10	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
	IMP-11	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
		<i>S. marcescens</i>	Japão
	IMP-12	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>
<i>P. aeruginosa</i>			Itália
IMP-16		<i>P. aeruginosa</i>	Brasil
		<i>P. aeruginosa</i>	Itália
VIM	VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Itália
		<i>Acinetobacter</i> sp.	Grécia
		<i>K. pneumoniae</i>	Grécia
	VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia
		<i>P. aeruginosa</i>	França, Polônia, Venezuela
	VIM-3	<i>P. fluorescens</i>	Chile
		<i>P. aeruginosa</i>	Taiwan
	VIM-4	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia
	VIM-5	<i>K. pneumoniae</i>	Turquia
	VIM-6	<i>P. putida</i>	Cingapura
	VIM-7	<i>P. aeruginosa</i>	EUA
VIM-8	<i>P. aeruginosa</i>	Colômbia	
VIM-9	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido	
VIM-10	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido	
VIM-11	<i>P. aeruginosa</i>	Argentina	
SPM	SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil
GIM	GIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Alemanha
SIM	SIM-1	<i>A. baumannii</i>	Coreia

**Figura 7** – Dados dos exemplares de cada uma das variantes encontradas nas cinco subclasses de MBLs adquiridas descritas até 2006 (Picoli, 2008).

Surpreendentemente, em 2007 e 2008, foram reveladas ao mundo duas novas MBLs. A primeira delas, AIM, codificada pelo gene AIM-1 foi identificada num isolado de *P. aeruginosa* na Austrália (Young *et al.*, 2007). Por último, temos a KHM-1, uma MBL mediada por plasmídeo que foi detectada num isolado de *Citrobacter freundii* de um paciente com infecção do trato urinário associado ao uso de catéter em um hospital universitário de Tóquio no Japão (Sekiguchi *et al.*, 2008).

#### 4.6 Métodos para detecção da produção de metalo-beta-lactamases

A disseminação global de cepas produtoras de MBLs tem sido um fato de grande preocupação atualmente e a sua detecção precoce é de suma importância. Vários métodos fenotípicos para detecção de bactérias produtoras de MBLs foram descritos. Todos estes métodos se baseiam na habilidade quelante de metais, de substâncias como o EDTA e os compostos de tiol, que agem sobre o zinco, inibindo a atividade das enzimas. Estes incluem o teste de sinergia de disco-duplo usando EDTA com imipenem ou ceftazidima (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004); o teste do ácido 2-mercaptopropiônico com ceftazidima ou imipenem (Arakawa *et al.*, 2000); o teste de Hodge modificado (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003); teste de disco combinado usando EDTA com ceftazidima ou imipenem (Yan *et al.*, 2004; Yong *et al.*, 2002); o MBL Etest (AB BioDisk company, Solna, Sweden) (Walsh *et al.*, 2002) e o método de microdiluição usando EDTA e o 1,10-phenanthroline com imipenem (Migliavacca *et al.*, 2002).

As técnicas genéticas usadas para se detectar MBLs são similares àquelas que já têm sido usadas para a caracterização molecular de inúmeras outras beta-lactamases, como as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs). A análise por PCR oferece resultados confiáveis e satisfatórios (Senda *et al.*, 1996) e baseia-se na detecção das seqüências referentes às diferentes metalo-beta-lactamases através de iniciadores específicos. Desde a década de 1990, novos genes de MBL têm sido detectados por PCR em vários locais do mundo, como América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia (Toleman *et al.*, 2002; Castanheira *et al.*, 2004).

#### 4.7 Epidemiologia molecular

O estudo da epidemiologia relacionado a surtos bacterianos é hoje o resultado de estímulos que levaram epidemiologistas e microbiologistas a desenvolverem técnicas que respondessem à principal hipótese da epidemiologia molecular, que é verificar “se o isolado A tem relação com o isolado B”. Atualmente vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar essa questão, e apesar de se acreditar que o seqüenciamento de DNA de genes altamente variáveis irá se tornar o método de escolha pelos

epidemiologistas moleculares no futuro, atualmente a técnica ainda considerada como “padrão ouro” para a tipagem é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (Swaminathan *et al.*, 2001; Goering, 2004; Fey *et al.*, 2003).

PFGE é essencialmente a comparação de grandes fragmentos de DNA genômico após a digestão com uma enzima de restrição. Uma vez que o cromossomo bacteriano é tipicamente uma molécula circular, sua digestão resulta em várias moléculas lineares de DNA. O conceito básico da interpretação deste experimento é o seguinte: se alguém está comparando duas cepas que são clones, os sítios onde as enzimas de restrição atuam no DNA e a distância entre eles serão idênticos. Portanto após a digestão do DNA e da eletroforese em gel de agarose, se o padrão de bandas gerado entre quaisquer dois ou mais isolados for exatamente igual, então esses isolados são considerados a mesma cepa. Reciprocamente, se dois isolados não são a mesma cepa, então os sítios onde as enzimas de restrição atuam e a distância entre eles será diferente, assim como o padrão de bandas gerado (Swaminathan *et al.*, 2001; Goering, 2004; Fey *et al.*, 2003).

A preparação do DNA genômico adequado para o PGFE se inicia com a lise das células bacterianas que são previamente incorporadas e aprisionadas em pequenos blocos de agarose chamados “plugs”. Após sucessivas lavagens, o DNA dentro dos plugs é então digerido com enzimas de restrição e submetido a um tipo de eletroforese especial. PFGE difere de uma eletroforese em gel de agarose convencional porque nela há uma mudança periódica na orientação do campo elétrico ao qual o gel está submetido, enquanto que na eletroforese padrão o campo elétrico é unidirecional e constante. É justamente essa variabilidade no campo elétrico que permite ao PFGE separar grandes fragmentos (>600 kb) que são utilizados nas análises (Swaminathan *et al.*, 2001; Goering, 2004; Fey *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que a qualidade do DNA preparado para a corrida eletroforética é de fundamental importância, pois como o objetivo é a separação de fragmentos de alto peso molecular, é imprescindível assegurar sua integridade. Moléculas grandes de DNA em solução, normalmente utilizadas nas preparações convencionais sofrem danos proporcionais ao quadrado de seu peso molecular (Smith *et al.*, 1987). É por isso que a extração de DNA cromossômico a ser usado em PFGE é feita com a incorporação das células bacterianas a serem lisadas em blocos de agarose, que proporciona proteção mecânica às moléculas de DNA. Durante o preparo dos

blocos, a proporção entre as células bacterianas em suspensão usadas e a agarose ultrapura deve ser de 1:1, pois o excesso de agarose produz blocos rígidos que dificultam a posterior digestão do DNA, bem como, nas etapas de lavagem, a remoção dos interferentes tais como proteínas, DNAses, etc. Contrariamente, se a concentração de agarose for menor, o bloco terá consistência mole e poderá ser destruído durante o processo de lavagem (Birren *et al.*, 1993).

Outro aspecto importante no preparo do DNA a ser utilizado em PFGE é a proteção do material contra DNAses que são ativadas pela lise celular. Com este intuito as amostras normalmente são tratadas com um agente quelante (EDTA 0,5M), que sequestra os íons de magnésio que atuam como co-fatores das DNAses. Uma outra vantagem da incorporação do DNA em blocos de agarose é a estabilidade das amostras durante meses quando mantidas em temperaturas de 4°C, o que permite a reprodutibilidade dos experimentos (Smith *et al.*, 1987).

Em relação à quantidade de enzima de restrição, geralmente são utilizadas de 30 a 40U por plug, porém estes valores ainda podem variar para mais ou para menos de acordo com a espécie bacteriana.

Para interpretar os padrões de fragmentação do DNA gerados pelo PFGE e transformá-los em informação epidemiologicamente importante, é necessário saber como comparar esses padrões e como eventos genéticos aleatórios podem alterá-los. O padrão do PFGE de isolados que supostamente estejam causando o surto ou epidemia deve ser indistinguível entre eles e distintamente diferente daquele apresentado por cepas epidemiologicamente não-relacionadas (Tenover *et al.*, 1995). Considera-se que um mínimo de 10 fragmentos de DNA, ou seja, 10 bandas no gel devem ser obtidas por bactéria para que a técnica tenha poder discriminatório relevante. Uma linhagem é considerada semelhante ou intimamente relacionada à outra quando ocorre um único evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão de bandas. Qualquer um destes eventos altera o padrão da linhagem epidêmica em duas ou três bandas. Uma bactéria é considerada possivelmente relacionada quando as mudanças de padrão de restrição forem compatíveis com dois eventos genéticos, resultando em alterações envolvendo entre quatro e seis bandas. Quando o padrão da linhagem epidêmica possuir mais da metade das bandas diferentes em relação ao padrão de outras bactérias, estas devem ser consideradas não-relacionadas geneticamente (Magalhães *et*

*al.*, 2005). Tenover *et al* (1995) também sugerem que o padrão da linhagem responsável pelo surto deve ser chamado de A; aqueles semelhantes ou possivelmente relacionados de A1, A2, A3 e assim por diante. Os não-relacionados devem ser designados tipo B, tipo C, etc.

#### **4.8 Ocorrência de metalo-beta-lactamases no Nordeste**

No nordeste brasileiro, poucos trabalhos descrevem a produção de metalo-beta-lactamases. No trabalho de Santos-Filho (2002), 4 dentre 20 (20%) isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos coletados em laboratórios clínicos de João Pessoa, Paraíba, foram caracterizados como produtores de metalo-beta-lactamases. Em Recife, Pernambuco, Magalhães *et al* (2005), analisaram 24 isolados de *P. aeruginosa* coletados de diversos hospitais da cidade e observaram que 15 (62,5%) foram MBL positivos. Em contraste, recentes trabalhos desenvolvidos em nosso grupo com isolados resistentes a imipenem coletados no biênio 2002/2003 oriundos do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, revelaram que o mecanismo de produção de metalo-beta-lactamases estava presente em quase 100% dos isolados analisados (Cavalcanti *et al.*, 2008).

#### **4.9 As metalo-beta-lactamases como desafio terapêutico**

O tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de MBL constitui um grande desafio, uma vez que estes isolados geralmente apresentam perfis de resistência bastante significativos contra a maioria dos antibióticos comercialmente disponíveis, o que incluem os inibidores de beta-lactamases a exemplo do ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Nos dias atuais, a detecção de isolados clínicos produtores de MBL que exibem sensibilidade apenas a colistina tem aumentado seriamente no mundo todo e constituem uma situação ameaçadora tanto para os pacientes como para a equipe hospitalar, uma vez que, na prática, isso traduz um fenótipo de pan-resistência (Sader *et al.*, 2005; Cipriano *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* revelam que a tigeciclina e a colistina são as únicas drogas com atividades consistentes contra cepas MDR ou pan-resistentes produtoras de MBL (Maltezou, 2008). A tigeciclina é uma minociclina análoga que

exibe excelente atividade, alcançando taxas de efetividade de até 100% contra patógenos nosocomiais Gram-negativos, incluindo alguns MDR, tais como: *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e outras Enterobacteriaceae; no entanto este agente age pobremente contra *P. aeruginosa* (Chopra *et al.*, 2008; Souli *et al.*, 2006).

A colistina é um antimicrobiano que interage com os fosfolipídios de membrana, alterando a permeabilidade da mesma e resultando na morte da célula bacteriana. Seu uso chegou a ser abandonado na década de 80 devido a relatos de alta nefrotoxicidade, no entanto nos dias atuais esta droga foi reintroduzida para tratamento de infecções do tipo MDR causadas por bactérias Gram-negativas. O espectro da colistina abrange a maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* MDR, *Acinetobacter sp.*, *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.* (Conly & Johnston, 2006).

Em relação aos inibidores ou inativadores conhecidos das beta-lactamases de classe A, ou serino beta-lactamases, todos são ineficientes frente às metalo-beta-lactamases (Bebrone, 2007). A propagação de MBLs entre cepas bacterianas nosocomiais justifica a busca por componentes que possam impedir a atividade dessas enzimas. Infelizmente, a descoberta de um inibidor de metalo-beta-lactamases específico e clinicamente útil é bastante difícil, uma vez que é necessário que esse composto permaneça inativo contra as proteínas humanas que porventura façam parte da superfamília das metaloenzimas, como por exemplo, a enzima ECA, que converte a angiotensina I em II e tem ação vasoconstrictora.

Outra dificuldade é achar um composto que seja ativo contra as três subclasses de MBLs, assim como a todas as enzimas dentro de uma mesma subclasse. Atualmente, os inibidores têm alguma ação contra um ou dois tipos de MBLs e são muito menos efetivos contra os outros tipos. Por tudo isso, seu uso permanece inviável como opção terapêutica (Bebrone, 2007).

Devido à indisponibilidade de regimes terapêuticos efetivos na prática clínica, aliado à inexistência de um inibidor seguro contra as MBLs, grandes testes e ensaios randômicos controlados são necessários para definir o melhor tratamento dessas infecções. Enquanto isso, nossos esforços devem estar focados no uso racional e sensato dos agentes antimicrobianos existentes; na implementação e reforço de sistemas de vigilância acerca de bactérias resistentes; e na melhoria das práticas de controle de infecção (Maltezou, 2008).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKAWA, Y., N. SHIBATA, K. SHIBAYAMA, H. KUROKAWA, T. YAGI, H. FUJIWARA, M. GOTO. **Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds.** J Clin Microbiol. 38:40–43. 2000.

BABIC M, HUJER AM, BONOMO RA. **What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases.** Drug Resist Updat. 9(3):142-56. 2006.

BEBRONE C. **Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily.** Biochem Pharmacol. 15;74 (12):1686-701. 2007.

BENNETT PM. **Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria.** J Antimicrob Chemother. ;43:1-4. 1999.

BIRREN B, LAI E. **Switch intervals and resolution in pulsed field gels. In: Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide.** San Diego: Academic Press; p.107-20. 1993.

BLANC DS, PARRET T, JANIN B, RASELLI P, FRANCIOLI P. **Nosocomial infections and pseudoinfections from contaminated bronchoscopes: two-year follow up using molecular markers.** Infect Control Hosp Epidemiol. 18:134-6. 1997.

BOU G, OLIVER A, MARTINEZ-BELTRAN J. **OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain.** Antimicrob Agents Chemother. 44:1556-1561. 2000.

BOUCHER Y, LABBATE M, KOENING JE, STOKES HW. **Integrans:mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria.** Trends Microbiol. ;15:301-309. 2007.

BRIZIO A, CONCEIÇÃO, PIMENTEL M, DA SILVA G, DUARTE A. **High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.** Int J Antimicrob Agents. ;27:27-31. 2006.

BROOKS GF, BUTEL JS, MORSE SA. JAWETZ, MELNICK & ADELBERG. **Microbiologia Médica.** 210 edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 611pp. 2000.

BRYAN LE. **Microbial resistance to drugs.** Springer-Verlag, Berlin. 1989.

BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.** Antimicrob Agents Chemoter. 39:1211-1233. 1995.

CASTANHEIRA M, TOLEMAN MA, JONES RN, SCHMIDT FJ, WALSH TR. **Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase.** Antimicrob Agents Chemoter. 48:4654-4661. 2004.

CAVALCANTI FLS, ALMEIDA ACS, BARBOSA BGV, VILELA MA, MORAIS MMC, MORAIS JUNIOR MA. **Class B carbapenemase production by clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*.** Anais do I Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. Gramado, Rio Grande do Sul. 2008.

CHOI JY, SIFRI CD, GOUMNEROV BC, RAHME G, AUSUBEL FM, CALDERWOOD SB. **Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis.** J Bacteriol. 184:952-61. 2002.

CHOPRA I, SCHOFIELD C, EVERETT M, O' NIELL A, MILLER K, WILCOX M, et al. **Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement.** Lancet Infect Dis ;8:133–9. 2008.

CIPRIANO R, VIEIRA VV, FONSECA EL, RANGEL K, FREITAS FS, VICENTE AC. **Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the blaSPM clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City.** Microb Drug Resist ;13:142–6. 2007.

COELHO JM, TURTON JF, KAUFMANN ME, et al. **Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and southeast England.** J Clin Microbiol; 44:3623–3627. 2006.

CONLY JM, JOHNSTON BL. **Colistin: the phoenix arises.** Can J Infect Dis Med Microbiol ;17:267–9. 2006.

COURVALIN P. **Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria.** Antimicrob Agents Chemother 38:1447. 1994.

CRISTINO JM. **Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria.** J Antimicrob Agents. ;12:199-202. 1999.

DOCQUIER JD, PANTANELLA F, GIULIANI F, THALLER MC, AMICOSANTE G, GALLEN M, et al. **CAU-1, a subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase of low substrate affinity encoded by an ortholog present in the *Caulobacter crescentus* chromosome.** Antimicrob Agents Chemother. 46:1823-1830. 2002.

FEY, P.D. AND RUPP, M.E. **Molecular epidemiology in the public health and hospital environments.** In: Hinrichs, S.H., and Wisecarver, J. editors. Clinics in Laboratory Medicine, Molecular methods in Diagnostic Microbiology. Philadelphia, USA. W.B. Saunders Company; 885-901. 2003.

FONTANA R, LO CG, GIACOBONE E, et al. **Resistance surveillance in Italy: four-year results from the MYSTIC program.** J Chemother. 14:323–31. 2002.

FRANCESCHINI N, CARAVELLI B, DOCQUIER JD, GALLEN M, FRERE JM, AMICOSANTE G, *et al.* **Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase.** Antimicrob Agents Chemother. 44:3003-3007. 2000.

GALES AC, JONES RN, FORWARD KR, LINARES J, SADER HS, VERHOEF J. **Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999).** Clin Infect Dis. 32:104-113. 2001.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, PAPADIMITRIOU E, GALANAKIS N, *et al.* **Multidrug resistance to antimicrobials as a predominant factor influencing patient survival.** Int J Antimicrob Agents. ;27:476-481. 2006.

GIAMARELLOU H. **Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections.** J Antimicrob Chemother. ;49:229-233. 2002.

GOERING, R.V. **Pulsed-field gel electrophoresis.** In: **Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y-W., Unger, E.R., Relman, D.A., and White, T.J., editors.** Molecular Microbiology; Diagnostic Principles and Practice. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 185-196. 2004.

HANSON ND, HOSSAIN A, BUCK I, MOLAND ES, THOMSON KS. **IMP-18 in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States.** Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington. D.C; abstr. C1-291. 2004.

HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH P HA, STALEY JT, WILLIAMS ST. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 1994.

HURST M, LAMB HM. **Meropenem: a review of its use in patients in intensive care.** Drugs. 59:653-80. 2000.

ITO H, ARAKAWA Y, OHSUKA S, WACHAROTAYANKUN R, KATO N, OHTA M. **Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *blaIMP* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*.** Antimicrob Agents Chemother. 39:824-829. 1995.

IYOBE S, YAMADA H, MINAMI S. **Insertion of a carbapenemase gene cassette into an integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid.** J Antimicrob Chemother. 38:1114-1115. 1996.

JAWETZ E, MELNICK JL, ADELBERG EA. **Microbiologia Médica.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 20 ed. 1995.

JONES RN, DESHPANDE L, FRITSCHER TR, SADER HS. **Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999–2003).** Diagn Microbiol Infect Dis. 49:211–6. 2004.

KE W, BETHEL CR, THOMSON JM, et al. **Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases.** Biochemistry; 46:5732–5740. 2007.

KOHLER T, MICHEA-HAMZEHPUR M, EPP SF, PECHERE JC. **Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems.** Antimicrob Agents Chemother. 43:424–7. 1999.

LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R, et al. **Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate.** Antimicrob Agents Chemother. 43:1584-1590. 1999.

LEE, K. *et al.* **Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea.** Antimicrob Agents Chemother, v. 49, n. 11, p. 4485-91. 2005.

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

LEE, K., Y. S. LIM, D. YONG, J. H. YUM, Y. CHONG. **Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.** J. Clin. Microbiol. 41:4623–4629. 2003.

LEVIN BR, LIPSITCH M, PERROT V, *et al.* **The population genetics of antibiotic resistance.** Clin Infect Dis. 24 (Suppl 1): S9-16. 1997.

LINDEN PK, KUSNE S, COLEY K, FONTES P, KRAMER DJ, PATERSON D. **Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.** Clin Infect Dis. 37: e154-e160. 2003.

LIVERMORE DM. **The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy.** Curr Opin Investig Drugs. 3:218-224. 2002.

MADGWICK. P, WALEY SG. **Beta-lactamase I from *Bacillus cereus*. Structure and site-directed mutagenesis.** J Biochem. 15:657-662. 1987.

MAGALHÃES, M. *et al.* **Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil.** Brazilian J. of Microbiology. 36:123-125. 2005.

MALTEZOU HC. **Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?** Int. J. Antimicrob. Agents. 2008.

MIGLIAVACCA, R., J. D. DOCQUIER, C. MUGNAIOLI, G. AMICOSANTE, R. DATURI, K. LEE, G. M. ROSSOLINI, L. PAGANI. **Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Clin. Microbiol. 40:4388–4390. 2002.

MIMS C, PLAYFAIR J, ROITT I, WAKELIN D, WILLIAMS R. **Microbiologia Médica.** 20 edição. Manole, São Paulo. 584 pp. 1999.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA. **Microbiologia Médica.** 4 edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 776 pp. 2004.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS). **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999.** Am J Infect Control. 27:520-532. 1999.

NEU HC. **The crisis in antibiotic resistance.** Science; 257:1064-73. 1992.

NIKAIDO H. **Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux.** Science. 264:382-388. 1994.

NORDMANN P, GUIBERT M. **Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Antimicrobial Chemother. 42:3190-3195. 1998.

ONO Y. ***Pseudomonas aeruginosa*.** Nippon Rinsho. 60:2150-5. 2002.

PICOLI, SU. **Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*.** RBAC, vol. 40(4): 273-277. 2008.

POIREL L, NAAS T, NICOLAS D. **Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France.** *Antimicrob Agents Chemother.* ;44:891-897. 2000.

POIREL L, NORDMANN P. **Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes.** *Clin Microbiol Infect.* 8:321–31. 2002.

POIREL L, NORDMANN P. **Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother*; 50:1442–1448. 2006.

POIREL L, PITOUT JD, NORDMANN P. **Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences.** *Future Microbiol*; 2:501–512. 2007.

POURNARAS S, TSAKRIS A, MANIATI M, TZOUVELEKIS LS, MANIATIS AN. **Novel variant (blaVIM-4) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother.* ;46:4026-4028. 2002.

PUBLIC HEALTH INITIATIVE RESEARCH INSTITUTE. **Report from the Bacterial Antibiotic Resistance Group/Infectious Disease Center.** Washington, DC: US Government Printing Office. 1997.

QUINTEIRA S, SOUZA JC, PEIXE L. **Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-beta-lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 49:451-453. 2005.

RODLOFF AC, GOLDSTEIN EJC, TORRES A. **Two decades of imipenem therapy.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 58, 916–929. 2006.

RUIZ L, DOMINGUEZ MA, RUIZ N, VINAS M. **Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting.** Arch Med Res. 35:251-257. 2004.

SACHA PAWEL, WIECZOREK PIOTR, HAUSCHILD TOMASZ, ZÓRAWSKI MARCIN, OLSZAŃSKA DOROTA, TRYNISZEWSKA ELZBIETA. **Metallo- $\beta$ -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* - a novel mechanism resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics.** Folia histochemica Et cytobiologica. Vol. 46, No. 2, pp. 137-142. 2008.

SADER HS, JONES RN, GALES AC, SILVA JB, PIGNATARI AC. **SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001.** Braz J Infect Dis. 8:25-79. 2004.

SADER HS, JONES RN. **Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli.** Int J Antimicrob Agents. 25:95-109. 2005.

SADER HS, REIS AO, SILBERT S, GALES AS. **IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital.** Clin Microbiol Infect; 11:73–6. 2005.

SANDERS CC, SANDERS WE. **Beta-Lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact.** Clin Infect Dis. 15:824-839. 1992.

SANDERS CC. **Beta-lactamases of Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs.** Clin Infec Dis. 14:1089-1099. 1992.

SANTILLANA E, BECEIRO A, BOU G, ROMERO A. **Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis.** Proc Natl Acad Sci USA; 104:5354–5359. 2007.

SANTOS-FILHO, L., SANTOS, I., ASSIS, AML, XAVIER, D. **Determinação da produção de metalo-b-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba.** J Bras Patol Med Lab. 38 (4): 291-296. 2002.

SEKIGUCHI J, MORITA K, KITAO T, WATANABE N, OKAZAKI M, MIYOSHI-AKIYAMA T, KANAMORI M, KIRIKAE T. **KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate.** Antimicrob Agents Chemother. 52 (11): 4194-7. 2008.

SENDA, K., Y. ARAKAWA, S. ICHIYAMA, K. NAKASHIMA, H. ITO, S. OHSUKA, K. SHIMOKATA, N. KATO, M. OHTA. **PCR detection of metallo-b-lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum b-lactams.** J. Clin Microbiol. 34:2909–2913. 1996.

SHIBATA N, DOI Y, YAMANE K, et al. **PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan with focus on the class 3 integron.** J Clin Microbiol. ;41:5407-5413. 2003.

SIQUEIRA FS. **Mecanismos de resistência a beta-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*.** <http://www.crbml.com.br/bio48/rev24.asp>. 2002.

SMITH CL, CANTOR CR. **Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules.** Meth Enzimol ; 155: 449-67. 1987.

SOULI M, KONTOPIDOU FV, KORATZANIS E, ANTONIADOU A, GIANNITSIOTI E, EVANGELOPOULOU P, et al. **In vitro activity of tigecycline against multiple drug-resistant, including pan-resistant, Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals.** Antimicrob Agents Chemother ;50:3166–9. 2006.

SPEERT DP. **Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*.** Front Biosci. 1:354-61. 2002.

STOVER CK, PHAM XQ, ERWIN AL, MIZOGUCHI SD, WARRENER P, HICKEY MJ, BRINKMAN FS, HUFNAGLE WO, KOWALIK DJ, LAGROU M, GARBER RL, GOLTRY L, TOLENTINO E, WESTBROCK WS, YUAN Y, BRODY LL, COULTER SN, FOLGER KR, KAS A, LARBIG K, LIM R, SMITH K, SPENCER D, WONG GK, WU Z, PAULSEN IT, REIZER J, SAIER MH, HANCOCK RE, LORY S, OLSON MV. **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen.** Nature. 406:959-64. 2000.

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

SWAMINATHAN B., BARRETT, T.J., HUNTER, S.B., TAUXE, R.V., and CDC PulseNet Task force. **PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States.** Emerg. Infect. Dis. 7:382-389. 2001.

TENOVER FC, AIRBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: Criteria for bacterial Strain typing.** J Clin Microbiol 33: 2233-2239. 1995.

TENOVER FC, HUGHES JM. **The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply resistant bacterial pathogens.** JAMA. 275:300-4. 1996.

THOMSON KS, PREVAN AM, SANDERS CC. **Novel plasmid-mediated beta-lactamases in Enterobacteriaceae: emerging problems for new beta-lactam antibiotics.** Curr Clin Topics Infect Dis. 16:151-163. 1996.

TODAR K. **Opportunistic Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*.** 2004.

TOLEMAN MA, BENNETT PM, WALSH TR. **ISCR Elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?** Microbiol Mol Biol Rev. ;70: 296-316. 2006.

TOLEMAN MA, BIEDENBACH D, BENNETT DM, JONES RN, WALSH TR. **Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme.** J Antimicrob Chemother. 55:61-70. 2005.

TOLEMAN MA, SIMM AM, MURPHY TA, et al. **Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** J Antimicrob Chemother. ;50: 673-679. 2002.

TORTORA GJ, BERDELL RF, CHRISTINE LC. **Microbiologia.** Artmed, Porto Alegre, 8 ed. 2005.

TOWNER KJ, LEVI K, VLASSIADI M, et al. **Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe.** Clin Microbiol Infect; 14:161–167. 2008.

TRABULSI LR. **Microbiologia.** Atheneu, São Paulo, 2 ed. 1996.

WALSH TR, TOLEMAN MA, HRYNIEWICZ W, BENETT PM, JONES RN. **Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** J Antimicrob Chemother. ;52:116-119. 2003.

WALSH TR, TOLEMENN MA, POIREL L, NORDMAN P. **Metallo- $\beta$ - lactamases; the quiet before the storm?** Clin Microbiol Rev ;18:306-325. 2005.

WALSH TR. **Clinically significant carbapenemases: an update.** Current Opinion in Infectious Diseases; 21:367–37. 2008.

WALSH, T. R., A. BOLMSTROM, A. QWARNSTROM, A. GALES. **Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing.** J Clin Microbiol. 40:2755–2759. 2002.

WALTHER-RASMUSSEN J, HOIBY N. **Class A carbapenemases**. J Antimicrob Chemother; 60:470–482. 2007.

WALTHER-RASMUSSEN J, HOIBY N. **OXA-type carbapenemases**. J Antimicrob Chemother; 57:373–383. 2006.

WANG ZW, FAST W, VALENTINE AM, BENKOVIC SJ. **Metallo- $\beta$ -lactamases: structure and mechanism**. Curr Opin Chem Biol. 3:614-622. 1999.

WEINSTEIN RA. **Nosocomial infection update**. Emerg Infect Dis. 4:416-420. 1998.

WELDHAGEN GF. **Integrans and beta-lactamases - a novel perspective on resistance**. Int J Antimicrob Agents. ;23:556-562. 2004.

WOODFORD N, PALEPOU MF, BABINI GS, HOLMES B, LIVERMORE DM. **Carbapenemases of *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum: distribution of blaB and characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene blaB3, in the type strain NCTC 10016**. Antimicrob Agents Chemother. 44:1448-1452. 2000.

YAGCI A, CIRAGIL P, OVER U, SENER B, ERTURAN Z, SOYLETIR G. **Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Turkish cystic fibrosis patients**. New Microbiol. 26:109-114. 2003.

YAN JJ, HSUEH PR, WEN-CHIEN K, LUH KT, TSAI SH, WU HM, WU JJ. **Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme**. Antimicrob Agents Chemother. 45:2224-2228. 2001.

YAN, J. J., J. J. WU, S. H. TSAI, AND C. L. CHUANG. **Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli**. Diagn Microbiol Infect Dis. 49:5–11. 2004.

YONG, D., K. LEE, J. H. YUM, H. B. SHIN, G. M. ROSSOLINI, Y. CHONG. **Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.** J Clin Microbiol. 40:3798–3801. 2002.

YOUNG, D., J. M. BELL, B. RITCHIE, R. PRATT, M. A. TOLEMAN, AND T. R. WALSH. **A novel sub-group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia,** abstr. C1-593, p. 75. Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2007.

## **6.0 ARTIGO CIENTÍFICO (CAPÍTULO 2)**

Manuscrito a ser submetido ao *Journal of Hospital Infections*. London, UK.

ISSN: 0195-6701

Impact Factor: 2.956

Elsevier

**High incidence and persistence of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* with a pan-resistance profile in a teaching hospital in Recife, Brazil.**

**F.L.S. Cavalcanti<sup>a,b\*</sup> , A.C.S. Almeida<sup>a</sup> , M.A. Vilela<sup>a</sup> , M.M.C. Morais<sup>a</sup> , M.A. Morais Junior<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Laboratory of Microbial Resistance, Department of Pathology, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>b</sup> Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

\* Corresponding author. Address: Rua Marechal Deodoro, 366, apt. 302 B,

Encruzilhada. CEP: 52030-170. Recife-PE, Brasil.

Tel./fax: +55 (81) 3426-9334

*E-mail address:* lipelsc@gmail.com

## 6.1 Summary

Metallo-beta-lactamases (MBLs) constitute the most clinically important group of carbapenemases since they hydrolyse virtually all beta-lactams and, in some cases, also monobactams. It dramatically reduces the therapeutic options currently available. The work aimed to evaluate the susceptibility profile and to describe the prevalence and molecular characteristics of SPM-1-like and IMP-1-like MBLs among nosocomial imipenem and ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. For this purpose 61 samples of the biennium 2002/2003 and 12 samples of the biennium 2008/2009, identified in a teaching hospital, were analysed. The results showed that 86,3% (63/73) of the isolates resistant to imipenem and ceftazidime were confirmed as MBL positives. The *bla*<sub>SPM-1</sub> gene was found in 96,8% (61/63) of these isolates. None of the tested samples were positive for *bla*<sub>IMP</sub>-gene. It was observed that the majority of the isolates were resistant to almost all antibiotics tested, except for polymyxin, an indicative of pan-resistant phenotype. Molecular typing revealed the presence of a clone (A) with seven related subtypes (A1 to A7) among the isolates tested. These findings suggest the recurrent presence of a single MBL-producing clone with resistance to carbapenems in the hospital over the period of study. Moreover, the profile of pan-resistance found also alert to the possible presence of multiple mechanisms of resistance in bacterial isolates, which demands an urgent need for surveillance strategies and improvement of infections control practices.

Key words: carbapenemases, metallo-beta-lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*

## 6.2 Introduction

Nosocomial infections are still an important cause of morbidity and mortality in hospitals, prolonging hospital stay and increasing antibiotic usage and costs.<sup>1</sup> *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important pathogen associated to hospital infections, particularly in immunocompromised patients. Infections by this microorganism are often difficult to treat because of its virulence, intrinsic and acquired antibiotic resistance, and the relatively limited antimicrobial therapy.<sup>2</sup> *P. aeruginosa* demonstrates practically all known enzymic and mutational mechanisms of bacterial resistance. Often these mechanisms can coexist, thus conferring combined resistance to many strains.<sup>3</sup>

Carbapenems, including imipenem and meropenem, are potent agents for the treatment of *P. aeruginosa* infections due to their high stability to most of serin  $\beta$ -lactamases.<sup>4</sup> However, the prevalence of carbapenem resistance in this bacterium has increased worldwide, particularly in Latin America.<sup>5</sup> That resistance could be determined by the loss of OprD outer membrane protein, with an associated overexpression of MexAB-OprM efflux pump, as in the case of meropenem, or by the production of Ambler class B metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs).<sup>3,6</sup> Currently, various MBL-encoding genes are described. The clinically important acquired MBLs among Gram-negative bacteria are IMP, VIM, SPM, GIM and SIM.<sup>7</sup> However, recently, in 2007 and 2008, two news MBLs were revealed to the world: AIM from Australia and KHM from Japan.<sup>8,9</sup> Among them, the *bla*<sub>SPM-1</sub> gene was so far detected only in Brazil and the dissemination of this gene in various regions of the country seems to be related to a single epidemic *P. aeruginosa* clone.<sup>10</sup> An increasing number of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates have been detected in a teaching hospital in Recife. In view of those findings, the present work aimed to investigate the association of resistance to imipenem and ceftazidime by nosocomial *P. aeruginosa* isolates to *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> genes and to perform the molecular typing of the MBL positives isolates.

### 6.3 Methods

The study was carried out from January 2002 to December 2003 and from December 2008 to June 2009 at Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), a 508-bed teaching hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. All imipenem and ceftazidim-resistant *P. aeruginosa* isolates were prospectively recovered from hospitalized patients admitted in the institution. Only one isolate per patient was included in the study.

Bacterial identification was based on the production of characteristic pigments and by biochemical tests, such as: TSI, citrate, lisin and oxidase production. Susceptibility testing was performed by the disk-diffusion method with the following antimicrobial agents: imipenem, ceftazidime, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, piperacillin/tazobactam, aztreonam and polymyxin B, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.<sup>11</sup> Selected isolates were screened for MBL production by the disk approximation test, using filter disks with ceftazidime (30µg) at 25 mm equidistant and disks containing 2,5µL of undiluted 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) solution (Sigma-Aldrich, USA), as described by Arakawa.<sup>12</sup> Isolates were considered to be presumptive MBL producers if they were positive in the disk approximation test.

Presumptive MBL producers were further submitted to DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) for detection of SPM-1-like and IMP-1-like MBL genes. PCR was performed on total DNA using *bla*<sub>SPM-1-like</sub> primers (forward: 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3', reverse: 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3') and *bla*<sub>IMP-1-like</sub> primers (forward: 5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3', reverse: 5'-GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT-3'). The cycling parameters were: 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplification products were dyed with *Blue Green* Loading Dye I (LGC Biotecnologia) according to the manufacturer and submitted to electrophoretic analysis in 1.2% agarose gel, and visualized under UV light. Positive IMP-1 control was a *P. aeruginosa* from Hospital São Paulo (São Paulo-SP, Brazil).

Metallo-β-lactamase isolates were genotyped by DNA macrorestriction followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the restriction endonuclease *SpeI*. The

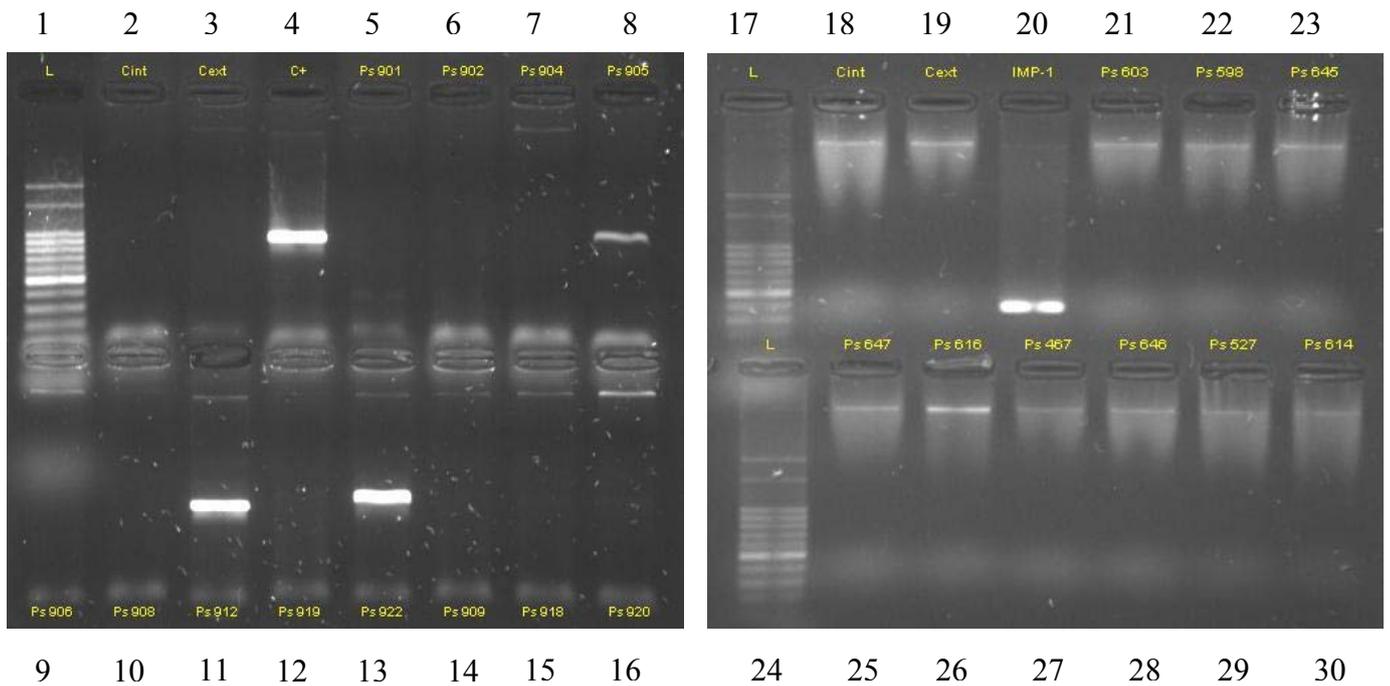
restriction fragments were separated in 1% agarose gels, and electrophoresis was carried out a 4.5 V/cm for 22 h with pulse times ranging from 1.8 s to 18.7 s in a CHEF DR II (BIO-RAD). The banding patterns were interpreted by visual inspections of photographs of ethidium bromide-stained gels. The clonal relation among isolates was established in accordance with the criteria of Tenover.<sup>13</sup>

## 6.4 Results

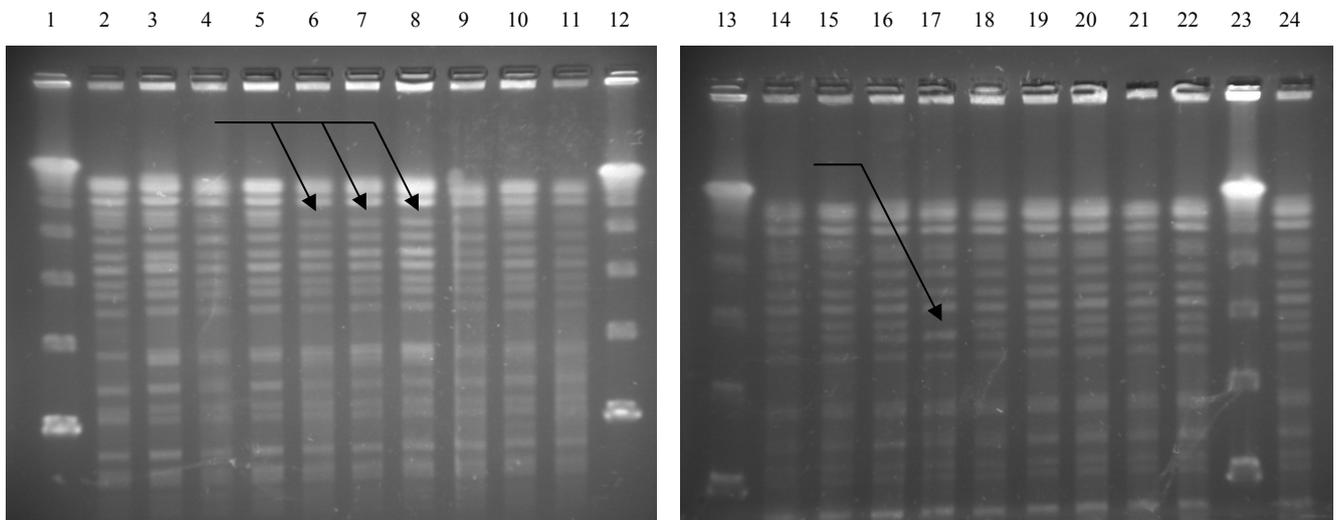
From 172 isolates of *P. aeruginosa* of the biennium 2002/2003, 61 showed resistance both to imipenem and ceftazidime and were included in the study. From the biennium 2008/2009, 12 isolates were selected following the same criterion. We found that 86,3% (63/73) of the isolates resistant to imipenem and ceftazidime were confirmed as MBL positives by disk-approximation phenotypic test.

Susceptibility assays showed that 100% of the isolates from 2002/2003 were resistant to ciprofloxacin, gentamicin and amikacin and 44% were resistant to piperacilin/tazobactam. From years 2008/2009: 100% of the isolates were resistant to ciprofloxacin and gentamicin; 91,6% were resistant to amikacin (8,4% intermediate resistant) and 83,3% were resistant to piperacilin/tazobactam. When the two main drugs for treatment of infections caused by MBL positive strains were analyzed, from isolates of 2002/2003, only 1,63% were resistant to aztreonam (62,2% intermediate resistance). From isolates of 2008/2009, 83,4% were resistant (16,6% intermediate resistance), with no isolate showing sensibility. Regarding to polymixin B, all the isolates of this work were sensible.

PCR assays showed that sixty-one (96.8%) of 63 presumptive MBL producers were positive for *bla*<sub>SPM-1-like</sub> gene. None of the tested samples showed amplification for *bla*<sub>IMP-1-like</sub> gene (Figure 1). PFGE assays of some isolates selected (Figure 2) showed a small diversity, with the presence of a common banding pattern with few variations, which were considered as subtypes of the main clone. These subtypes were clustered and originated 8 genotypes or groups (A to A7). Group A was the most prevalent between the isolates. Phenotypic results, PCR findings and molecular typing of the 63 presumptive MBL producers are summarized in Table I.



**Figure 1** Photos showing 3 random isolates that had the amplification fragment corresponding to the SPM-type MBL (lines 8, 11 and 13) and the absence of amplification between the isolates to the IMP-type MBL. Lines 1, 17 and 24 = ladder 100bp; Lines 2 and 18 = control without DNA; Lines 3 and 19 = MBL negative control; Line 4 = SPM-1 positive control; Line 20 = IMP-1 positive control



**Figure 2** PFGE photos showing the fragmentation pattern of some isolates randomly chosen. Lines 1, 12, 13 and 23 = lambda ladder (CHEF DNA size standards); Lines 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 and 24 = PFGE type A. Lines 6, 7 and 8 = PFGE subtype A2. Line 17 = PFGE subtype A1. The arrows indicate where there was loss of fragment.

**Table I** Microbiological and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

Isolate number	Resistance profile			MBL test	MBL gene	PFGE pattern*
	R	IR	S			
Ps 53	cip ami gen		azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 71	cip ami gen	azt	pol B	+	SPM-1	A
Ps 76	cip ami gen		azt pol B	+	SPM-1	A1
Ps 85	cip ami gen		azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 91	cip ami gen		azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 144	cip ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A2
Ps 158	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	A
Ps 159	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	A2
Ps 169	cip ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A2
Ps 172	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 178	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 199	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 212	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 215	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 241	cip ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 246	cip ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	-
Ps 305	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	-
Ps 307	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	-
Ps 327	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	-
Ps 370	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	-	-
Ps 408	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	-	-
Ps 444	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	-
Ps 445	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	-
Ps 467	cip ami gen pip/taz		azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 527	cip ami gen pip/taz		azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 581	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	A
Ps 598	cip ami gen pip/taz		azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 603	ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 614	ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 616	ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 645	ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 646	ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 647	ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 655	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	A
Ps 668	cip ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	A
Ps 678	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 712	cip ami gen		pip/taz azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 724	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	A
Ps 725	cip ami gen pip/taz		azt pol B	+	SPM-1	-
Ps 727	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	-
Ps 762	ami gen pip/taz	azt	pol B	+	SPM-1	-
Ps 767	cip ami gen	azt	pip/taz pol B	+	SPM-1	-

Ps 773	ami gen	azt	pip/taz	pol B	+	SPM-1	-
Ps 776	ami gen	azt	pip/taz	pol B	+	SPM-1	-
Ps 780	cip ami gen	azt	pip/taz	pol B	+	SPM-1	-
Ps 783	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	-
Ps 790	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	-
Ps 791	cip ami gen pip/taz		azt	pol B	+	SPM-1	-
Ps 793	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	-
Ps 800	cip ami gen	azt	pip/taz	pol B	+	SPM-1	-
Ps 810	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	-
Ps 822	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	-
Ps 830	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	-
Ps 832	cip ami gen		pip/taz	azt pol B	+	SPM-1	-
Ps 842	cip ami gen pip/taz			azt pol B	+	SPM-1	-
Ps 851	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	A3
Ps 860	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	A
Ps 874	cip ami gen	azt		pol B	neg	-	A4
Ps 883	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	A5
Ps 887	cip ami gen			azt pol B	+	SPM-1	A6
Ps 900	cip ami gen		pip/taz	azt pol B	+	SPM-1	A
Ps 901	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	neg	-	-
Ps 902	cip ami gen	azt	pip/taz	pol B	neg	-	-
Ps 904	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	neg	-	-
Ps 905	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	A7
Ps 906	cip ami gen	azt	pip/taz	pol B	neg	-	-
Ps 908	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	neg	-	-
Ps 909	cip gen	azt	ami	pol B	neg	-	-
Ps 912	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	A7
Ps 918	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	neg	-	-
Ps 919	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	neg	-	-
Ps 920	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	neg	-	-
Ps 922	cip ami gen pip/taz	azt		pol B	+	SPM-1	A

R, resistant; IR, intermediately resistant; S, susceptible; +, positive; -, not measured; neg, negative; cip, ciprofloxacin; ami, amikacin; gen, gentamicin; pip/taz, piperacilin/tazobactam; azt, aztreonam; pol B, polymyxin B; \*, by Tenover.

## 6.5 Discussion

MBLs have been increasingly reported worldwide.<sup>7</sup> In Brazil, three MBLs have been reported: IMP, VIM and SPM, but only SPM is widespread, while IMP and VIM are restricted to South and Southeast regions, with few cases registered until now.<sup>14</sup> In this work, we described the molecular analysis of MBL-producing *P. aeruginosa* in terms of genetic determinants of carbapenem resistance and genotypic diversity.

The choice of imipenem for screening the presumptive MBL-producing isolates was based in the fact that resistance to this drug is not caused by the overexpression of MexA-MexB-OprM efflux pump operon, as it has been observed for meropenem. This specificity is dependent on the hydrophobic side-chain at the second position found in meropenem molecule, while imipenem presents a strongly charged and hydrophilic side chains at that position.<sup>15</sup> Therefore, resistance to imipenem is mostly related to MBL production. Ceftazidime was also used for MBL phenotypic tests because MBL-producing isolates usually show high levels of resistance to this antibiotic (MIC>64mg/ml).<sup>16</sup> The 2-MPA was used as metal chelating agent because EDTA presents strong inhibitory effect on bacterial growth, which can make the interpretation hard and generate unreliable results.<sup>12,17</sup>

In this study, most the nosocomial MBL positive *P. aeruginosa* isolates showed the production of SPM-1 MBL as the main mechanism for carbapenem resistance. Moreover, these isolates also demonstrated co-resistance to many other anti-pseudomonas drugs, which was mostly observed for the more recently isolates. Excluding polymixin B, aztreonam was the agent which displayed the highest *in vitro* activity against the isolates and this profile is compatible with the MBL production, since aztreonam is stable against this carbapenemase.<sup>18</sup> However, the rate of resistance to different classes of antibiotics was higher than previously reported.<sup>2,6</sup> We observed a higher prevalence of MBL phenotype among the isolates of 2002/2003 (98,4%) than those found in other Brazilian cities.<sup>17,19</sup> This result correlated to the higher incidence of *bla*<sub>SPM-1</sub> than those found in previous studies on the national scene.<sup>20,5,21</sup> However, the isolates of 2008/2009 showed a small change in their susceptibility profile, despite the reduced frequency of MBL positives isolates. Possibly, other mechanisms of resistance to carbapenems are being currently disseminated in the hospital of study.<sup>22,23</sup> This

hypothesis is supported by the detection of MBL-positive *bla*<sub>SPM-1</sub>-negative isolates. The accumulation of different resistance determinants may impose limitations on the therapeutic choices available for treatment of such infections.<sup>10</sup>

Molecular typing indicated the prevalence of a major clone highly disseminated in 2002/2003 and the identification of other related genotypes later on. It indicates a slightly greater genotypic variation between the more recently isolates. This finding could in part explain the lower incidence of MBL positive samples, despite the carbapenem resistance, since new clones could be responsible for dissemination of other resistance mechanisms to carbapenems. The existence of common PFGE types among carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates from distinct geographic locations has been reported and is troublesome.<sup>6,23</sup> In Brazil it was previously reported the spread of a unique SPM-type MBL positive clone.<sup>10</sup> Clonal dissemination is explained by the transfer of infected patients and/or sharing of common healthcare staff. However, for a better understanding of epidemic clones in the dissemination of carbapenem resistance among *P. aeruginosa* isolates in Brazilian hospitals it is important to evaluate a large number of strains.<sup>10</sup>

## 6.6 Acknowledgments

The authors thank to Dr. Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta and Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Universidade Federal de São Paulo) who kindly provided the isolate used as IMP-1 positive control in this study. This work was supported by the Brazilian Funding Agencies CNPq, CAPES and FACEPE.

## 6.7 References

1. Szilágyi E, Böröcz K, Gastmeier P, Kurcz A, Horváth-Puhó E. The national nosocomial surveillance network in Hungary: results of two years of surgical site infection surveillance. *J Hosp Infec* 2009;**1**:74-80.
2. Romão CMCPA, Faria YN, Pereira LR, Asensi MD. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;**5**:541-548.
3. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbio* 2009;**58**:1133–1148.
4. Hurst M, Lamb HM. Meropenem: a review of its use in patients in intensive care. *Drugs* 2000;**3**:653-680.
5. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Int J Antimicrob Agents* 2004;**25**:57-61.
6. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005;**56**:1148–1151.
7. Maltezou HC. Metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents* 2008;**5**:405.e1-405.e7.
8. Young DJ, Bell M, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;abstr. C1-593, p. 75. Abstr. 47th Intersci. Cof. American Society for Microbiology, Washington, DC.

9. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T *et al.* KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;**11**:4194-4197.
10. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;**52**:699-702.
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *15th Informational Supplement* 2005;M100-S15, Wayne, PA, USA.
12. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K *et al.* Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:40–43.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial Strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:2233-2239.
14. Vieira VV, Fonseca EL, Vicente ACP. Metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Clin Microbiol Infec* 2005;**11**:937-938.
15. Masuda N, & Ohya S. Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1992;**36**:1847-1851.
16. Senda KY, Arakawa S, Ichiyama K. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *J Clin Microbiol* 1996;**34**:2909–2913.

17. Santos-Filho L, Santos I, Assis AML, Xavier D. Determinação da produção de metalo- $\beta$ -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J Bras Patol Med Lab* 2002;**4**:291-296.
18. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordman P. Metallo- $\beta$ -lactamases; the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;**18**:306-325.
19. Pellegrino FLPC. *et al.* Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:2420-2424.
20. Gräf T, Fuentefria DB, Corção G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>SPM-1</sub> em amostras clínicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;**3**:306-308.
21. Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL. Occurrence of *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> genes of metalo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol* 2007;**38**:108-109.
22. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- $\beta$ -lactamases in Hospital from Southern Brazil. *Infec* 2007;**35**:457-460.
23. Cezário RC, Morais LD, Ferreira JC, Costa-Pinto RM, Darini ALC, Gontijo-Filho PP. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;**27**:269-274.

## 7. CONCLUSÕES

- Isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos têm sido causa de infecção hospitalar no hospital estudado, os quais possuem caráter de multirresistência a vários antimicrobianos.
- O alto índice de produção de MBLs entre os isolados estudados indica que medidas de controle devem ser tomadas em relação ao uso indiscriminado dos antibióticos, particularmente dos carbapenêmicos.
- O teste fenotípico de disco-difusão usando o ácido 2-mercaptopropiônico revelou-se uma técnica eficiente e de baixo custo, podendo ser utilizada na rotina de laboratórios clínicos para detecção presuntiva de cepas MBL positivas.
- A presença do *bla*<sub>SPM-1</sub> entre os isolados de nosso hospital reflete a realidade brasileira, onde este gene se encontra disseminado e é o principal responsável pelo fenótipo MBL positivo em praticamente todas as regiões do país até o momento.
- A resistência associada ao aztreonam por parte considerável dos isolados MBL positivos fornece a indicação de que há outros mecanismos de resistência presentes que agravam a infecção na medida em que limitam seriamente a terapêutica antimicrobiana.
- Os resultados mostram que o perfil clonal dos isolados produtores de MBL no HUOC é bastante semelhante, o que reforça a hipótese do clone brasileiro estar presente.

## **8. ANEXO**

NORMAS DA REVISTA

## Journal of Hospital Infection

### Instructions for Authors

Contributions should be submitted online at <http://jhi.edmgr.com>

Manuscripts must be accompanied by a letter signed by the corresponding authors indicating that all named authors have seen and agreed to the submitted version of the paper; that all who are included in the acknowledgements section, or as providers of personal communications, have agreed to those inclusions; and that the material is original, unpublished and has not been submitted elsewhere. Any previous or pending publication of the material in conference proceedings, letters to journals and brief communications etc. must be declared. All Authors must declare whether there are any potential conflicts of interest and any sources of funding.

A fax number and e-mail address must be provided to aid rapid processing of manuscripts.

Authors should retain a copy of all material as the editors cannot accept responsibility for loss.

The Journal will consider for publication Original Articles in English on all aspects of hospital infection as well as Leading Articles and longer Review Articles on subjects of current interest. The journal would not usually publish papers over 8 pages in the journal. This equates to approximately 4000 words in total, which includes summary, text, acknowledgements and references. Each figures and/or tables present will reduce the word count permitted by 200 words.

Suitable review articles will be required to provide a few questions and answers for Continuing Professional Development (CPD).

The correspondence section will include letters discussing topics raised by papers already published either in the Journal of Hospital Infection or elsewhere, or on other matters of interest. Brief accounts of new observations may also be presented as letters. The journal will endeavour to achieve rapid publication of correspondence if these contain new observations. Letters should contain up to 800 words, no more than one table or figure and up to 8 references.

Case reports are not normally published unless they illustrate some exceptional point in the field of infection control. When published, case reports usually appear as a letter to the Editor.

A list of language and copyediting services to authors who need assistance **before** they submit their article for peer review or **before** it is accepted for publication can be found at: <http://authors.elsevier.com/LanguageEditing.html>

## Arrangement and format of original articles

These would normally comprise the following sections in the order given:

*Title Page.* This should show the title, names of all authors (but not their degrees) and the name of the institution or department where the work was done, as well as the name and address of the author to whom the proofs and correspondence should be sent. A running title not exceeding 40 characters and spaces should be provided on the title page.

*Summary.* This should explain briefly what was done, what was observed and what was 'concluded'. Do not include subheadings within the summary. Summaries should not exceed 250 words.

*Introduction.* A brief statement outlining the purpose and context of the paper, but leaving discussion for the Discussion section.

*Methods.*

*Results.* A statement of results, without discussion of their significance or relationship to those of others. Information may be conveyed in text or in figures or tables but not in both.

*Discussion.*

*Acknowledgements.* Authors should acknowledge help received in carrying out the work reported, e.g. supply of bacterial strains, permission to study patients, phage or biotyping of strains, according to accepted custom. When the work included in a paper has been supported by a grant from any source this must be indicated.

*References.* References should comply with the 'Vancouver' style. For a full explanation of this see the *Br Med J* 1988; **286**: 401–405.

In the text, references must be consecutively numbered in the order in which they are first mentioned, and must be **identified by superscript arabic numerals, after punctuation**, e.g. 'it has been reported<sup>3</sup> ...', or '... as noted by Smith.<sup>4</sup>' The quoted references should be listed in numerical (not alphabetical) order at the end of the article. References cited in tables or in figure

legends should be numbered sequentially according to the first mention in the text of the particular table or illustration.

Lists of authors should be given for up to six authors; list the first three for seven or more and add *et al.* Authors are responsible for the accuracy of references and for ensuring that references given in the text comply with those in the list of references. Journal book and chapter references should be set out as below:

### **Journals**

1. Fallon RJ. Nosocomial infections with *Legionella pneumophila*. *J Hosp Infect* 1980; **1**: 299–305.

### **Books and chapters**

1. Washington JA, Barry AL. Dilution test procedures. In: Lennette EH, Spaulding EH, Tenet JC, Tenet JC, Eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology 1979; 410–417.

Titles of journals should be abbreviated in accordance with *Index Medicus* (see list printed annually in the January issue of *Index Medicus*). Whenever possible, please include the digital object identifier (DOI), if noted, from the article's title page. Please note the following examples:

1. Russell AD, McDonnell G. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *J Hosp Infect* 2000; **44**: 1–3. doi:10.1053/jhin.1999.0654.
2. Jacobsson B-M, Hijelte L, Nystyröm B. Low level of bacterial contamination of mist tents used in home treatment of cystic fibrosis patients. *J Hosp Infect* 2000. doi:10.1053/jhin.1999.0658.

www addresses must **not** be used as references.

**Papers that are submitted with references or other features that do not comply with these instructions will be returned to their authors and may not be considered for publication until they have been resubmitted.**

Method, results and discussion should be restricted to the section so named, except that preliminary results may be included in the Methods section if necessary.

Headings and subheadings may be used in the text. Footnotes should be avoided.

All pages of the manuscript should be numbered consecutively in the order: title page, text, references, tables, figures, legends.

**Keywords.** Authors should provide Keywords from their summary; listing them immediately after the summary.

**Tables.** Tables should be numbered in Roman numerals (e.g. Table III). Each table should be on a separate sheet and should include a title which makes the meaning clear without reference to the text. Use '-' for 'no observation', or 'not measured'.

**Figures.** Illustrations should be in finished form suitable for reproduction, as large or larger than the final size on the page. Photographs should have strong contrast and be trimmed to exclude unnecessary background. Figures should be planned to fit the proportions of the Journal pages, and details should be easily discriminated at the final size. Colour photographs will be considered only if essential.

All illustrations are to be numbered with arabic numerals as Figures 1, 2, 3 etc. without abbreviation, in the order of their first mention in the text.

A short explicit legend must be provided for each figure. All such legends should be listed together in the final section of the manuscript.

**Bacterial nomenclature.** Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and written in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; **30**: 225–420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; **30**: 547–556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case roman not underlined, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'acinetobacter infection'. If the genus is specifically referred to, use italics, e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case roman e.g. 'meningococcus'.

**Numbers, measurements and statistics.** Numbers one to nine are written unless they are measurements (e.g. 5 mL). Numbers greater than nine are spelled out if they begin a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher, e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 mL/h rather than -1 or per. When referring to microbial concentrations use expressions such as ' $10^x$ ', not ' $x \log_{10}$ '. When referring to changes in microbial concentration, use expressions such as 'reduced by a factor of  $10^x$ ', not 'reduced by  $x \log_{10}$ '; 'a  $\log_{10}$  reduction factor of  $x$ ' may also be used.

**Abbreviations.** Use capitals for: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Group A, B etc. for antigenic or other groups, HPA, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, *P* (probability). Use sp. and spp. (species, singular and plural). Use Gram's stain and Gram-negative bacillus.

**Date format.** Use European Date format.

**Spelling.** Use British spellings: *Haemophilus*, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes).

**Drugs.** These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary

#### **Additional points to note**

- Use two carriage returns to end headings and paragraphs.
- Type text without end of line hyphenation, except for compound words.
- Do not use the lower case letter 'l' (el) for '1' (one) or 'O' for '0'. (They have different typesetting values.)
- Be consistent with punctuation and only insert a single space between words and after punctuation.
- Please include a list of any special characters you have had to use, e.g. Greek, maths.

The Editor retains the customary right to make changes in style and language without consultation.

## **Copyright Information**

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that, if it is accepted for publication, exclusive copyright of the paper shall be assigned to The Hospital Infection Society.

## **Permissions Information**

Any material which has been published elsewhere and is contained in a contribution to the Journal must be accompanied by a statement giving permission to reproduce the material signed by the author(s) and publishers concerned. When submitting material related to commercial products it may, in some circumstances, be appropriate for the author to forward a copy of the contribution to the manufacturers before publication.

## **Proofs**

Page proofs will be submitted to the first named or corresponding author. Major alterations will be charged to the author.

## **Offprints**

Offprints of each paper can be ordered at proof stage when a scale of costs will be supplied.

## **Contact Details:**

Journal of Hospital Infection

162 King's Cross Road

London

WC1X 9DH

Tel: 0207 713 0273

Fax: 0207 713 0255

Email: [jhi@his.org.uk](mailto:jhi@his.org.uk)