

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**INFLUÊNCIA DA PRODUÇÃO DE METALO- β -LACTAMASE NA
MORTALIDADE DE PACIENTES COM INFECÇÕES
NOSOCOMIAIS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

ALEXANDRE PREHN ZAVASCKI

Orientador: Luciano Zubaran Goldani

Co-orientador: Afonso Luís Barth

Tese de Doutorado

2005

DEDICATÓRIA

Aos anônimos que trabalham, de alguma forma, para melhorar o mundo à sua volta.

AGRADECIMENTOS

Há várias pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a construção deste trabalho e que eu gostaria de agradecer. Primeiramente, quero manifestar minha imensa gratidão ao meu orientador, Professor Luciano Goldani. Desde meus primeiros passos no início do mestrado foi sempre um incentivador do meu trabalho. Foi através da convivência, mesmo distante às vezes, dos diálogos que tive com ele, que meu interesse pela pesquisa foi sendo despertado e, seguramente, posso afirmar que uma nova visão do processo de criação e interpretação do conhecimento científico foi sendo construída. Colaborativo, buscou sempre a resolução de problemas que fizeram parte dessa caminhada. Além disso, nosso convívio me permitiu conhecer uma pessoa séria, que segue preceitos éticos de grande valor na sua conduta profissional, o que sem dúvida nenhuma, foi importante para minha formação. Minha gratidão e admiração.

Da mesma forma, tive na figura do Professor Afonso Barth, meu co-orientador, outro grande incentivador. Extremamente proveitosas para este trabalho, assim como para meu amadurecimento como pesquisador, foram nossas discussões, sempre marcadas por palavras de incentivo. Sempre solícito e colaborativo para a resolução de diversos problemas que apareceram na trajetória, foi seguramente uma pessoa decisiva para a conclusão deste trabalho. Manifesto minha imensa gratidão e admiração por sua pessoa.

Todo este trabalho foi somente possível pela colaboração de um grupo de pessoas que foi se formando ao longo da trajetória de cada um na pós-graduação. Sou extremamente grato à colega Ana Lúcia Gonçalves, pois seu desprendimento na colaboração para este trabalho foi admirável. Foi sempre uma colaboradora que “correu na frente”, e sei que o presente trabalho dependeu muito do seu esforço pessoal e competência. Também manifesto minha gratidão à colega Andreza Martins, que também empregou seu esforço e tempo neste trabalho. Ao colega Patrick Gaspareto, devo também meus agradecimentos por sua valiosa contribuição. Também foram muito importantes, as estudantes de medicina e futuras infectologistas, Ana Lúcia Moro e Juliana Fernandez. Trabalharam com desprendimento, seriedade e competência, e por isso manifesto minha gratidão às futuras

colegas. Igualmente, cada um ao seu modo, mas também com grande importância, colaboraram o Dr. Fabiano Ramos e a bioquímica Cláudia Leite. Sou agradecido aos mesmos por suas colaborações espontâneas e competentes. Todos os citados nesse parágrafo trabalharam diretamente no desenvolvimento da pesquisa, nos laboratórios ou nos prontuários.

Agradeço ao meu irmão Francisco Prehn Zavascki por sua imprescindível ajuda com *hardwares* e *softwares*, o que foi fundamental para que este trabalho pudesse ter seu andamento como planejado. Estou de forma geral em débito com todos os profissionais do Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS, e do Laboratório de Microbiologia do HCPA, em especial, agradeço a Larissa Lutz, Denise Pires Machado e Rodrigo Pires dos Santos por suas importantes colaborações. Minha gratidão aos funcionários do Laboratório de Pesquisa do HCPA, em especial à secretária Fabiana Silva da Silva, e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, em especial à Letícia Konrath. Agradeço à Professora Ana Luiza Maia do Serviço de Endocrinologia do HCPA pela gentileza de sua colaboração com o empréstimo de material para que o trabalho pudesse seguir conforme planejado.

Agradeço profundamente ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas por ter me fornecido desde o início do mestrado todo o suporte necessário para meus trabalhos, assim como para meu aprimoramento como pesquisador. Sempre tive a certeza de que estava em um Programa de Pós-graduação sério, com objetivos claros, e coordenado por pessoas extremamente envolvidas no cumprimento dos mesmos. Gostaria de citar e manifestar minha gratidão a pelo menos três professoras que marcaram minha formação. Agradeço à Professora Tânia Furlanetto pelo incentivo e conhecimento compartilhado na disciplina de Seminários Integrados de Pesquisa I, à Professora Maria Lúcia Scroferneker pelas sinceras palavras de incentivo que sempre vieram desde que nos conhecemos na disciplina de Tópicos em Imunologia no mestrado, e, à Professora Sandra Fuchs por ter sempre fornecido grande apoio em minha trajetória pela pós-graduação, por ser também uma incentivadora do meu trabalho, e pelo conhecimento compartilhado na Disciplina de Seminários Integrados de Pesquisa II.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Ministério da Educação, assim como a Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE do HCPA, pelo suporte financeiro para este trabalho.

Agradeço ao Professor Eliseu Waldman da Escola de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, por ter orientado meus primeiros passos na pós-graduação e ter sido sempre um incentivador do meu trabalho. Agradeço aos colegas do Serviço de Infectologia do HSL-PUCRS e do Controle de Infecção do HSL-PUCRS por todo o apoio fornecido durante a jornada. Agradeço à Professora Ana Sandri, à Professora Cândida Neves, às enfermeiras Micheline Dalarosa, Luciana de Alcântara, Geórgia Silva, à farmacêutica Laura Elias e, em especial, ao Professor Gabriel Narvaez, pelo posicionamento claro e pelo apoio nos obstáculos ocorridos durante o percurso.

Enfim, agradeço a todos os meus familiares. Em especial a meu pai e a minha mãe, sempre incentivadores incondicionais, meus irmãos pelo carinho e apoio, e ao meu cunhado e cunhada. Agradeço à minha sobrinha Alice, que deu novo impulso às nossas vidas. E agradeço muito à minha esposa, Andrea, pelo apoio e carinho, e por sua compreensão pelas horas que não pudemos estar juntos. Meu agradecimento àqueles que sempre me ensinaram a acreditar. Isso foi fundamental.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1 REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.1.1 Microbiologia	12
1.1.1.1 <i>Tipagem bacteriana</i>	14
1.1.2 Patogenia	16
1.1.3 Epidemiologia	20
1.1.3.1 <i>Distribuição no ambiente</i>	20
1.1.3.2 <i>Infecções: distribuição e frequência</i>	22
1.1.3.3 <i>Morbi-mortalidade</i>	23
1.1.4 Resistência antimicrobiana	25
1.1.4.1 <i>Resistência intrínseca</i>	25
1.1.4.2 <i>Resistência adquirida</i>	27
1.1.4.1 <i>Impacto clínico e em saúde pública</i>	27
1.1.4.2 <i>Epidemiologia</i>	28
1.1.4.3 <i>Mecanismos de resistência</i>	32
1.1.4.3.1 <i>Mecanismos de resistência aos β-lactâmicos</i>	32
1.1.4.3.2 <i>Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos</i>	34
1.1.4.3.1 <i>Mecanismos de resistência às fluorquinolonas</i>	34
1.1.4.3.1 <i>Mecanismos de resistência às polimixinas</i>	35
1.1.4.4 <i>Fatores de risco para resistência</i>	35
1.2 As β-lactamases	38
1.2.1 Aspectos gerais	38
1.2.2 Classificação	39
1.2.3 β -lactamases e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
1.2.4 Carbapenemases	45
1.2.4.1 <i>Carbapenemases classe A (grupo 2f)</i>	46
1.2.4.2 <i>Carbapenemases classe D (grupo 2d)</i>	48

1.2.5 Metalo- β -lactamases	49
1.2.5.1 <i>Histórico</i>	49
1.2.5.2 <i>Metalo-β-lactamases de importância clínica</i>	51
1.2.5.3 <i>Aspectos moleculares e bioquímicos</i>	57
1.2.5.4 <i>Detecção fenotípica</i>	61
1.2.5.5 <i>Detecção genotípica</i>	64
1.2.5.6 <i>Epidemiologia das metalo-β-lactamases</i>	64
1.2.5.7 <i>Desfechos clínicos</i>	71
2 JUSTIFICATIVA	78
3 OBJETIVO GERAL	79
3.1 Objetivos Específicos	79
4 REFERÊNCIAS	80
5 PRIMEIRO ARTIGO	103
5.1 Versão em inglês	103
5.2 Versão em português	132
6 SEGUNDO ARTIGO	162
6.1 Versão em inglês	162
6.2 Versão em português	184
7 ANEXOS	206
7.1 Questionários de Pesquisa	206
7.2 Escore de comorbidade de Charlson	209

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resistência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos principais antibióticos no Brasil, na América Latina, na Europa e nos Estados Unidos (EUA).	30
Figura 2. Árvore filogenética das metalo- β -lactamases de importância clínica.	56
Figura 3. Teste fenotípico para detecção de metalo- β -lactamase com ácido 2-mercaptopropiônico.	62
Figura 4. Teste fenotípico para detecção de metalo- β -lactamase por E-teste.	63
Figura 5. Macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsátil de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> do Hospital São Lucas – PUCRS, Porto Alegre, Brasil.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação funcional e molecular das β -lactamases.	42
Tabela 2. Primeiras descrições dos diferentes tipos de metalo- β -lactamases.	52
Tabela 3. Taxa de hidrólise relativa de diferentes metalo- β -lactamases.	59
Tabela 4. Perfil de hidrólise de 4 tipos de metalo- β -lactamases de importância clínica.	60
Tabela 5. Metalo- β -lactamases e bactérias produtoras descritas na América Latina.	67

INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares em todo o mundo. Este bacilo Gram-negativo é singularmente problemático devido a uma combinação de resistência intrínseca a várias classes de drogas, a sua extrema habilidade para adquirir resistência a todos os tratamentos antimicrobianos disponíveis, e ao seu freqüente envolvimento em infecções graves, que estão usualmente associadas a elevados índices de mortalidade a despeito de terapia apropriada [1].

Nos últimos 15 anos, sobretudo na última década, as metalo- β -lactamases têm emergido como um dos mais temidos mecanismos de resistência por sua capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, e porque os genes codificadores dessas enzimas são carregados em elementos altamente móveis, facilitando amplamente sua disseminação intra e interespecies [2, 3]. Essas novas enzimas diferem da maioria das β -lactamases por possuírem o íon zinco no sítio-ativo da molécula [2].

Inicialmente limitadas ao Sudeste Asiático, as metalo- β -lactamases rapidamente se disseminaram pela Europa, seguido pela América Latina, especialmente após o ano 2000. Recentemente, bactérias produtoras de metalo- β -lactamases foram identificadas na América do Norte e na Oceania [2, 4], enquanto a prevalência de MBL entre patógenos Gram-negativos aumenta progressivamente em muitos países dos outros continentes, particularmente na América Latina, dando ao problema uma dimensão mundial [5]. A disseminação deste mecanismo de resistência, notadamente em isolados de *P. aeruginosa*, limita gravemente as opções terapêuticas para infecções causadas por essas bactérias [2, 3]. Uma vez que a *P. aeruginosa* possui múltiplos mecanismos de resistência, inativando drogas potencialmente efetivas no tratamento de bactérias produtoras de metalo- β -

lactamases, a emergência desse mecanismo de resistência compromete drasticamente a capacidade de tratar infecções nosocomiais por esse organismo, nos deixando realmente próximos da chamada “era pós-antibiótica” [1, 3, 6, 7].

As propriedades bioquímicas e moleculares das metalo- β -lactamases têm sido extensamente investigadas. Entretanto, as características clínicas dessas infecções, seus desfechos, assim como o tratamento ótimo para elas, permanecem desconhecidos [2]. Embora existam dois estudos que compararam a mortalidade de pacientes com infecções por *P. aeruginosa* produtoras e não-produtoras de metalo- β -lactamases, nenhum deles foi desenhado, ou analisado, de forma que houvesse controle para diversas variáveis potencialmente confundidoras, assim como não avaliaram a terapia antimicrobiana para o tratamento dessas infecções [8, 9].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da produção de metalo- β -lactamases na mortalidade de pacientes com infecções nosocomiais por *P. aeruginosa*, e identificar que fatores são mediadores desse efeito. Nessa pesquisa, também se buscou investigar fatores associados à mortalidade em pacientes com infecções por *P. aeruginosa* produtoras dessas enzimas e comparar as diferentes terapêuticas empregadas para o tratamento dessas infecções. Secundariamente, objetivamos identificar fatores de risco para infecções por *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Microbiologia

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo, aeróbico, não-formador de esporos, pertencente à família Pseudomonadaceae. Este bacilo apresenta-se sozinho, em pares ou em pequenas cadeias. É reto ou levemente encurvado e mede 1 a 5 μm de comprimento e 0,5 a 1 μm de largura, sendo móvel devido à presença de um ou mais flagelos polares. A *P. aeruginosa* é uma bactéria nutricionalmente versátil, não necessitando muitos fatores de crescimento orgânico. Cresce a temperaturas de 37°C a 42°C, mas não a 4°C. Como um aeróbio estrito, a *P. aeruginosa* tem um metabolismo oxidativo, com o oxigênio como o receptor final de elétrons, embora, sob condições anaeróbias, o nitrato pode substituir o oxigênio como receptor final de elétrons e permitir seu crescimento. A *P. aeruginosa* é capaz de oxidar vários carboidratos (incluindo hexoses, mas não dissacarídeos) com a produção de ácido sem gás. Ela também produz catalase e uma variedade de enzimas extracelulares, como lipases, esterases e proteases [10-12].

Além disso, a *P. aeruginosa* produz pigmentos fluorescentes e solúveis em água, como a piocianina, pioverdina, piorrubina e piomelanina. A piocianina é produzida por mais da metade dos isolados clínicos e é somente produzida pela *P. aeruginosa*. Apresenta-se azul ou verde em pH neutro ou alcalino, quando combinada com o pigmento pioverdina. A pioverdina é também encontrada em outras *Pseudomonas* fluorescentes [10-12]. Este

pigmento age como um sideróforo, permitindo a captura de ferro para crescimento em ambientes com limitação de ferro. Piorrubina e piomelanina são produzidas por menos de 2% dos isolados [12].

A identificação da *P. aeruginosa* pode ser relativamente simples, pois cresce prontamente em uma grande variedade de meios de cultura e são poucas as características necessárias para sua identificação. Ela cresce aerobicamente e não fermenta os carboidratos. No exame direto, não é facilmente distinguível de outros bacilos Gram-negativos não-fermentadores. O odor doce semelhante à uva proveniente de suas colônias em meios de culturas, decorrente da produção de trimetilamina, é característico da espécie, assim como a produção de piocianina. A morfologia das colônias pode variar consideravelmente, sendo seis diferentes variedades descritas, entretanto, a maioria dos isolados de espécimes clínicos apresentam colônias achatadas e difusas. Colônias mucóides são comuns em isolados do trato respiratório de pacientes com fibrose cística [10-12].

Baseado em algumas características bioquímicas a *P. aeruginosa* pode ser presuntivamente identificada por vários métodos automatizados. Eventualmente esses sistemas não conseguem diferenciar as espécies não-aeruginosa, o que pode necessitar de diferentes oxidações de açúcares, crescimento a 42°C e coloração de flagelos [10-12].

1.1.1.1 Tipagem bacteriana

O objetivo da tipagem bacteriana é identificar diferenças dentro de uma mesma espécie. Assim, podemos caracterizar cepas distintas ou clones dentro da mesma espécie. Como regra geral, quanto mais freqüente e diversa a ecologia de uma espécie bacteriana, maior a necessidade de uma classificação infra-espécie, isto é a tipagem [13]. Entre outras razões, o processo de tipagem é importante epidemiologicamente para o reconhecimento de surtos de infecção, a detecção de transmissão cruzada de patógenos, identificação de uma possível fonte de infecção e reconhecimento de cepas mais virulentas de determinado organismo [14]. Existem vários métodos para a identificação de cepas dentro da espécie, com maior ou menor poder discriminatório para essa diferenciação. Os métodos mais antigos de tipagem de *P. aeruginosa*, baseados em características fenotípicas da bactéria, são hoje menos utilizados devido ao seu menor poder discriminatório. Atualmente, os métodos moleculares de tipagem têm sido mais utilizados.

Entre os métodos fenotípicos, incluem-se a tipagem sorológica ou sorotipagem, tipagem de piocina, tipagem por bacteriófagos ou fagotipagem e biotipagem [13]. A sorotipagem baseia-se na heterogeneidade do componente lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, determinando diferentes tipos antigênicos-O [15]. Vários esquemas com diferentes números de tipos O foram descritos, sendo mais utilizado o *International Antigenic Typing Scheme*, que compreende 17 sorotipos O [13]. Um aumento do poder discriminatório da sorotipagem pode ser atingido através da tipagem de antígenos localizados no flagelo da *P. aeruginosa*, que podem ser usados na subdivisão de sorogrupos O [13]. Entretanto, tal classificação não foi amplamente adotada por dificuldades técnicas

na preparação dos soros anti-flagelares específicos [13]. Outros métodos menos utilizados são: a tipagem de piocina, que utiliza a propriedade de produção de piocinas pela *P. aeruginosa* para determinar diferentes tipos; a fagotipagem, que compara diferentes padrões de ação de vírus bacteriófagos sobre a *P. aeruginosa* de acordo com a presença de receptores para esse vírus na célula bacteriana; e a biotipagem, que procura classificar as *P. aeruginosa* em tipos distintos conforme a resposta a diferentes reações bioquímicas [13]. As limitações dos métodos fenotípicos de tipagem bacteriana, como tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório, levaram ao desenvolvimento de tipagem bacteriana baseados no genótipo bacteriano ou seqüência de DNA, que usualmente minimizam esses problemas [14].

Diversos métodos de tipagem molecular foram desenvolvidos, diferindo entre eles em vários aspectos como princípios do método, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de uso e custos. Está além do escopo deste trabalho detalhar especificamente cada aspecto desses métodos, contudo, as principais características do método de macrorestrição de DNA seguido de eletroforese em gel em campo pulsátil – *Pulse-field gel electrophoresis* (PFGE), considerado o “padrão-ouro” dos métodos de tipagem molecular [14], serão descritas a seguir.

O método de macrorestrição de DNA consiste na formação de fragmentos de DNA de alto peso molecular, variando de 10 a 800 kb, a partir da digestão através de uma enzima de restrição que corta o DNA em sítios infreqüentes. Estes fragmentos de DNA de alto peso molecular são então inseridos em gel agarose e submetidos à eletroforese em um aparelho em que a polaridade da corrente é modificada em intervalos pré-determinados. Este campo

pulsátil permite uma clara separação destes fragmentos de DNA (bandas). O padrão eletroforético de distribuição das bandas é visualizado após a coloração do gel com o corante fluorescente brometo de etídio. A análise do gel pode ser feita através de vários *softwares* comercialmente disponíveis ou através de visualização direta. Tenover e colaboradores [16] propuseram um sistema para padronização da interpretação do perfil de macrorestrição através da visualização direta. Neste esquema, isolados bacterianos com perfil de bandas idêntico são considerados a mesma cepa. Isolados bacterianos diferenciados por um único evento genético, refletido por uma diferença em uma a três bandas, são considerados relacionados (subtipos de um mesmo clone). Isolados com quatro a seis bandas diferentes, representando duas modificações genéticas independentes, são considerados possivelmente relacionados. Aqueles contendo diferenças em mais de seis bandas, representando três ou mais modificações genéticas, são considerados não-relacionados.

1.1.2 Patogenia

A *Pseudomonas aeruginosa* é caracterizada como um agente oportunista. Sua patogênese está intimamente relacionada à condição do hospedeiro. Normalmente, alguma quebra de barreira cutâneo-mucosa, como presença de cateter, tubo endotraqueal, queimadura, ou fatores contribuintes para diminuição da imunidade do hospedeiro, como neutropenia, drogas imunossupressoras, Aids, entre outras, estão presentes nas infecções por este germe [10].

Essa bactéria é capaz de produzir diversos fatores de virulência que permitem a ela colonizar e infectar qualquer tecido de mamíferos [17]. Dentre esses fatores, destacam-se as fímbrias, o flagelo, a camada de lipopolissacarídeos (LPS), algumas proteases, o sistema *quorum sensing*, a exotoxina A e as exoenzimas secretadas pelo sistema de secreção tipo III [17].

A patogênese do ponto de vista microbiológico está associada à capacidade invasiva e toxigênica dessa bactéria. Basicamente, o processo infeccioso da *P. aeruginosa* pode ser dividido em três fases: 1) adesão e colonização; 2) invasão local; e 3) disseminação e doença sistêmica. Nenhuma das fases se desenvolve sem que a anterior tenha ocorrido, embora o processo possa se limitar a qualquer uma delas [10].

No processo de adesão e colonização, as fímbrias presentes nessas bactérias possuem papel significativo. Essas fímbrias possuem moléculas ligantes (lecitinas ligadoras de maltose e lecitinas ligadoras de galactose) que se unem a receptores presentes nas células do hospedeiro (principalmente células cutâneo-mucosas). Normalmente, esses receptores estão em grande parte ocupados pela fibronectina, uma proteína que impede a adesão, sobretudo de bacilos Gram-negativos, a esses receptores. Essa proteína está diminuída em hospedeiros com determinadas doenças (neoplasias, infecções, entre outras doenças sistêmicas graves) o que favorece a adesão e colonização por essas bactérias. Um estudo experimental com infecções de queimaduras demonstrou uma significativa redução da virulência de cepas de *P. aeruginosa* deficientes de fímbrias, bem como de flagelos, caracterizados pela sua menor capacidade de permanecer nas feridas e de se disseminar [18].

Um exopolissacarídeo mucóide, produzido por algumas cepas de *P. aeruginosa*, quase que exclusivamente em pacientes com fibrose cística, também está relacionado à adesão dessas bactérias a membranas mucosas. Além de funcionar como uma adesina, o exopolissacarídeo também protege essas cepas da atividade mucociliar, da fagocitose e da atividade do complemento, bem como diminui a atividade dos antimicrobianos por dificultar sua penetração na bactéria.

Para a invasividade local contribuem enzimas e toxinas extracelulares. A elastase parece ser a principal enzima envolvida no processo patogênico. Tem sido demonstrado que a elastase é capaz de degradar diversas proteínas do hospedeiro [19]. Essa enzima diminui a atividade mucociliar, provoca dano ao epitélio respiratório, hemorragia intra-alveolar, degradação da laminina e elastina dos pequenos vasos, quebra do colágeno, de imunoglobulinas IgG, IgA, e de fatores do complemento, e inibe a quimiotaxia de monócitos [10, 20]. A elastase combinada com outra enzima, a protease alcalina, possui ação proteolítica sobre o interferon- γ e o fator de necrose tumoral α [10].

Além disso, a *P. aeruginosa* é capaz de produzir citotoxinas capazes de ocasionar dano à microvasculatura pulmonar, diminuição da atividade de polimorfonucleares e ativação de fatores inflamatórios como ácido aracdônico e lipoxigenase. Duas hemolisinas (fosfolipase C e ramnolipídio) também são produzidas por essa bactéria e contribuem para sua invasividade. A fosfolipase C caracteriza-se por sua ação citotóxica direta, aumento da síntese de ácido aracdônico e sua capacidade de degradação da fosfatidilcolina, um componente do surfactante, ocasionando microactelectasias nos alvéolos pulmonares. O ramnolipídio diminui a atividade mucociliar do trato respiratório. O flagelo, um órgão

responsável pela motilidade, também tem sido associado com a invasividade dessa bactéria [10-12].

Além desses fatores, a piocianina, produzida pela maioria das cepas, também possui atividade patogênica. Essa substância é capaz de provocar dano ao epitélio respiratório, além de possuir atividade pró-inflamatória e proporcionar a formação de radicais hidroxila [10]. Outros fatores de virulência como as exoenzimas S, T, U e Y, que são secretadas diretamente no citoplasma das células do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III, contribuem para a atividade patogênica dessa bactéria, causando dano à célula do hospedeiro [21]. A ausência desse sistema de secreção tipo III correlaciona-se com a condição não-patogênica de outras espécies [21].

O *quorum sensing* é um mecanismo regulador de diversos genes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Na *P. aeruginosa*, o *quorum sensing* além de regulação de genes importantes para o metabolismo e síntese de proteínas, também regula a produção de múltiplos fatores de virulência [22]. A presença de mutações que determinam a ausência de um ou mais componentes do sistema *quorum sensing* tem se relacionado com significativa redução da virulência dessa bactéria [22]. Além da regulação de fatores de virulência, o *quorum sensing* de *P. aeruginosa* também é capaz de alterar a atividade de células do hospedeiro, induzindo a produção por parte dessas de diversas substâncias pró-inflamatórias, como interleucina-8 e prostaglandinas, determinando, em última análise, maior dano tecidual [22].

Para a disseminação sistêmica da doença, acredita-se que contribuam os mesmos fatores que determinam a invasividade da *P. aeruginosa*. A elastase por sua capacidade de romper a integridade da membrana basal do hospedeiro contribui significativamente para a disseminação da doença, através da destruição de barreiras físicas do hospedeiro que normalmente iriam conter essa disseminação [17]. Além dos fatores já expostos, a camada lipopolissacarídea, conhecida endotoxina das bactérias Gram-negativas e a exotoxina A são reconhecidos fatores de virulência que contribuem para a disseminação da infecção [10].

1.1.3 Epidemiologia

1.1.3.1 Distribuição no ambiente

A *P. aeruginosa* é cosmopolita em sua distribuição, sendo isolada do solo, da água, de plantas, de animais e de humanos. As mínimas necessidades nutricionais, evidenciadas por sua capacidade de crescer em água destilada e sua tolerância a uma ampla variedade de condições físicas, incluindo temperatura, contribuem para o sucesso ecológico da *P. aeruginosa* e, em última análise, para seu papel como agente oportunista [10, 11, 23].

A *P. aeruginosa* apresenta predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo com essa característica, na água e, em humanos, é isolada de locais com maior umidade como períneo, axila e ouvido. A umidade é um fator crítico para a manutenção de reservatórios de *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar, sendo isolada de equipamentos

respiratórios, soluções de limpeza, medicamentos, desinfetantes, sabões, pias e vegetais [10, 11, 23].

A *P. aeruginosa* está algumas vezes presente como parte da microbiota normal de humanos. A prevalência de colonização em pessoas saudáveis é relativamente baixa. Taxas de colonização de sítios específicos são as seguintes: pele, 0 a 2%; mucosa nasal, 0 a 3,3%; faringe, 0 a 6,6%; e intestino, 2,6 a 24% [10]. Pacientes hospitalizados têm maior taxa de colonização destes sítios, que aumenta com o tempo de permanência no hospital e com o uso de antimicrobianos [23]. São mais propensos à colonização a pele de pacientes com queimaduras graves, o trato respiratório inferior de pacientes em ventilação mecânica, o trato gastrointestinal de pacientes em quimioterapia para doenças neoplásicas e, virtualmente, qualquer sítio em pacientes tratados com antimicrobianos [10].

Acreditava-se, há alguns anos atrás, que a transmissão de paciente para paciente através das mãos dos profissionais do hospital ou por outros fômites não seria um meio eficiente de disseminação da *P. aeruginosa* dentro do ambiente hospitalar. Nesse sentido, um estudo no início da década de 80 havia demonstrado que a infecção cruzada por *P. aeruginosa* era um evento raro [24]. Várias publicações posteriores, porém, demonstraram que a transmissão horizontal de cepas de *P. aeruginosa* pode ocorrer em determinadas instituições, regiões ou mesmo dentro de um país, exercendo um papel importante na disseminação dessa bactéria [25-29].

1.1.3.2 Infecções: distribuição e frequência

A *P. aeruginosa* é primariamente um patógeno nosocomial, embora esteja também associada a determinadas infecções adquiridas na comunidade. Entre elas, destacam-se as infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística, as endocardites e osteoartrites em usuários de drogas endovenosas, as osteomielites em crianças com ferimentos pérfuro-cortantes, as otites externas em nadadores, a otite externa maligna em pacientes diabéticos, as meningites pós-traumatismo craniano, a ceratite em usuários de lentes de contato de longa permanência ou as infecções oculares normalmente seguidas de trauma local, além de ser causa de pneumonias adquiridas na comunidade, sobretudo em pacientes com Aids [10].

Entretanto, a relevância clínica e epidemiológica da *P. aeruginosa* reside principalmente nas infecções hospitalares, sendo uma das mais importantes bactérias nessas infecções. O trato respiratório inferior é o sítio mais comum de infecção por esse agente. Os dados do *National Nosocomial Infection Surveillance – NNIS System* de 1990 a 1999 apontam-na como a segunda bactéria entre as mais freqüentemente associadas às pneumonias hospitalares nos EUA [30]. Dados mais recentes do Programa de Vigilância de Antimicrobianos SENTRY confirmam a *P. aeruginosa* como a segunda causa de pneumonias nosocomiais na América do Norte, respondendo por 20% dos isolados do trato respiratório, somente atrás do *Staphylococcus aureus*, responsável por 28% dos mesmos [31]. Além disso, a *P. aeruginosa* é o segundo agente mais isolado de pacientes com infecções em unidades de terapia intensiva (UTIs) da América do Norte (12,2%) e da Europa (12,5%), sendo a primeira (59,9%) e segunda bactéria (22,1%) mais freqüente em infecções do trato respiratório nesses pacientes, na América e Europa, respectivamente [32,

33]. Dados do SENTRY, na América Latina, demonstram uma frequência ainda maior da *P. aeruginosa* como patógeno nosocomial, sendo apontada como a principal causa de pneumonia em pacientes hospitalizados, respondendo por 25,7% dos isolados, e a terceira do total de infecções nosocomiais [34]. No Brasil, é atualmente a segunda causa mais comum de infecções hospitalares (atrás do *S. aureus*) e, também, o principal agente de pneumonias nestes pacientes (35,5% dos isolados do trato respiratório inferior) [34].

Além do trato respiratório, a *P. aeruginosa*, também está envolvida em infecções hospitalares do trato urinário, de corrente sanguínea e de sítio cirúrgico. Na América Latina, é o terceiro patógeno mais isolado em infecções urinárias nosocomiais e de sítio cirúrgico e o quinto em infecções de corrente sanguínea [34]. É a segunda bactéria mais isolada de infecções nosocomiais de pele e tecidos moles (10,8%) na América do Norte [35]. Em UTIs europeias é a causa mais comum de infecções de sítio cirúrgico, com 18,7% dos isolados, sendo mais comum que o *S. aureus* (17,8%) como causa dessas infecções [33].

Em levantamento anterior do SENTRY no Brasil, a *P. aeruginosa* era o segundo agente causador de infecções do trato urinário (12,6% dos casos), o segundo de infecções de sítio cirúrgico (10,5%) e o sexto (7,5%) de infecções de corrente sanguínea [36].

1.1.3.3 Morbi-mortalidade

Apesar de todos os avanços médicos dos últimos anos e da alta tecnologia no suporte de doentes críticos, as infecções por *P. aeruginosa* continuam associadas a elevados

índices de morbi-mortalidade [37], particularmente se associadas à pneumonia ou sepse grave [38]. Os índices de mortalidade de pacientes com bacteremias por *P. aeruginosa* relatados na literatura têm variado de 18 a 61% [39]. Em um estudo, a letalidade chegou a 70% em pacientes com pneumonias por *P. aeruginosa* associadas à bacteremia [40]. Em pacientes internados em UTI, a bacteremia por *P. aeruginosa* esteve associada a uma maior incidência de insuficiência respiratória aguda e instabilidade hemodinâmica, maior tempo de internação em UTI e maior tempo de ventilação mecânica [41].

Estudos mais recentes que avaliaram a mortalidade de pacientes com infecções de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* apresentam resultados semelhantes. Kang e colaboradores [42] avaliaram 190 casos de bacteremia por *P. aeruginosa* e encontraram uma mortalidade em 30 dias de 37,8%, sendo maior em isolados com resistência a pelo menos uma droga antipseudomonas em relação a isolados com sensibilidade a todas as drogas (44% versus 33,9%, respectivamente; $p=0,16$). Osmon e colaboradores [43] analisando 49 casos de bacteremia por *P. aeruginosa* encontraram uma mortalidade hospitalar de 30,6%, que foi significativamente superior à mortalidade de bacteremias por *S. aureus* sensíveis ou resistentes à oxacilina (16,2% e 13,5%; $p=0,036$ e $p=0,007$, respectivamente).

Outros dois recentes estudos destacaram a importância da adequação da terapia empírica no desfecho de infecções por *P. aeruginosa* [44, 45]. Apesar da mortalidade hospitalar em estudo conduzido por Miceck e colaboradores [44] ter sido relativamente baixa para bacteremia por *P. aeruginosa* (21%), ela foi significativamente superior em pacientes que não receberam terapia adequada até o momento em que o patógeno e sua

sensibilidade foram conhecidos (30,7%) comparativamente com aqueles que receberam terapia inicial adequada (17,8%; $p=0,01$). No estudo de Kang e outros [45] a mortalidade em 30 dias de pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* foi de 39%, sendo superior nos pacientes que não receberam terapia empírica apropriada, definida como administração de antibiótico com sensibilidade *in vitro* em até 24 horas da coleta do material, comparativamente aqueles que receberam (43,4% e 27,7%, respectivamente; $p=0,079$).

1.1.4 Resistência antimicrobiana

1.1.4.1 Resistência Intrínseca

A *P. aeruginosa* apresenta alta resistência intrínseca a vários antimicrobianos devido a uma combinação de baixa permeabilidade de sua membrana externa e a sistemas de bomba de efluxo (proteínas localizadas na membrana citoplasmática bacteriana) que promovem o efluxo do antibiótico do meio intracelular, através de bombeamento ativo dependente de energia [1, 46, 47].

A membrana externa (camada lipopolissacarídica) presente em bactérias Gram-negativas constitui uma barreira semipermeável à captação de antibióticos e substratos moleculares. A captação de moléculas hidrofílicas, como os β -lactâmicos, está limitada a pequenas porções da membrana externa, denominadas canais porínicos ou porinas (proteínas que regulam a passagem dessas moléculas para dentro da célula). Existe

evidência razoável de que a principal porina da *P. aeruginosa* seja a denominada OprF, e que ela seja responsável pela baixa permeabilidade da membrana externa à maioria dessas moléculas. Apesar de ser produzida em grande quantidade, essa porina representa uma rota ineficiente de captação dos antimicrobianos, devido à heterogeneidade na formação de seu canal e de sua arquitetura molecular precária. Outras porinas menos comuns (25 a 35%) da *P. aeruginosa* possivelmente contribuem para uma permeabilidade residual inespecífica da membrana externa nessas bactérias [46, 47]. A permeabilidade dessa bactéria a antibióticos policatiônicos, como os aminoglicosídeos e as polimixinas, não depende dos canais porínicos. A penetração através da membrana externa envolve a interação desses antimicrobianos com cátions divalentes de moléculas da membrana externa que formam sítios ligantes, que normalmente possuem a função de estabilização da membrana. Essas ligações promovem a ruptura da membrana externa e penetração do antibiótico [46].

Os sistemas de bombas de efluxo, principalmente MexAB-OprM, são produzidos em grande quantidade pelas *P. aeruginosa* e acredita-se serem eles os principais responsáveis pela resistência intrínseca desse bacilo [1, 47]. Trata-se de um conjunto de três proteínas (MexB, MexA e OprM, localizadas respectivamente na membrana citoplasmática, no espaço periplásmico e na membrana externa) responsáveis pelo efluxo de substâncias, entre elas um amplo número de antibióticos, do meio intracelular para o meio extracelular [1, 47].

Devido a esta resistência intrínseca, há um número limitado de agentes antimicrobianos com ação efetiva contra *P. aeruginosa*, incluindo-se neste grupo as penicilinas e cefalosporinas antipseudomonas (principalmente, piperacilina, ticarcilina,

ceftazidima e cefepima), monobactams (aztreonam), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), fluorquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino), e as polimixinas (polimixina B e colistina). Os aminoglicosídeos, embora sejam frequentemente usados em associação com outros antimicrobianos, não são recomendados como agentes terapêuticos isoladamente [48].

1.1.4.2 Resistência Adquirida

1.1.4.2.1 Impacto clínico e em saúde pública

A resistência aos antimicrobianos é um reconhecido problema clínico e de saúde pública [49]. Acredita-se que as infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos resultam em mortalidade aumentada, hospitalizações prolongadas e aumento dos custos hospitalares comparativamente a infecções causadas por germes sensíveis [50]. A razão para que isso ocorra é presumivelmente a maior chance de um tratamento ineficaz ou inadequado em pacientes infectados por bactérias resistentes. Vários estudos demonstraram que a resistência leva a um atraso na administração da terapia antimicrobiana adequada, o que está claramente associado a piores desfechos clínicos [49]. De outro modo, genes de resistência podem modificar a capacidade de sobrevivência dos patógenos, aumentando ou diminuindo sua virulência, podendo ocasionar, teoricamente, infecções mais graves em pacientes infectados com bactérias resistentes mais virulentas. Porém, a relação entre resistência e virulência difere dependendo do organismo, do tipo do antibiótico e do mecanismo de resistência e, até o momento, não existem estudos correlacionando aumento da virulência com mutações de resistência e desfechos clínicos

desfavoráveis [49]. Entretanto, a aquisição de resistência da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos parece estar associada a maior mortalidade e tempo de hospitalização [50], e as razões para que isso ocorra são, provavelmente, em maior ou menor grau, as acima explicitadas.

As estimativas do custo da resistência bacteriana têm sido muito diversas e, muitas vezes, conflitantes. Esta falta de reprodutibilidade deve-se, provavelmente, a problemas metodológicos dos estudos e aos métodos usados para identificar e medir os custos [51]. Assim, as estimativas de custos anuais da resistência, nos Estados Unidos, têm variado de US\$ 4 milhões [52] a 30 bilhões de dólares [53].

1.1.4.2.2 Epidemiologia

A resistência adquirida da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos com ação específica antipseudomonas é bem conhecida, e a resistência a múltiplas drogas tem sido relatada em vários estudos, tornando-se um problema crescente em todo o mundo [1, 27, 29, 34, 54-57]. Devido à ampla gama de mecanismos de resistência, à sua eficácia e à relativa facilidade com que a *P. aeruginosa* torna-se resistente aos antimicrobianos, combinado com sua alta prevalência, essa bactéria é um dos mais preocupantes patógenos no meio hospitalar.

A resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* é um problema ainda mais importante na América Latina e, principalmente, no Brasil, pois além de terem as taxas mais altas de resistência em relação a outras regiões do mundo, níveis crescentes têm sido observados [57]. A figura 1 demonstra as taxas de resistência aos principais antibióticos

com ação antipseudomonas, no Brasil, na América Latina, na Europa e na América do Norte, conforme os dados mais recentes do programa de vigilância SENTRY.

Em relação a isolados com resistência a todas as drogas, exceto polimixinas, observou-se na América Latina, que os mesmos correspondiam a 4,7% do total dos isolados de *P. aeruginosa* em 1997 e que, em 2001, correspondiam a 17,1% [57]. Mais preocupante ainda é o dado de que 90% desses isolados pan-resistentes eram provenientes do Brasil [57].

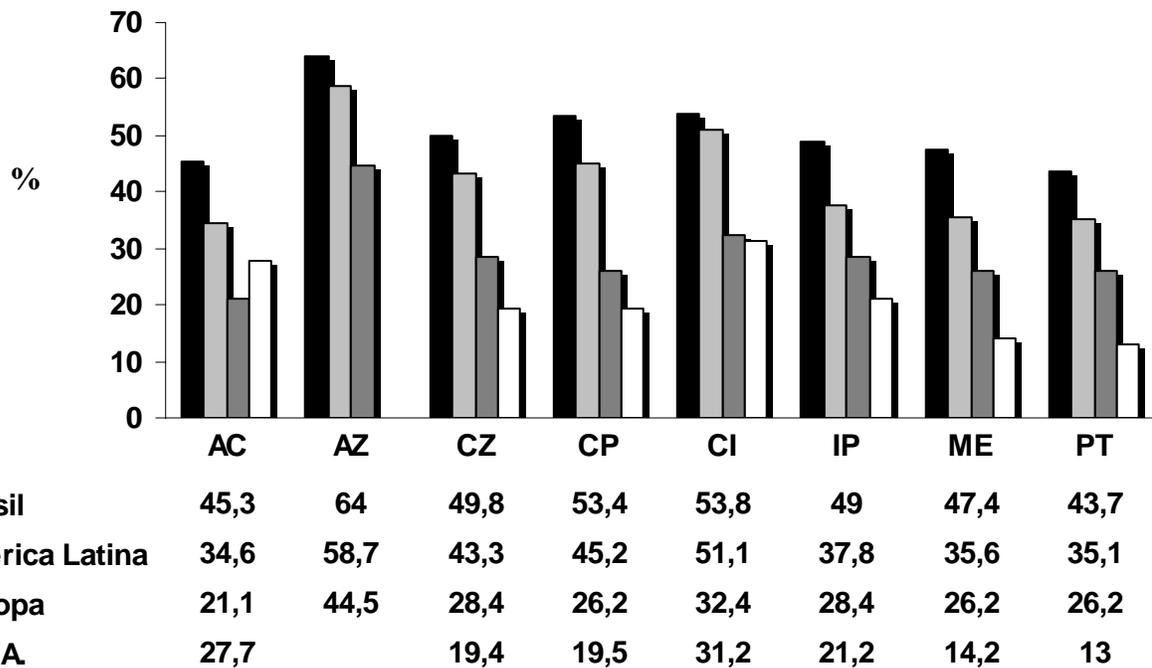


Figura 1. Resistência da *Pseudomonas aeruginosa* aos principais antibióticos no Brasil, na América Latina, na Europa e nos Estados Unidos (EUA). Dados em percentual. AC, amicacina; AZ, aztreonam, CZ, ceftazidima; CP, cefepima; CI, ciprofloxacino; IP, imipenem; ME, meropenem; PT, piperacilina-tazobactam. Os dados do Brasil e da América Latina são referentes ao ano 2001 [34], da Europa a 1999 [27] e dos EUA a 2003 [58]. Notar as taxas mais altas de resistência no Brasil, comparativamente à América Latina como um todo, que, por sua vez, apresenta índices de resistência mais elevados que a Europa e os EUA. Nesse último país são encontrados os menores índices de resistência à *P. aeruginosa*, e esses níveis não têm se alterado nos últimos anos [58]. Resistência ao AZ nos EUA não apresentada [58].

Em estudo realizado entre 2002 e 2003 no Hospital São Lucas, um hospital universitário de Porto Alegre, elevados índices de resistência a *P. aeruginosa* foram observados, em geral, superiores aos índices observados no Brasil pelo programa de vigilância SENTRY [59]. Assim, foram observadas taxas de resistência de 59,5% ao ciprofloxacino, 58,9% ao imipenem, 57,6% à amicacina, 50,0% ao meropenem, 48,7% à ceftazidima, 38,6% à piperacilina-tazobactam e 33,5% ao aztreonam. Além da alta resistência de um modo geral, chamava atenção a alta resistência aos carbapenêmicos, principalmente ao imipenem, e os índices mais baixos de resistência ao aztreonam, sugerindo a possibilidade da presença de metalo- β -lactamases como possível determinante desses achados, como veremos adiante. Nesse estudo, a prevalência de isolados resistentes a todas as drogas antipseudomonas, exceto polimixina B, foi de 10,1% [59].

As únicas drogas que permanecem com sensibilidade acima de 95% para *P. aeruginosa* são as polimixinas B e E (colistina). Entretanto, seu uso havia diminuído significativamente a partir do final da década de 1970, com o advento de drogas antipseudomonas menos tóxicas, e somente nos últimos anos essas drogas têm emergido como importante alternativa terapêutica para infecções causadas por *P. aeruginosa*, devido ao problema da multi ou pan-resistência [60, 61]. Contudo, é esperado que com seu uso mais difundido os índices de resistência também cresçam [6, 7, 62, 63]. Relatos de infecções por cepas com resistência às polimixinas foram previamente descritas em pacientes com fibrose cística [64] e, recentemente, em infecções nosocomiais [65]. No Brasil, a resistência a polimixina já foi relatada em *Acinetobacter baumannii* [66].

Uma importante limitação na avaliação da resistência às polimixinas é que não existe até o momento uma padronização definida para os testes rotineiramente aplicados na prática clínica, como o teste disco-difusão [67]. Sua avaliação fica limitada a testes com determinação de concentração inibitória mínima (CIM), como diluição em ágar, que habitualmente não são utilizados na rotina dos laboratórios da maioria dos hospitais, sendo mais utilizados em laboratórios de pesquisa.

1.1.4.3 Mecanismos de resistência

Muitos dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos da *P. aeruginosa* têm sido estudados e esclarecidos [1, 46, 47]. De um modo geral, a resistência da *P. aeruginosa* pode ser devida à hidrólise enzimática dos antimicrobianos pela produção de β -lactamases, ao efluxo desses agentes do meio intracelular por meio do aumento da expressão de sistemas de efluxo, à diminuição da permeabilidade de sua membrana externa, ou à combinação de um ou mais desses mecanismos. A seguir apresentamos sucintamente os principais mecanismos de resistência aos antibióticos com ação antipseudomonas. A resistência aos carbapenêmicos, sobretudo a mediado pela produção de metalo-enzimas será discutida com mais detalhes posteriormente.

1.1.4.3.1 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

As β -lactamases constituem o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em bacilos gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa* [68].

Devido à importância desse mecanismo de resistência, as β -lactamases serão discutidas com mais detalhes adiante.

Os antibióticos carbapenêmicos, entretanto, são estáveis à maioria das β -lactamases graças a uma cadeia hidroxietila ligada ao carbono 6 do anel β -lactâmico [69]. Deste modo, a resistência aos carbapenêmicos, como o imipenem, é conferida pela perda de uma porina específica da membrana externa, denominada OprD. A função primária dessa proteína (porina OprD) é o transporte passivo de aminoácidos básicos através da membrana externa, porém, ela forma poros que são permeáveis aos carbapenêmicos, mas não a outros β -lactâmicos. A perda dessa porina eleva as CIMs do imipenem de 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (típico nível de sensibilidade da *P. aeruginosa*) para 8 a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (níveis de resistência clínica). As CIMs de antibióticos não carbapenêmicos não são afetadas pela perda da OprD [47]. A associação da perda da OprD com a hiperexpressão do sistema de efluxo MexAB-OprM determina a resistência da *P. aeruginosa* ao meropenem [47].

Recentemente, uma nova classe de β -lactamases, as metalo- β -lactamases, tem emergido em todo o mundo como um importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos, em bacilos Gram-negativos, principalmente, em *P. aeruginosa* [5]. Esse relativamente novo mecanismo de resistência apresenta particularidades que lhe conferem significativa importância clínica e epidemiológica. As metalo- β -lactamases, assim como as β -lactamases de um modo geral, serão discutidas com maior ênfase adiante.

Além das β -lactamases, outro mecanismo importante que pode conferir resistência em *P. aeruginosa* são as bombas de efluxo. O principal sistema de efluxo é o denominado MexAB-OprM, que é expresso constitutivamente pela *P. aeruginosa*, podendo ser hiperexpresso na dependência de uma mutação. Outros sistemas de efluxo que têm como substratos antibióticos β -lactâmicos e fluorquinolonas podendo ser hiperexpressos por essa bactéria. São eles: MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM [1, 46, 47].

A modificação de sítios de ligação aos antibióticos como as *penicillin-binding-proteins* (PBPs) não é um mecanismo de resistência importante aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa*, embora tenha sido relatada resistência à piperacilina em pacientes com fibrose cística devido a esse mecanismo [48].

1.1.4.3.2 Mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos

A produção de enzimas modificadoras, diminuindo sua ligação com o ribossoma, e a diminuição da permeabilidade da membrana externa são os principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, embora sistemas de efluxo como o MexXY-OprM também estejam implicados [46, 47].

1.1.4.3.3 Mecanismos de resistência às fluorquinolonas

As quinolonas têm resistência determinada por sistemas de efluxo e mutações na subunidade A da enzima DNA-girase (topoisomerase II) ou na enzima topoisomerase IV, que impedem a ligação dessas drogas ao sítio-alvo dessa(s) enzima(s) [46, 47].

1.1.4.3.4 Mecanismos de resistência às polimixinas

Existem poucos dados referentes aos mecanismos de resistência às polimixinas, contudo, acredita-se que seja devida a dois mecanismos: modificação na composição dos lipídios da camada lipopolissacarídica e/ou substituição do cátion Mg^{+2} (um dos sítios de ligação das polimixinas na membrana externa) por uma proteína denominada OprH [64].

1.1.4.4 Fatores de Risco para Resistência

A probabilidade de sucesso no controle da resistência bacteriana é maior se as medidas adotadas para controle estiverem baseadas no conhecimento dos fatores de risco [70]. Assim, vários estudos procuraram identificar fatores de risco para a colonização ou para infecção por *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar. Apesar de diferentes desenhos nos estudos de caso-controle determinarem resultados com potenciais vieses [71, 72], todos os estudos realizados até o momento usando análise multivariada indicam que a exposição prévia a um antimicrobiano é o principal fator de risco para a colonização ou infecção por *P. aeruginosa* resistente ao mesmo. Assim, o imipenem foi encontrado como fator de risco para colonização ou infecção por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem [73-76], a ceftazidima para *P. aeruginosa* resistente a ceftazidima [77], assim como a piperacilina-tazobactam [78] e as fluorquinolonas [79, 80]. Além disso, a exposição a certos antibióticos foi associada em alguns estudos com a colonização ou infecção por *P. aeruginosa* multi-resistentes [81-84].

Outras variáveis encontradas como fatores de risco para *P. aeruginosa* resistentes são variáveis muitas vezes sobrepostas ao próprio risco para colonização ou infecção por *P. aeruginosa* independente do perfil de sensibilidade devido à metodologia empregada nesses estudos [72]. Dentre essas, incluem-se mais comumente, tempo de internação [74, 78], internação prévia [74, 75], transferência de outro hospital [78, 82], passagem por unidade de terapia intensiva [74, 78] e ventilação mecânica [75, 81].

A maior limitação de todos esses estudos é o fato de que nenhum deles avaliou o papel da transmissão horizontal de cepas resistentes como fator de risco para colonização ou infecção por *P. aeruginosa* resistentes. Outra limitação é que esses estudos avaliaram fatores de risco para resistência fenotípica a determinados antimicrobianos, mas nenhum desses avaliou fatores de risco para determinado mecanismo de resistência. Porém, pode-se supor que exposições a determinados antimicrobianos sejam fatores de risco para resistência a outros antimicrobianos, mesmo de classes não relacionadas, devido aos mecanismos de resistência de amplo espectro capazes de serem expressos pela *P. aeruginosa*.

Dois estudos avaliaram fatores de risco para a aquisição de *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase [8, 85]. Em relação à exposição prévia aos antibióticos, Hirakata e outros [8] encontraram uma frequência maior de exposição no grupo de pacientes com *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase em relação aos pacientes com não produtoras (27,6% versus 12,6%, respectivamente; $p=0,06$), sendo, o tempo de uso de antimicrobianos e a dose total utilizada no tratamento dos pacientes com isolados

produtores da enzima foi significativamente maior para várias classes de antibióticos, incluindo os carbapenêmicos [8].

No estudo conduzido por Nouér e co-autores [85], exposição a fluorquinolonas foi encontrada como fator de risco para a aquisição de *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase na análise multivariada (OR 14,70; IC 95% 1,70–127,34) [85].

Infelizmente, o estudo conduzido por Hirakata e colaboradores [8], no Japão, não apresentou uma análise multivariada dos dados para o controle de potenciais fatores de confusão, e o estudo conduzido no Rio de Janeiro, Brasil, somente um número muito pequeno de casos (n=14) foi avaliado, limitando muito o poder desse estudo de detectar pequenas diferenças de exposições [85].

1.2 As β -lactamases

1.2.1 Aspectos Gerais

As β -lactamases constituem o principal mecanismo de defesa das bactérias Gram-negativas aos antibióticos β -lactâmicos [68, 86]. As β -lactamases inativam os antibióticos β -lactâmicos ligando-se covalentemente à molécula carbonil do anel β -lactâmico e hidrolisando sua ligação amida [87]. O anel β -lactâmico hidrolisado é desprovido de ação anti-bacteriana. As β -lactamases podem ser primariamente divididas em enzimas com uma serina ou com o íon zinco no sítio-ativo [86]. As primeiras constituem a maioria das β -lactamases e são muito similares às proteínas ligadoras de penicilinas (ou do inglês, *penicillin-binding proteins*, PBPs), importantes enzimas responsáveis pela estruturação de componentes da parede celular bacteriana. Essas β -lactamases, provavelmente, exercem alguma função fisiológica ainda não descoberta no metabolismo da parede celular bacteriana [87].

As β -lactamases com zinco no sítio-ativo são por isso denominadas metalo- β -lactamases e, apesar de representarem um pequeno grupo de β -lactamases, têm crescido em prevalência e distribuição em todo o mundo nos últimos anos [5, 86, 87]. Ambas são enzimas antigas, porém com hereditariedades distintas [86]. O grupo da serina provavelmente originou-se das PBPs e estima-se, a partir de sua seqüência, que tenha evoluído com as bactérias nos últimos 2 bilhões de anos [88].

Desde que os β -lactâmicos começaram a ser usados na prática clínica, as β -lactamases evoluíram com eles [87]. Os eventos iniciais notados foram um aumento de sua prevalência em organismos que a produção dessa enzima era conhecida, mas incomum (como no *Staphylococcus aureus*), e uma disseminação para patógenos que não dispunham dessa enzima (como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*) [86].

1.2.2 Classificação

Devido a inúmeras características enzimáticas das β -lactamases, muitas tentativas de classificação dessas enzimas têm sido feitas desde o final dos anos 60 [89]. Estas classificações baseiam-se em duas abordagens: uma baseada em propriedades bioquímicas e funcionais da enzima e outra na estrutura molecular das mesmas [89].

A primeira classificação baseada em características funcionais das β -lactamases foi proposta em 1968 por Sawai e co-autores [90], que classificava essas enzimas em penicilinasas ou cefalosporinasas, conforme seu substrato preferencial. Em 1973, Richmond e Sykes [91] ampliaram o perfil de substratos, sugerindo uma divisão em 5 grupos. Três anos depois Sykes e Matthew [92] ampliaram essa última classificação, diferenciando as β -lactamases mediadas por plasmídeos. Em outro esquema, proposto em 1981 por Mitsuhashi e Inoue [93], a categoria “ β -lactamase hidrolisadora de cefuroxima” foi adicionada ao esquema de penicilinasas e cefalosporinasas. Em 1989, Bush [94] propôs uma nova classificação tentando correlacionar substratos preferenciais e capacidade de

inibição com estrutura molecular. Em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros [95] atualizaram essa classificação, sendo, hoje, a mais utilizada, juntamente com a classificação de Ambler [96].

A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros [95] divide as β -lactamases em quatro grandes grupos baseados em sua capacidade de serem inibidos por determinados inibidores de β -lactamases, bem como por seus substratos preferenciais. Assim, os quatro grupos são formados por: grupo 1, enzimas que têm as cefalosporinas como substrato preferencial (cefalosporinases) e não são inibidas pelo ácido clavulânico; grupo 2, enzimas que são inibidas pelo ácido clavulânico; grupo 3, metalo-enzimas que são fracamente inibidas pelos clássicos inibidores de β -lactamases, mas são inibidas pelo EDTA e *p*-cloromercuriobenzoato (*p*CMB); e o grupo 4, enzimas que têm as penicilinas como substrato preferencial (penicilinases) e não são inibidas pelo ácido clavulânico.

O grupo 2 ainda compreende algumas subdivisões conforme o(s) substrato(s) preferencial(ais) dessas enzimas. Assim, o grupo 2a compreende enzimas que são inibidas pelo ácido clavulânico e têm como substrato preferencial as penicilinas; o grupo 2b compreende enzimas de amplo espectro pela capacidade semelhante de hidrolisarem penicilinas e cefalosporinas; o grupo 2be, é composto por enzimas que hidrolisam em taxas semelhantes, penicilinas, cefalosporinas de pequeno e amplo espectro e monobactams, e são conhecidas como β -lactamases de espectro estendido (ESBL, *extended-spectrum β -lactamases*); o grupo 2br inclui penicilinases que são menos fortemente inibidas pelo ácido clavulânico; as penicilinases, conforme sua afinidade maior para carbenicilina ou cloxacilina também são divididas nos grupos 2c e 2d, respectivamente; o grupo 2e compreende cefalosporinases que são inibidas pelo ácido clavulânico; e o grupo 2f

compreende enzimas inibidas pelo ácido clavulânico que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos.

O grupo 3 que é composto por enzimas que não possuem um resíduo serina no seu sítio ativo, e sim um íon Zinco, e que não são inibidas pelo ácido clavulânico, mas o são pelo EDTA, também são subdivididas de acordo com seu substrato preferencial [97]. Assim, o grupo 3a é composto por metalo- β -lactamases com amplo espectro de hidrólise, incluindo carbapenêmicos, penicilinas e cefalosporinas; e o grupo 2b compreende enzimas que hidrolisam preferencialmente carbapenêmicos e possuem fraca atividade para penicilinas e cefalosporinas. Existe ainda o grupo 3c, que compreende uma única enzima produzida pela *Legionella gormanii* e que possui alta capacidade de hidrólise de cefalosporinas.

A classificação de Ambler é baseada na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos dessas enzimas. Atualmente, são conhecidas quatro classes (A, B, C e D). As classes A, C e D possuem a serina no sítio ativo. As metalo- β -lactamases pertencem ao grupo B [89, 96].

A tabela 1 resume as principais características da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros, correlaciona com a classificação molecular de Ambler, e apresenta alguns exemplos de enzimas representativas de cada grupo.

Tabela 1. Classificação funcional e molecular das β -lactamases.

Grupo de Bush-Jacoby-Medeiros	Classe Molecular	Substrato Preferencial	Inibidas por		Enzimas representativas
			AC	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de gram-negativos: ACC-1, ACT-1, CFE-1, família CMY, DHA-1, DHA-2, família FOX, família LAT, MIR-1, MOX-1 e MOX-2.
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinases de gram-positivos, como <i>Staphylococcus aureus</i> .
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de pequeno espectro	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas de pequeno e amplo espectro, monobactams	+	-	Família TEM, SHV, CTX-M. Menos comuns: BES-1, família GES e IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1 e VEB-2. Conhecidas como β -lactamases de espectro estendido (ESBLs, <i>extended-spectrum β-lactamases</i>)
2br	A	Penicilinas	+/-	-	Família TEM, TRC-1
2c	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3 e PSE-4

Tabela 1. Continuação.

Grupo de Bush-Jacoby-Medeiros	Classe Molecular	Substrato Preferencial	Inibidas por		Enzimas representativas
			AC	EDTA	
2d	D	Penicilinas, cloxacilina	+/-	-	Família OXA e PSE-2. Algumas tipo OXA são ESBLs. OXA-23 a 27, OXA-40 e OXA-48 também hidrolisam carbapenêmicos.
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinases induzíveis produzidas por <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos	+	-	NMC-A, IMI-1, SME-1, 2 e 3; KPC-1, 2 e 3; GES-2, 3 e 4.
3a	B	Todos β -lactâmicos, inclusive carbapenêmicos, exceto monobactams	-	+	Família IMP, família VIM, SPM-1 e GIM-1
3b	B	Carbapenêmicos	-	+	Enzimas de <i>Aeromonas spp.</i> , <i>F. odoratum</i> e <i>B. cepacia</i>
3c	B	Cefalosporinas	-	+	Enzima produzida por <i>Legionella gormanii</i>
4	ND	Penicilinas	-	?	Enzima produzida por <i>B. cepacia</i>

Abreviaturas: AC, Ácido Clavulânico. Adaptada de [86, 95, 97].

1.2.3 β -lactamases e *Pseudomonas aeruginosa*

Dentre as inúmeras β -lactamases, as *P. aeruginosa* são capazes de produzir várias delas e conferir resistência aos β -lactâmicos, conforme o perfil de substratos dessas enzimas. A resistência às penicilinas e às cefalosporinas antipseudomonas deve-se principalmente à produção de β -lactamases cromossômicas tipo 1 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros codificadas pelo gene estrutural designado AmpC [1, 95]. Esse grupo de enzimas possui a característica de serem induzíveis na presença de antibióticos β -lactâmicos, podendo a sua produção tornar-se parcial ou totalmente desreprimida na presença de uma ou mais mutações no gene regulador *ampD* [68]. Embora a produção de β -lactamases AmpC confira resistência às penicilinas e cefalosporinas, e essa enzima represente o principal mecanismo de resistência a essas drogas, o nível de resistência depende do grau de desrepressão, e as mutações que determinam essa desrepressão ocorrem com menor frequência na *P. aeruginosa* comparativamente a bactérias que classicamente produzem essa enzima com grande frequência, como o *Enterobacter spp.* [1].

Outras classes de β -lactamases também produzidas pela *P. aeruginosa* são de menor importância seja por sua menor prevalência, menor espectro de hidrólise ou por se limitar a determinadas áreas geográficas do globo. As β -lactamases PSE-1 e PSE-4 (grupo 2c) possuem espectro restrito às penicilinas, sobretudo a carbenicilina. As clássicas β -lactamases de espectro estendido das famílias TEM, SHV e CTM-X são raramente encontradas em *P. aeruginosa*, entretanto, outras enzimas de espectro estendido são caracteristicamente produzidas por essa bactéria, entre elas as enzimas PER-1 (tipo 2be) e

do tipo OXA (tipo 2d), que compreende uma série de enzimas originalmente derivadas de β -lactamases de menor espectro, como OXA-10 e OXA-2. Entretanto, as β -lactamases de espectro estendido, sobretudo, do tipo OXA são pouco comuns em *P. aeruginosa*, sendo relatadas em alguns países da Europa, principalmente na Turquia [1].

As metalo- β -lactamases constituem uma classe à parte e algumas delas têm emergido em todo o mundo como um importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos, principalmente, em *P. aeruginosa* [5]. Por possuírem ação contra os carbapenêmicos, serão discutidas abaixo, juntamente com enzimas de grupos distintos e, genericamente, denominadas carbapenemases.

1.2.4 Carbapenemases

As carbapenemases podem ser definidas como enzimas que hidrolisam significativamente pelo menos imipenem e/ou meropenem, antibióticos carbapenêmicos, a classe que possui o mais amplo espectro antibacteriano [97-100]. A maioria das carbapenemases possui pouca relevância clínica seja por serem raramente produzidas ou por serem produzidas por bactérias de reduzido potencial patogênico. Porém, na última década algumas carbapenemases têm adquirido significativa relevância por estarem emergindo em bactérias de reconhecida importância clínica e/ou por estarem se disseminando rapidamente entre elas.

Este grupo de enzimas com características fenotípicas semelhantes representam β -lactamases de grupos e classes moleculares heterogêneos. Atualmente, conhecem-se carbapenemases das classes moleculares A (grupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros), B (grupo 3) e D (grupo 2d). A maioria dessas enzimas confere resistência não só aos carbapenêmicos, mas também a outros β -lactâmicos, sendo que algumas delas hidrolisam penicilinas e cefalosporinas mais eficientemente que carbapenêmicos [97]. As carbapenemases da classe B, as metalo- β -lactamases, são atualmente as mais freqüentemente encontradas, principalmente em *P. aeruginosa*, e as de maior relevância clínica. Serão discutidas separadamente adiante.

1.2.4.1 Carbapenemases classe A (grupo 2f)

Algumas poucas carbapenemases da classe molecular A de Ambler são produzidas por raras enterobactérias [100]. Essas enzimas pertencem ao grupo 2f da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros. A NMC-A foi a primeira carbapenemase da classe A identificada, na França, em um *E. cloacae* [101]. NMC-A é codificada por cromossoma e, similarmente as enzimas AmpC, sua produção é induzível pela presença de β -lactâmicos [102]. Outra enzima a SME-1 foi identificada em 1982, na Inglaterra, em uma *S. marcescens*, antes da comercialização do uso de carbapenêmicos nesse país [103]. Possui uma regulação semelhante a NMC-A, embora seja menos induzível que essa [103]. A IMI-1 é uma terceira carbapenemase cromossomal da classe A identificada em 1984, nos EUA, em um *E. cloacae* [104]. A IMI-1 possui 95% de identidade de aminoácidos com a NMC-A e assim como essa enzima é induzível e possui perfil de hidrólise semelhante. Mais recentemente,

enzimas derivadas da SME-1 com mutações pontuais, SME-2 e 3, foram identificadas em isolados de *S. marcescens* nos EUA [105].

Apesar de mais de duas décadas após a primeira descrição dessas carbapenemases, sua importância clínica permanece pequena, pois permanecem sendo enzimas raramente encontradas em enterobactérias [100]. Porém, mais recentemente, uma nova enzima da classe A, a KPC-1, foi descrita em um isolado de *K. pneumoniae* [106]. Diferentemente das demais, o gene dessa enzima é codificado por um plasmídeo transferível de 50-kb [100]. Duas enzimas derivadas, mediada por plasmídeos e muito similares a KPC-1, a KPC-2 e 3, já forma descritas [107, 108]. A KPC-3 foi recentemente encontrada em *E. coli*, que raramente apresenta resistência aos carbapenêmicos [109].

Outro tipo de carbapenemase da classe A recentemente descrita é a GES-2 [110]. Essa enzima é uma derivada por uma mutação pontual da β -lactamase de espectro estendido GES-1 e foi encontrada em uma *P. aeruginosa* na África do Sul. Embora possua uma atividade hidrolítica contra os carbapenêmicos bastante inferior às carbapenemases NMC-A e SME-1, o gene codificador da GES-2 é, assim como a KPC-1, encontrado em um plasmídeo e em um integron classe 1 [100]. Outras enzimas com atividade contra carbapenêmicos, GES-3 e 4, foram recentemente descritas em isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* respectivamente [111].

As carbapenemases da família KPC e GES têm sido mais frequentemente relatadas que as demais carbapenemases da classe A (grupo 2f), principalmente em *K. pneumoniae* e

E. coli, e podem estar adquirindo uma maior representatividade e relevância clínica entre as carbapenemases.

1.2.4.2 Carbapenemases classe D (grupo 2d)

As carbapenemases da classe D de Ambler são derivadas de oxacilinasas (grupo 2d) e, atualmente, formam um pequeno grupo de enzimas isoladas de *A. baumannii* de diferentes partes do mundo [100]. A atividade hidrolítica dessas enzimas é bastante semelhante, possuem fraca atividade hidrolítica para imipenem e meropenem e não hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro [100].

Atualmente, são reconhecidos nove tipos de carbapenemases OXA: OXA-23 a 27 [112-114], OXA-40 [115], OXA-60 [116], OXA-51 [117] e OXA-58 [118]. A maioria das carbapenemases OXA identificadas até o momento são mediadas por plasmídeos. Entretanto, o gene codificador da OXA-24 é cromossômico, o gene da OXA-40 não tem localização descrita até o momento, o gene da OXA-51 não foi encontrado em plasmídeo e o da OXA-60 é cromossômico e induzível. Essa última enzima também apresenta outra exceção, pois foi encontrada em *Ralstonia pickettii*, e não em *A. baumannii* como as demais [117]. A OXA-51 apresenta maior afinidade ao imipenem em relação às demais [117].

Embora ainda pouco freqüentes as carbapenemases OXA têm sido descritas em surtos de infecções por *A. baumannii* em alguns países, inclusive no Brasil [119], e podem no futuro tornarem-se um mecanismo de resistência mais comum e um problema clínico mais relevante nesses bacilos gram-negativos.

1.2.5 Metalo- β -lactamases

As metalo- β -lactamases conforme discutido anteriormente possuem uma característica única em relação às demais β -lactamases: a presença de pelo menos um íon zinco no sítio ativo da enzima, enquanto as outras β -lactamases apresentam um resíduo serina [86]. Esse íon coordena moléculas de água que promovem a hidrólise da ligação amido do anel β -lactâmico [5]. As metalo- β -lactamases têm emergido em todo o mundo como um significativo problema clínico e, de um modo geral, pode-se citar alguns determinantes desse fato: 1) amplo espectro de hidrólise de antibióticos β -lactâmicos; 2) Presença em bactérias conhecidamente patogênicas e altamente prevalentes no meio hospitalar; e 3) Em sua maioria são mediadas por plasmídeos, possibilitando fácil transmissão horizontal de genes codificadores entre as bactérias.

1.2.5.1 Histórico

A primeira metalo- β -lactamase foi descrita na metade da década de 1960, em um *Bacillus cereus* [120], um organismo que não é considerado um patógeno importante. A segunda enzima dependente de zinco foi descrita no início da década de 1980, em uma *Stenotrophomonas maltophilia* [121]. Logo após, foram identificadas novas metaloenzimas em *Aeromonas hydrophilia* [122] e em *Bacteroides fragilis* [123]. Todas essas enzimas eram produzidas por genes cromossomais e, primeiramente, haviam sido encontradas em isolados clínicos únicos [99]. Entretanto, essas metalo- β -lactamases mediadas por cromossomas possuem pouca relevância clínica, pois são produzidas por

bactérias raramente patogênicas e/ou pouco prevalentes, como *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium spp.* e *S. maltophilia* [124].

A primeira metalo- β -lactamase mediada por plasmídeo foi descrita em 1991 de uma *P. aeruginosa* isolada no Japão em 1988 [125]. Essa enzima foi caracterizada bioquimicamente, mas não foi seqüenciada nem foi nomeada, embora tenha sido muito provavelmente uma IMP-1 (***Imipenemase***) [124], que foi, em 1991, encontrada em uma *S. marcescens* também no Japão, sendo, então, seqüenciada e nomeada [126].

Nos anos subseqüentes, alguns surtos de *P. aeruginosa* e *S. marcescens* produtoras de IMP-1 foram descritos no Japão, entretanto, a produção de metalo- β -lactamase permanecia pouco prevalente entre essas bactérias nesse país [124]. Posteriormente, a IMP-1 foi encontrada em outros países do extremo oriente, assim como variantes dessa enzima, IMP-2 e 3, começaram a ser identificadas em *A. baumannii* na Itália e Hong Kong, respectivamente [127, 128].

Até 2000, praticamente 10 anos após a primeira descrição da primeira metalo- β -lactamase mediada por plasmídeos, somente duas famílias dessas enzimas haviam sido reconhecidas, IMP e VIM (***Veronese Imipenemase***), representando um total de cinco diferentes enzimas (IMP-1 a 3 e VIM-1 e 2), embora já houvesse sido encontradas outras variantes dessas famílias ainda não seqüenciadas [124]. Nesse momento, a produção de metalo- β -lactamase ainda era considerado um mecanismo de resistência raro. Atualmente, cinco famílias de metalo- β -lactamases já foram identificadas, representando um total de 33

diferentes enzimas, sendo encontradas em diversos países de várias regiões do mundo, e é um mecanismo de resistência altamente prevalente em muitas delas [2].

1.2.5.2 *Metallo-β-lactamases de importância clínica*

As metallo-β-lactamases são capazes de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β-lactâmicos, exceto os monobactams (aztreonam), tornando as bactérias que possuem essa enzima resistentes a quase toda essa classe de drogas [2, 5, 129]. Essas eficientes enzimas, geneticamente móveis, são divididas em cinco grandes famílias (ou tipos) e são encontradas em bacilos Gram-negativos aeróbicos, principalmente em *P. aeruginosa* [5]. Os cinco tipos de metallo-β-lactamases incluem as mais antigas IMP e VIM, SPM (*São Paulo Metallo-β-lactamase*) e GIM (*German Imipenemase*) [2, 5], e a muito recentemente descrita na Coreia, SIM (*Seoul Imipenemase*) [130]. A maioria dos genes que codificam essas enzimas são encontrados como parte de cassetes de genes em integrons de classe 1 a 3, embora a mobilidade possa variar marcadamente conforme a tipo de enzima e a área geográfica [5].

Na tabela 2 são apresentados as primeiras descrições das diferentes metallo-β-lactamases já identificadas e a árvore filogenética demonstrando a similaridade genética dessas enzimas é ilustrada na figura 2.

Tabela 2. Primeiras descrições dos diferentes tipos de metalo- β -lactamases.

Metalo- β -lactamase	Organismos descritos	País	Similaridade genética	Referência
IMP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	—	125
	<i>Serratia marcescens</i>	Japão	—	126
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Itália	85% de identidade com IMP-1 na seqüência de nucleotídeos	127
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japão	Difere da IMP-1 por duas substituições de aminoácidos	128
IMP-4	<i>Citrobacter youngae</i>	China	95% de homologia com IMP-1 e 89% com IMP-2	131
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	—	132
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal	93% de homologia com IMP-1, 87% com IMP-2, 92% com IMP-3, 91% com IMP-4	133
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japão	Difere da IMP-1 por um aminoácido.	134
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canadá	91% de similaridade com IMP-1	135
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan	Derivada da IMP-2. 4 diferentes nucleotídeos determinando 2 diferentes aminoácidos.	136

Tabela 2. Continuação

Metalo- β -lactamase	Organismos descritos	País	Similaridade genética	Referência
IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	—	Banco de genes; acesso: AY033653
IMP-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Alcaligenes xylooxidans</i>	Japão	Difere por uma mutação pontual da IMP-1, determinando a substituição de 1 aminoácido.	137
IMP-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	—	Banco de genes; acesso: AB074437
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Itália	89% de identidade com IMP-8 e 88% com IMP-2	138
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Itália	93% de identidade com IMP-8 e 92% com IMP-2	139
IMP-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tailândia	—	Banco de genes; acesso: AY553332
IMP-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tailândia	—	Banco de genes; acesso: AY553333
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	90,3% de identidade com IMP-11 e 89,5% com IMP-8	140

Tabela 2. Continuação

Metalo- β -lactamase	Organismos descritos	País	Similaridade genética	Referência
IMP-17	Não publicado	?	–	2
IMP-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	México	–	2
VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Itália	<40% de homologia com IMP	141
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	França	90% de identidade com VIM-1	142
VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Taiwan	Difere em 2 nucleotídeos da VIM-2 determinando dois aminoácidos diferentes	143
VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grécia	Difere por uma mutação pontual, determinando um aminoácido diferente da VIM-1	144
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Turquia	Difere em 5 aminoácidos da VIM-1	Banco de genes; acesso: AY144612
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Singapura	99,2% de identidade com VIM-2 e 3	145
VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EUA	Somente 77% de identidade com VIM-1	146
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colômbia	Difere em 3 nucleotídeos da VIM-2, mas somente 1 aminoácido	147

Tabela 2. Continuação.

Metalo- β -lactamase	Organismos descritos	País	Similaridade genética	Referência
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inglaterra	—	Banco de genes; acesso: AY524988
VIM-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inglaterra	—	Banco de genes; acesso: AY524989
VIM-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	Difere da VIM-2 por uma mutação pontual	148
VIM-12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grécia	Semelhante a VIM-1 e 2	149
SPM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	35,5% de identidade com IMP-1	150
GIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alemanha	43,1% de identidade com IMP-1, 28,8% com VIM-1 e 28% com SPM-1	151
SIM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Coréia	64 a 69% de identidade com IMPs.	130

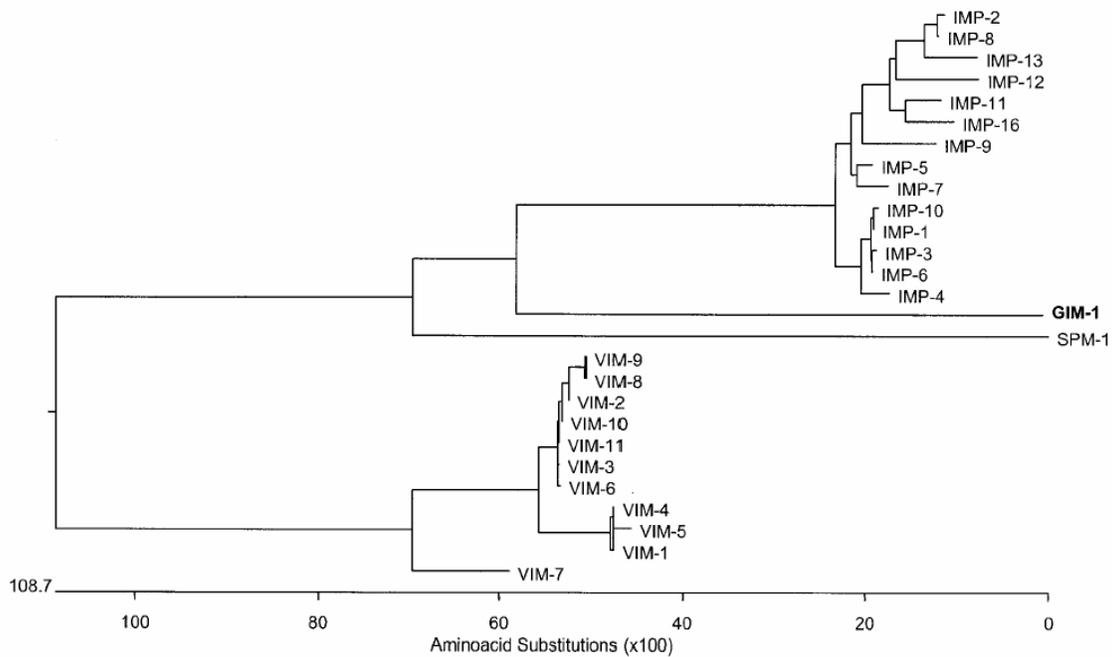


Figura 2. Árvore filogenética das metalo- β -lactamases de importância clínica [151]. Não incluem: IMP-17 e 18, VIM-12 e SIM-1.

1.2.5.3 Aspectos moleculares e bioquímicos

Do ponto de vista molecular, as metalo- β -lactamases constituem um grupo de proteínas muito diferentes que fazem sua classificação virtualmente impossível [2]. Um esquema proposto para a classificação molecular dessa classe baseia-se no alinhamento de aminoácidos coordenados pelo zinco. Assim, a classe B1 compreenderia enzimas que possuem os seguintes resíduos coordenados pelo zinco: 3 histidinas e 1 cisteína, e é composta pelas metalo- β -lactamases transferíveis: IMP, VIM, SPM e GIM [2]. A classe B2 diferencia-se por possuir uma asparagina no lugar da primeira histidina, e inclui enzimas menos importantes produzidas por *Aeromonas* spp. e *Serratia fonticola* [2]. Enzimas que possuem a característica única entre as β -lactamases de serem um tetrâmero são enquadradas na sub-classe B3 [2]. Essa sub-classe também é composta por enzimas de pouca relevância clínica.

As metalo- β -lactamases possuem uma grande variedade no número de aminoácidos e esta classificação leva em conta somente os resíduos coordenados pelo zinco, não sendo capaz acomodar variações importantes em pontos da proteína distantes do sítio ativo [2, 129].

A grande maioria dos genes codificadores das metalo- β -lactamases do tipo IMP, VIM e GIM são encontrados como cassetes de genes em integrons de classe 1, embora alguns genes codificadores de IMP também sejam encontrados em integrons de classe 3 [2, 129]. Cassetes de genes são pequenas peças de DNA circular de aproximadamente 1kb de tamanho, possuindo um único gene e um sítio recombinante [2, 129]. Alguns cassetes de

genes codificadores de VIM apresentam a fusão do gene *aacA4*, que codifica resistência aos aminoglicosídeos [2, 129]. A imensa maioria desses genes são encontrados em plasmídeos, que permitem a mobilidade desses genes entre diferentes organismos [2]. O gene codificador de SPM-1 possui genes adjacentes muito relacionados à *Salmonella enterica* serovar Thyphimurum, ambos fazendo parte de um elemento genético móvel (*mobile genomic pathogenicity island*) inserido em um plasmídeo de 180kb [2, 152]. Essas ilhas de material genético móvel, por sua vez, estão associadas a outros elementos móveis denominados regiões SXT [2]. Recentemente, foi demonstrado que essas regiões SXT podem ser mobilizadas quando a bactéria está sob estresse, e elementos de resistência ligados a ela aumentaram cerca de 300 vezes quando expostas a fluorquinolonas [153, 154].

O mecanismo de hidrólise das metalo- β -lactamases não é ainda completamente esclarecido. O mecanismo proposto sugere que o sítio-ativo oriente o substrato, facilitando a quebra da ligação amido do anel β -lactâmico através da hidrólise por duas moléculas de água ligadas ao zinco [2]. Apesar das metalo- β -lactamases compartilharem menos de 25% de identidade de aminoácidos entre elas, a arquitetura de seu sítio ativo é praticamente superponível em todas as enzimas [2]. Ao contrário das β -lactamases com serina no sítio ativo, as metalo enzimas possuem um sítio ativo altamente plástico, permitindo a acomodação da maioria dos β -lactâmicos, determinando o seu amplo espectro de hidrólise [2]. Entretanto, apesar destas enzimas possuírem uma arquitetura do sítio ativo muito semelhante, sua capacidade de se ligar e hidrolisar o anel β -lactâmico pode variar de uma enzima para outra, como exemplificado na tabela 3. A tabela 4 sumariza o espectro de hidrólise de quatro famílias de metalo- β -lactamases.

Tabela 3. Taxa de hidrólise relativa de diferentes metalo- β -lactamases.

	imipenem	meropenem	ceftazidima	cefepima	piperacilina
IMP-1	100	128	17	18	-
VIM-1	100	192	505	14090	3838
VIM-2	100	6	3	13	238
SPM-1	100	83	81	61	317
GIM-1	100	25	161	47	51

Adaptado de Walsh e colegas [2]. Taxa de hidrólise calculada padronizando a hidrólise do imipenem em 100.

Tabela 4. Perfil de hidrólise de 4 tipos de metalo- β -lactamases de importância clínica.

Tipo	Aminopenicilinas	Ureidopenicilinas	Cefalosporinas	Monobactam	Carbapenêmicos
IMP	ALTO	ALTO	ALTO	NENHUM	BAIXO a ALTO
VIM	ALTO	ALTO	ALTO	NENHUM	ALTO
SPM	ALTO	ALTO	ALTO	NENHUM	ALTO
GIM	ALTO	ALTO	ALTO	NENHUM	ALTO

Adaptado de [100, 155].

1.2.5.4 Detecção fenotípica

Em 2000, Arakawa e colaboradores [156] desenvolveram um teste para detecção rápida da produção de metalo- β -lactamase. Esse teste é feito através da verificação da ocorrência de inibição do crescimento da bactéria produtora dessa enzima, demonstrado pela presença de halo inibitório em meio de cultura, quando a ceftazidima (antibiótico que é hidrolisado pela metalo- β -lactamase) está na presença de um inibidor de metalo- β -lactamase.

Nesse estudo [156], vários inibidores, ou potenciais inibidores, de metalo- β -lactamase, por sua atividade quelante de zinco e outros metais, foram testados com diversas bactérias produtoras de IMP-1. Os melhores resultados foram encontrados com o ácido 2-mercaptopropiônico, por sua forte inibição de metalo- β -lactamase, mesmo em baixas concentrações [156]. Outras substâncias produziram fracos efeitos inibitórios. O EDTA também criou uma zona de inibição de crescimento, porém não obteve boa reprodutibilidade. Várias bactérias Gram-negativas foram testadas e apresentaram resultados semelhantes. A sensibilidade e especificidade desse teste foram comparáveis ao PCR para a detecção de IMP-1. Uma rápida descrição do teste é demonstrada na figura 3.

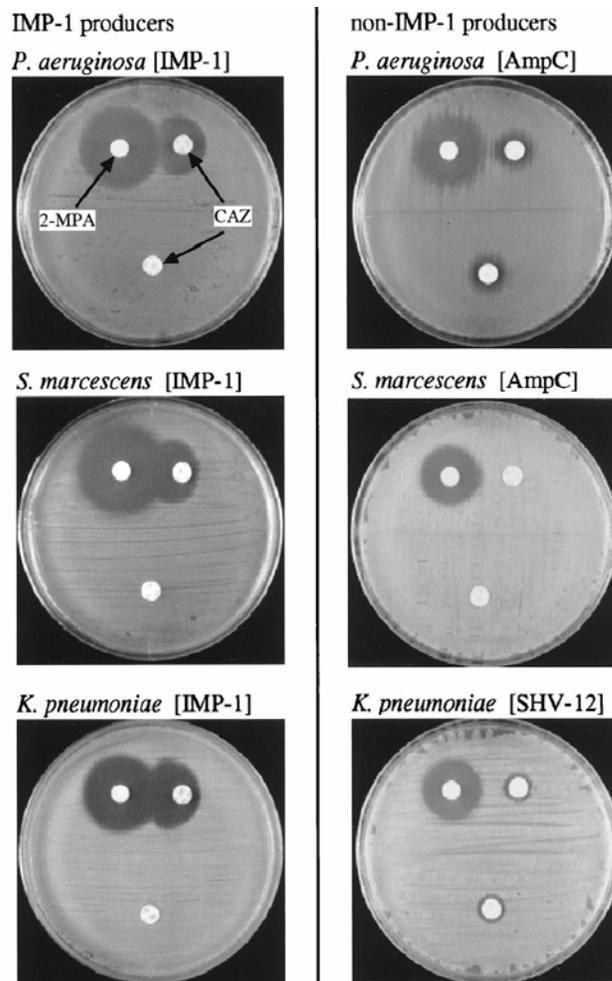


Figura 3. Teste fenotípico para detecção de metalo- β -lactamase com ácido 2-mercaptopropiônico [156]. A colônia bacteriana é semeada em ágar Müller-Hinton. Dois discos Kirby-Bauer contendo 30 μ g de ceftazidima (CAZ) são colocados na placa a uma distância centro-ao-centro de 4,0 a 5,0 centímetros. Um terceiro disco contendo 2 a 3 μ l de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) é colocado próximo a um dos discos de ceftazidima a uma distância centro-ao-centro de 1,0 a 2,5. Os resultados são interpretados conforme mostra a figura. Nas bactérias produtoras de metalo- β -lactamase observa-se halo de inibição de crescimento no disco de ceftazidima próximo ao disco contendo ácido 2-mercaptopropiônico.

Outro teste fenotípico validado por Walsh e colaboradores [157] utiliza fitas de E-teste de imipenem com concentrações de 4 a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e imipenem com concentrações de 1 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na presença de EDTA na concentração fixa de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O teste é interpretado como positivo para a presença de metalo- β -lactamase se houver uma queda de 3 vezes ou mais da CIM do imipenem isolado em relação ao imipenem com EDTA. Esse teste está exemplificado na figura 4. A desvantagem deste teste é o custo bastante mais elevado. Além disso, ele é incapaz de determinar a presença de metalo- β -lactamase se a bactéria for produtora de uma IMP com baixo nível de hidrólise para imipenem e sua CIM não for superior a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

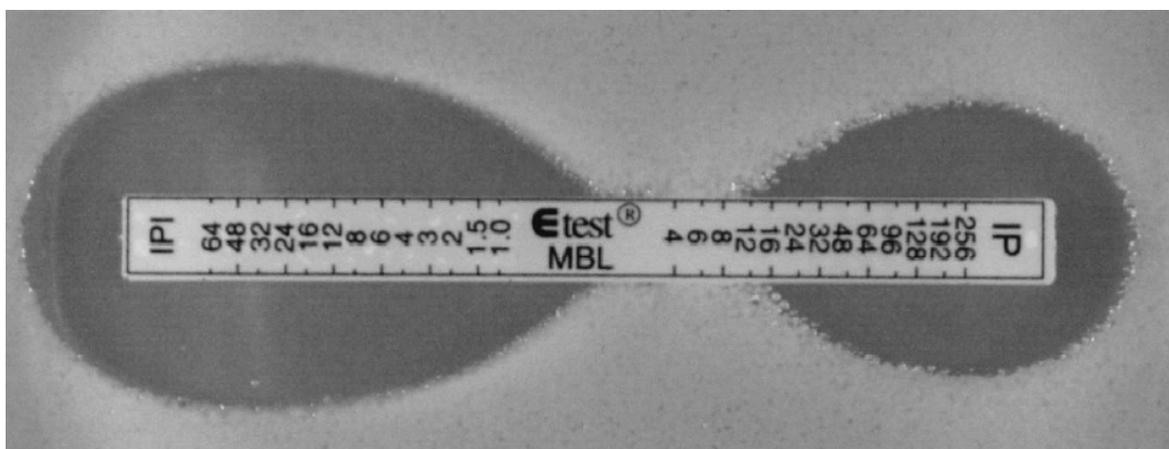


Figura 4. Teste fenotípico para detecção de metalo- β -lactamase com E-teste. Imipenem + EDTA à esquerda e imipenem isoladamente à direita. Teste positivo para metalo- β -lactamase: CIM do imipenem 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ reduz para <1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na presença de EDTA [157].

1.2.5.5 Detecção genotípica

Embora os testes fenotípicos para detecção de metalo- β -lactamase possuam alta sensibilidade e especificidade, os testes genotípicos são considerados o padrão-ouro. Estes testes são realizados através da detecção do gene codificador da enzima pela técnica de PCR. A importância do teste genotípico, porém, vai além da simples detecção do gene, pois ele também caracteriza o tipo de metalo- β -lactamase que está sendo produzida. Apesar de ser um teste altamente específico, não é recomendado para *screening*, pois seriam necessários *primers* para todos os tipos de metalo- β -lactamases, uma vez que a especificidade de um teste se reduz a um tipo determinado de enzima [2]. Uma descrição da técnica de PCR está além do escopo deste trabalho.

1.2.5.6 Epidemiologia das Metalo- β -lactamases

A ocorrência de resistência mediada por metalo- β -lactamases em isolados de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. marcescens*, entre outros Gram-negativos, tem apresentado um importante crescimento desde 2000, sobretudo na Ásia, Europa e América Latina [3]. Mais recentemente, surtos na América do Norte e Oceania foram reportados [2, 4]. Devido ao amplo espectro de hidrólise das metalo-enzimas, combinados com a frequente coexistência de outros mecanismos de resistência, essas enzimas limitam significativamente as opções terapêuticas para muitas dessas bactérias, principalmente, em não-fermentadores como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* [1, 3, 63]. Desse modo, esse mecanismo de resistência é, atualmente, a maior preocupação da comunidade médica em termos de resistência bacteriana [3].

Apesar dessa crescente ocorrência de metalo- β -lactamases em todo o mundo, ainda existem poucos estudos demonstrando a prevalência desse mecanismo de resistência entre bacilos Gram-negativos. Sabe-se que antes de 2000, esse era considerado um mecanismo de resistência extremamente raro e confinado a determinados países do extremo oriente, principalmente o Japão, e poucos países da Europa, como Itália e Grécia [124]. Um estudo de vigilância realizado em 17 hospitais japoneses entre 1992 e 1994 encontrou o gene codificador de IMP-1 em apenas 15 (0,004%) de 3700 isolados de *P. aeruginosa*. Atualmente, seguindo um aumento mundial da resistência aos carbapenêmicos, sabe-se que esse mecanismo de resistência também aumentou [3]. Em levantamento do SENTRY de 1998 a 2002, 10,8% das *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos eram produtoras de metalo- β -lactamases, representando 1,1% de todas as *P. aeruginosa* testadas [158]. Outro estudo mais recente, realizado em 2002, encontrou uma prevalência semelhante de metalo- β -lactamases entre *P. aeruginosa* do Japão, 1,9% do total [159]. As enzimas encontradas foram IMP-1 e VIM-2. Esse estudo demonstrou uma clara disseminação clonal de *P. aeruginosa* produtoras dessa enzima em diversas regiões do país [159].

Na Europa, a situação mais dramática parece ser na Itália. Em estudo do SENTRY, realizado entre 1999 e 2002 em diversas regiões da Itália, a produção de metalo- β -lactamases foi encontrada em 6,5% do total de *P. aeruginosa* avaliadas, mas esse número correspondia a 39,1% dos isolados resistentes a imipenem [159]. As enzimas encontradas foram a VIM-2, primeiramente descrita em Verona [142], e a IMP-13 [160]. Apesar da maioria da resistência ao imipenem ainda dever-se ao mecanismo de impermeabilidade, a disseminação dessas enzimas em todo o país e sua progressiva escalada são causa de grande

preocupação [3]. Em vários países europeus foram encontradas metalo- β -lactamases incluindo Grécia, França, Portugal e Polônia, entre outros [2].

A primeira metalo- β -lactamase a ser detectada na América do Norte foi a IMP-7 [135]. Seguiu-se a detecção da VIM-7 nos EUA [146]. Apesar de, provavelmente, ainda ser um dos continentes com menor prevalência dessas enzimas entre Gram-negativos, descrições recentes de surtos nos EUA [161], assim como de crescimento de infecções por bactérias produtoras de metalo- β -lactamases no Canadá [9], e juntamente com o aparecimento dessas na Oceania [4] demonstram claramente a importante disseminação desse mecanismo de resistência em todo o mundo.

Na América Latina, a situação é extremamente preocupante, pois além dos elevados índices de resistência aos antibióticos com ação antipseudomonas, hoje, sabe-se que grande parte da resistência aos β -lactâmicos, sobretudo, os carbapenêmicos é mediada por metalo- β -lactamases [155]. No Brasil, desde a primeira descrição da SPM-1 em uma *P. aeruginosa* isolada do trato urinário de um paciente pediátrico internado no Hospital São Paulo, São Paulo – SP [149], notou-se que a prevalência de resistência mediada por metalo- β -lactamase, sobretudo em *P. aeruginosa*, era bastante elevada. No ano seguinte, Gales e colaboradores [29], reportaram a presença de um único clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 em diferentes regiões do Brasil, como Paraná (Londrina e Curitiba), São Paulo (Santo André), Brasília, Bahia (Salvador) e Ceará (Fortaleza).

Diferentes tipos de metalo- β -lactamase já foram descritos no Brasil e na América Latina [155]. Essas diferentes enzimas já isoladas em países latino-americanos são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Metalo- β -lactamases e bactérias produtoras descritas na América Latina.

Enzima	Bactéria	País	Ano	Referência
SPM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	2001	[141]
IMP-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brasil	2001	[162]
IMP-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Brasil	2001	[155]
VIM-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Chile	2002	[155]
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Venezuela	2002	[155]
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	2002	[140]
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colômbia	1999 a 2002	[147]
VIM-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	2002	[148]
IMP-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	2005	[163]

No Brasil, além dos relatos iniciais da SPM-1 em *P. aeruginosa* [29], IMP-1 [162] e IMP-16 [140], a presença de metalo- β -lactamases em outros locais do país foram relatadas. Em 2005, Sader e colaboradores [164] relataram a presença de SPM-1, IMP-1 e VIM-2 em isolados de *P. aeruginosa* de hemoculturas obtidas entre 2000 e 2001. De um total de 183 isolados, 36 eram produtores de metalo- β -lactamases, correspondendo a 19,7% do total de *P. aeruginosa* e 43,9% das resistentes a imipenem [164]. A maioria das metalo- β -lactamases eram SPM-1 (55,6%), seguidas de VIM-2 (30,6%) e IMP-1 (8,3%). Dois isolados não apresentaram produto de amplificação para nenhum desses três *primers*, sugerindo a presença de uma outra metalo- β -lactamase. Diferentemente dos primeiros relatos da SPM-1, que demonstravam a disseminação de um único clone em diversas regiões do país [29], a tipagem molecular desses isolados (ribotipagem) demonstrou uma grande diversidade clonal entre as *P. aeruginosa* [164]. Vinte e cinco diferentes ribogrupos foram encontrados em 47 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem. Sete ribogrupos foram encontrados entre as produtoras de SPM-1, 3 entre as produtoras de VIM-2 e 3 entre as IMP-1 positivas. Os autores reforçam com esse estudo o fato de que a disseminação desse mecanismo de resistência pode ocorrer tanto por disseminação clonal de bactérias resistentes, como também por transmissão horizontal de elementos genéticos móveis que codificam essas enzimas [164].

Em Recife, Pernambuco [152], e, mais recentemente, em São Luís do Maranhão [165] a presença de SPM-1 em *P. aeruginosa* também já foi reportada.

Em Porto Alegre também já foram detectadas a presença de metalo- β -lactamases em *P. aeruginosa*. A primeira descrição dessa enzima em nosso meio foi feita por nosso

grupo, que analisou 135 isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos isoladas de janeiro a outubro de 2004 e correspondendo a 57% do total de *P. aeruginosa* isoladas nesse período [166]. Dessas 135, 35 foram submetidas ao teste de *screening* para a produção de metalo- β -lactamases, sendo que 27 (77,1%) isolados foram positivos para essa enzima. Vinte e um de 24 isolados testados demonstraram ser produtores de SPM-1, sendo que duas foram um controle negativo, pois não eram positivas no teste fenotípico e uma não amplificou nenhum produto para *primers* dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}, sugerindo a presença de outro tipo de metalo- β -lactamase [166]. O intervalo de confiança de 95% (IC 95%) calculado para a prevalência de metalo- β -lactamase foi de 59,9 a 89,6%, demonstrando que esse mecanismo de resistência é altamente prevalente entre os isolados resistentes a carbapenêmicos nesse hospital, mesmo considerando o limite inferior do IC 95% como a real prevalência [166].

Além desses achados, esse estudo submeteu 8 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, isoladas de diferentes meses do período do estudo, à tipagem molecular por macrorestrição de DNA, ficando caracterizado a presença de um único clone [166], conforme demonstrado na figura 5.

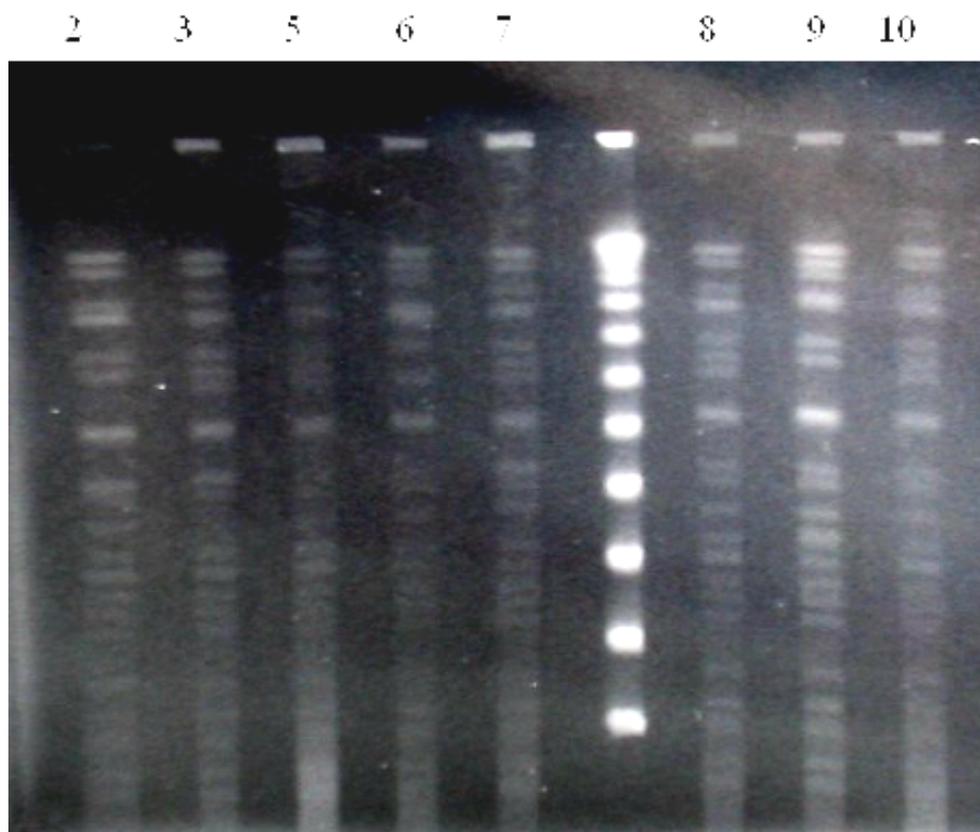


Figura 5. Macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsátil de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do Hospital São Lucas – PUCRS, Porto Alegre, Brasil. Padrão de bandas indicando a presença de relação clonal entre as 8 amostras estudadas [166].

A presença de isolados de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foi também reportada em outros dois hospitais universitários de Porto Alegre [167, 168] e apesar do predomínio de SPM-1 entre as metalo- β -lactamases, a enzima IMP-1 foi encontrada em um número menor de isolados nesses estudos. A enzima VIM-2 não foi encontrada em Porto Alegre até o momento [167, 168].

1.2.5.7 Desfechos Clínicos

Apesar do aumento da prevalência de bacilos Gram-negativos, principalmente *P. aeruginosa*, produtores de metalo- β -lactamases em várias regiões do mundo, pouco se conhece a respeito do comportamento clínico das infecções causadas por bacilos Gram-negativos produtores dessa enzima [2]. A importância do conhecimento do comportamento clínico dessas infecções reside na hipótese de que as mesmas podem, potencialmente, estar associadas a desfechos clínicos desfavoráveis, incluindo maior mortalidade, o que implicaria uma consideração ou reconsideração na abordagem preventiva e terapêutica das infecções por bactérias produtoras de metalo- β -lactamases.

Um único estudo comparou a virulência de cepas produtoras de metalo- β -lactamase com não produtoras *in vitro* e em modelos experimentais [169]. Os resultados deste estudo não demonstraram diferença na virulência de cepas produtoras de IMP-1 (enzima estudada) e não produtoras [169]. Embora seja possível a ocorrência de diferentes graus de virulência entre diferentes cepas produtoras de outras enzimas, nós acreditamos que as infecções por bactérias produtoras de metalo- β -lactamase poderiam determinar uma mortalidade mais elevada devido, principalmente, a uma maior dificuldade no tratamento das mesmas, uma

vez que isolados produtores de metalo- β -lactamases são resistentes a praticamente todos os β -lactâmicos, que são os antibióticos mais amplamente utilizados no tratamento de infecções nosocomiais.

Além disso, pouco se sabe sobre a eficácia de antibióticos que potencialmente podem ser utilizados contra bactérias produtoras de metalo- β -lactamases, como aztreonam, ciprofloxacino, aminoglicosídeos e polimixinas. O primeiro não é comumente usado na prática clínica, sobretudo em esquemas de terapia empírica, e nada está descrito sobre sua ação no tratamento de bactérias produtoras dessa enzima em humanos [2], ação essa que dependeria da ausência de outro mecanismo de resistência na bactéria que pudesse comprometer sua atividade, como outras β -lactamases ou bombas de efluxo. Um único estudo em modelo experimental demonstrou que o tratamento com aztreonam pode ser potencialmente útil no tratamento de pneumonias por *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase VIM-2 [170]. Ainda, bactérias produtoras de metalo- β -lactamases são freqüentemente resistentes ao ciprofloxacino e aos aminoglicosídeos, por co-existência de outros mecanismos de resistência. Acrescenta-se a isso o fato de que a utilização de aminoglicosídeos em monoterapia para o tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos é proscrita por estar associada a piores desfechos [171]. Do mesmo modo, as respostas ao tratamento de infecções graves por bactérias multi-resistentes com as polimixinas ainda é pouco conhecida e apresenta resultados bastantes variáveis [7].

Os poucos relatos de desfechos clínicos de infecções por produtores de metalo- β -lactamases são oriundos da descrição de alguns surtos hospitalares. Entretanto, o primeiro relato de características clínicas de pacientes com infecção por bacilos Gram-negativos

produtores de metalo- β -lactamase IMP-1 provém de um estudo de vigilância conduzido por Hirakata e colaboradores [172] entre 1991 e 1996 no Japão. Nesse estudo, 80 pacientes com bacilos Gram-negativos produtores de IMP-1 foram estudados, sendo 53 isolados de *P. aeruginosa*, 13 de *S. marcescens*, 1 de *C. freundii* e 13 de outros bacilos Gram-negativos não-fermentadores [172]. Trinta e sete pacientes (46,3%) foram considerados como infectados, os demais foram considerados apenas colonizados. A maioria das infecções foram do trato respiratório e urinário, e a *P. aeruginosa* foi responsável por mais de 50% dos casos [172]. Treze (35,1%) dos 37 pacientes morreram, todos com infecção por *P. aeruginosa* e a maioria com doenças neoplásicas. Nenhuma especificação sobre tratamento foi apresentada nesse estudo.

Cornaglia e colaboradores [173] descreveram o desfecho de 7 pacientes com infecção por *P. aeruginosa* produtora de VIM-1, em um surto ocorrido entre 1997 e 1998 no Hospital Universitário de Verona, Itália. Somente 2 pacientes sobreviveram (mortalidade 71,4%), porém, além do pequeno número de casos poucas características clínicas relacionadas ao desfecho foram descritas [173].

Em 2001, Yan e colaboradores [174], descreveram, em um hospital universitário de Taiwan, um surto de infecções por *K. pneumoniae* produtora de IMP-8 ocorrido entre 1999 e 2000. Dezesesseis pacientes foram estudados, 9 (56,2%) destes morreram de causas não relacionadas à infecção por *K. pneumoniae* [174]. A terapia empregada para as infecções foi descrita somente em 3 casos que apresentaram isolamento da bactéria em hemocultura, 2 foram tratados com imipenem e 1 com meropenem, e somente 1 sobreviveu [174].

Em 2002, 3 casos de infecção do trato urinário por *P. putida* produtora de VIM-1 durante um surto de infecções por essa bactéria ocorrido entre 1998 e 2000, em um hospital de Viena, Itália [175]. Amicacina em monoterapia, aminoglicosídeo que os 3 isolados apresentavam sensibilidade foi usada nos 3 pacientes, que apresentaram cura da infecção [175].

Mais recentemente, um surto de infecções por *A. baumannii* produtor de metalo- β -lactamase não especificada, ocorrido em pacientes submetidos à cirurgia em um período de 2 meses, foi descrito em Tübingen, Alemanha [176]. De 14 pacientes que apresentaram o isolamento da bactéria, 4 foram considerados como tendo infecção de sítio cirúrgico. Dois desses pacientes morreram, porém, não há descrição específica de nenhum dos casos de infecção [176].

Em Porto Alegre, no surto de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos descrito por nosso grupo [166], a mortalidade encontrada nos 135 pacientes estudados foi de 48,1% [166]. Este estudo avaliou pela primeira vez a associação de algumas variáveis com o óbito, porém, nenhuma delas apresentou significância estatística na análise bivariada, incluindo, sítio de infecção, isolamento da bactéria em UTI, e perfil de sensibilidade. Entretanto, embora sem significância estatística, pacientes com isolados com perfil de sensibilidade denominado 1 (sensibilidade a aztreonam e polimixina B, e resistência aos demais) apresentaram mortalidade mais elevada em relação aos demais (56,6%; $p=0,12$) [166].

Outro estudo [177] avaliou o desfecho de 8 pacientes com bacteremia por Gram-negativos produtores de metalo- β -lactamase, ocorridos em um hospital de Taiwan entre

1997 e 2000. Três pacientes com bacteremia por *K. pneumoniae*, 3 por *P. stutzeri*, 1 por *P. aeruginosa* e 1 por *P. putida* foram analisados. Nesse estudo, apesar do reduzido número de casos, uma descrição clínica mais detalhada foi apresentada, incluindo o tratamento empregado [177]. Os sítios primários foram pneumonia (6 casos) e infecção de cateter (2 casos). A maioria foi tratada com mais de um antibiótico incluindo carbapenêmicos e outros β -lactâmicos, e todos estavam vivos ao final de 2 semanas de seguimento [177]. O tipo de metalo- β -lactamase envolvida nas infecções não foi descrito nesse estudo.

Hsueh e colaboradores [178] descreveram recentemente o desfecho clínico de 16 pacientes com infecções por *P. aeruginosa* pan-resistente (resistente a todos os antimicrobianos, exceto colistina). Nove dessas infecções foram causadas por cepas produtoras de VIM-3 [178]. Dos 16 pacientes, 7 (43,8%) morreram, sendo que dos 9 pacientes com infecção por *P. aeruginosa* produtora de VIM-3, 4 (44,4%) tiveram desfecho fatal [178]. Desses 9 pacientes, todos foram tratados com cefepima ou meropenem mais aminoglicosídeo ou ciprofloxacino [178].

Em recente série de casos, Peleg e colaboradores [4] avaliaram 16 pacientes com isolamento de bacilos Gram-negativos produtores de IMP-4, incluindo: *S. marcescens* (8 pacientes), *K. pneumoniae* (4), *P. aeruginosa* (3), e *Enterobacter cloacae* (1). Destes, apenas 10 foram considerados como tendo infecção. Seis (37,5%) dos 16 pacientes morreram, sendo que 5 desses pacientes foram classificados como tendo infecção. Os tratamentos descritos variaram de caso para caso, e muitos desses pacientes não receberam antibioticoterapia adequada.

Entretanto, além de avaliarem amostras geralmente pequenas, nenhum desses estudos foi capaz de demonstrar se as infecções por bactérias produtoras de metalo- β -lactamases resultam em desfechos clínicos piores em relação a infecções por bactérias não-produtoras dessa enzima. Hirakata e colaboradores [8] publicaram o primeiro estudo que comparou a mortalidade de pacientes com infecção por *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases com não-produtoras. O principal objetivo desse estudo, no entanto, foi identificar fatores de risco para o isolamento de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1. Para tanto, foram avaliados retrospectivamente 69 pacientes com isolamento de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 e 247 com isolamento de *P. aeruginosa* não-produtoras, internados em hospital universitário de Nagasaki, Japão, entre 1991 e 1996 [8]. Os fatores de risco encontrados incluem hospitalização prolongada, quimioterapia antineoplásica, uso de corticosteróides, isolamento de urina e presença de sonda vesical de demora [8]. Igualmente, observou-se uma duração maior do tempo e dose total mais elevada para alguns antibióticos, incluindo carbapenêmicos, como fator de risco para *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 [8]. Vale ressaltar que somente 46,4% dos pacientes foram considerados infectados entre os casos e apenas 9,3% entre os controles (*Odds Ratio*, OR: 8,42; IC 95%: 4,44-15,95), indicando que os isolados desse estudo produtores de IMP-1 estavam significativamente associados à ocorrência de infecção. Em relação à mortalidade, não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos (30,4% e 25,5% para os produtores de IMP-1 e os não-produtores, respectivamente; $p=0,41$) na mortalidade geral, mas os óbitos associados à infecção foram maiores no grupo das infecções por *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1 em relação aos não produtores, 5,8% e 1,2%, respectivamente (OR 5,00; IC95% 1,09 – 22,9) [8].

Laupland e co-autores [9], em estudo realizado no Canadá, analisaram 93 pacientes com infecções por *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases e 80 com infecções por não-produtoras. A mortalidade foi maior nos pacientes com infecções por isolados produtores da enzima comparativamente aos não-produtores (25% e 13%, respectivamente; RR 1.98; IC 95% 1.00 – 3.90; p=0.05).

Contudo, nenhum desses estudos foi delineado especificamente para controlar as diversas variáveis, algumas delas fundamentais, que podem influenciar na mortalidade de pacientes com infecções, como comorbidades, gravidade da doença, adequação do tratamento antimicrobiano, sítio de infecção, entre outros, limitando uma análise mais aprofundada da influência da produção de metalo- β -lactamases no desfecho de pacientes com infecções por essas bactérias.

2 JUSTIFICATIVA

Sendo as infecções nosocomiais por *P. aeruginosa* altamente prevalentes e associadas à elevada morbi-mortalidade, assim como a produção metalo- β -lactamases estar sendo crescentemente descrita nessa bactéria, e considerando o exposto sobre a importância desse mecanismo de resistência, entendemos ser de grande relevância o conhecimento da influência da produção de metalo- β -lactamases por *P. aeruginosa* na mortalidade de pacientes com infecções por essa bactéria.

3 OBJETIVO GERAL

Conhecer as principais características clínicas e microbiológicas das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases em dois hospitais universitários de Porto Alegre.

3.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência da produção de metalo- β -lactamase na mortalidade de pacientes com infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa*;

2. Identificar os determinantes de um potencial efeito da produção de metalo- β -lactamase na mortalidade de pacientes com infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa*;

3. Determinar fatores associados à mortalidade em pacientes com infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase;

4. Identificar fatores de risco para infecções por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase.

4 REFERÊNCIAS

1. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002; 34: 634-40.
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18: 306-25.
3. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis 2005; 41(Suppl 4): S276-8.
4. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. Clin Infect Dis 2005; 41: 1549-56.
5. Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, Fritsche TR, Toleman MA, Walsh TR. Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51: 77-84.
6. Livermore DM. The need for new antibiotics. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (Suppl 1): 1-9.
7. Zavascki AP. Treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: more attention required to *in vitro* studies. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 856-7.
8. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, *et al.* Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003; 37: 26-32.

9. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, *et al.* Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary health region: importance of metallo- beta -lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis* 2005; 192: 1606-12.
10. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 2310-35.
11. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, *et al.* Manual of clinical microbiology 1999. p. 517-25.
12. Pitt TL, Barth AL. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important Pseudomonads. In: Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. London: Scientific Books; 1997. p. 493-517.
13. Pitt TL. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 238-47.
14. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-9.
15. Chester IR, Meadow PM, Pitt TL. The relationship between the O-antigenic lipopolysaccharides and serological specificity in strains of *Pseudomonas aeruginosa* of different O-serotypes. *J Gen Microbiol* 1973; 78: 305-18.
16. Tenover F, Arbeit R, Goering R, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
17. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2000; 2: 1051-60.

18. Sato H, Okinaga K, Saito H. Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. *Microbiol. Immunol* 1988; 32: 131-9.
19. Bejarano PA, Langeveld JP, Hudson BG, Noelken ME. Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* 1989; 57: 3783-7.
20. Kharazmi A, Nielsen H. Inhibition of human monocyte chemotaxis and chemiluminescence by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *APMIS* 1991; 99: 93-5.
21. Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, Ramseier TM, Saier MH Jr. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1611: 223-33.
22. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 56-60.
23. French GL, Phillips I. Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. In: Mayhall CG. *Hospital epidemiology and infection control*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996. p. 980-99.
24. Olson B, Weistein RA, Nathan C, Chamberlin W, Kabins AS. Epidemiology of endemic *Pseudomonas aeruginosa*: why infection control efforts have failed. *J Infect Dis* 1984; 150: 808-16.
25. Cailleaux V, Mulin B, Capellier G, Julliot MC, Thouverez M, Talon D. Epidemiological study of variations in β -lactam antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in two intensive care units. *J Hosp Infect* 1997; 37: 217-24.
26. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1347-51.

27. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32(suppl 2): S146-55.
28. Ramsey BW. To cohort or not to cohort: how transmissible is *Pseudomonas aeruginosa*? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 906-7.
29. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 699-702.
30. National nosocomial infections surveillance system. National nosocomial infections (NNIS) system report, data summary from January 1990 – May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999; 27: 520-32.
31. Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 279-85.
32. Streit JM, Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 111-8.
33. Fluit AC, Verhoef J, Schmitz FJ; European SENTRY Participants. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the

European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 617-25.

34. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 25-79.

35. Rennie RP, Jones RN, Mutnick AH. Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 287-93.

36. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 2001; 5: 200-14.

37. Quinn JP. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 1998; 27(Suppl 1): S117-24.

38. Vidal F, Mensa J, Almela M, *et al.* Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment: analysis of 189 episodes. *Arch Intern Med* 1996; 156: 2121-26.

39. Aliaga L, Mediavilla JD, Cobo F. A clinical index predicting mortality with *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *J Med Microbiol* 2002; 51: 615-19.

40. Hilf M, Yu VL, Sharp J, Zuravleff JJ, Korvick JA, Muder RR. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *Am J Med* 1989; 87: 540-46.

41. Blot S, Vandewoude K, Hoste E, Colardyn F. Reappraisal of attributable mortality in critically ill patients with nosocomial bacteraemia involving *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect 2003; 53: 18-24.
42. Kang CI, Kim SH, Park WB, *et al.* Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist 2005; 11: 68-74.
43. Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 2004; 125: 607-16.
44. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1306-11.
45. Kang CI, Kim SH, Kim HB, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. Clin Infect Dis 2003; 37: 745-51.
46. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 1998; 27(suppl 1): S93-99.
47. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 247-50.
48. Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 229-33.
49. Cosgrove SE, Carmeli Y. The Impact of Antimicrobial Resistance on Health and Economic Outcomes. Clin Infect Dis 2003; 36: 1433-7.

50. Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH. Health and economic impact of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Int Med 1999; 159: 1127-32.
51. Howard D, Cordell R, McGowan JE, Packard RM, Scott II RD, Solomon SL. Measuring the economic costs of antimicrobial resistance in hospital settings: summary of the Centers for Disease Control and Prevention-Emory workshop. Clin Infect Dis 2001; 33: 1573-8.
52. McGowan JE. Economic impact of antimicrobial resistance. Emerg Infect Dis 2001; 7: 286-92.
53. Phelps CE. Bug/drug resistance: sometimes less is more. Med Care 1989; 27: 194-203.
54. National Nosocomial Infections Surveillance System. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 – June 2001, issued August 2001. Am J Infect Control 2001; 29: 404-21.
55. Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, *et al.* Antibiotic susceptibility among gram-negative bacilli in intensive care units in 5 european countries. JAMA 1999; 281: 67-71.
56. Harris A, Torres-Vieira C, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 1999; 28: 1128-33.
57. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). J Antimicrob Chemother 2003; 52: 140-41.

58. Karlowsky JA, Jones ME, Thornsberry C, Evangelista AT, Yee YC, Sahn DF. Stable antimicrobial susceptibility rates for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the 2001-2003 tracking resistance in the United States today surveillance studies. *Clin Infect Dis* 2005; 40(Suppl 2): S89-98.
59. Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. High rate of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 805-7.
60. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1333-41.
61. Michalopoulos AS, Tsiodras S, Rellos K, Mentzelopoulos S, Falagas ME. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 115-21.
62. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE Jr. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1279-86.
63. Barrett JF. Can biotech deliver new antibiotics? *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 498-503.
64. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 11-25.

65. Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 954-7.
66. Reis AO, Luz DA, Tognim MC, Sader HS, Gales AC. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1025-7.
67. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 183-90.
68. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.
69. Asbel LE, Levison ME. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14: 435-47.
70. Safdar N, Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonisation and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med* 2002; 136: 834-44.
71. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y *et al.* Methodological principles of case-control studies that analysed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1055-61.
72. Zavascki AP. Assessing risk factors for acquiring antimicrobial-resistant pathogens: a time for a comparative approach. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 871-2
73. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1094-8.

74. Harris AD, Smith D, Johnson JA *et al.* Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients. Clin Infect Dis 2002; 34: 340-5.
75. Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies. J Hosp Infect 2005; 59: 96-101.
76. Ozkurt Z, Ertek M, Erol S, Altoparlak U, Akcay MN. The risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the burn unit. Burns 2005; 31: 870-3.
77. Lee SC, Fung CP, Liu PY *et al.* Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 205-7.
78. Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC *et al.* Risk factors for piperacillin-tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 854-8.
79. Baddour LM, Hicks DV, Tayidi MM, *et al.* Risk factor assessment for the acquisition of fluoroquinolone-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a community-based hospital. Microb Drug Resist 1995; 1: 219-22.
80. Hsu DI, Okamoto MP, Murthy R *et al.* Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 535-41.
81. Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y *et al.* Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Hosp Infect 2004; 57: 112-8.

82. Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N *et al.* Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hosp Infect* 2004; 57: 209-16.
83. Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF *et al.* Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 670-7.
84. Ohmagari N, Hanna H, Graviss L, *et al.* Risk factors for infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cancer. *Cancer* 2005; 104: 205-12.
85. Nouer SA, Nucci M, de-Oliveira MP, Pellegrino FL, Moreira BM. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3663-7.
86. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352: 380-91.
87. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl 1): S19-45.
88. Hall BG, Barlow M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 111-23.
89. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ* 2003; 327: 1209-13.
90. Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol* 1968; 12: 423-34.
91. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; 9: 31-88.

92. Sykes RB, Matthew M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2: 115-57.
93. Mitsuashi S, Inoue M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. In: Mitsuashi S. *Beta-lactam antibiotics* 1981, p. 41-56.
94. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 259-63.
95. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
96. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321-31.
97. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 223-32.
98. Gootz TD. Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 317-27.
99. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27(Suppl 1): S48-53.
100. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-31.
101. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:939-46.

102. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and its LysR-type regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 7693-7.

103. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 755-8.

104. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, *et al.* Characterization of IMI-1 β -lactamase, a novel class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2080-6.

105. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, *et al.* SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3035-9.

106. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1151-61.

107. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 711-4.

108. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4793-9.

109. Hong T, Moland ES, Abdalhamid B, *et al.* *Escherichia coli*: development of carbapenem resistance during therapy. Clin Infect Dis 2005; 40: e84-6.

110. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2598-603.
111. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234: 209-13.
112. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 196-9.
113. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1556-61.
114. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 583-8.
115. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4741-3.
116. Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4217-25.

117. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 15-23.
118. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 202-8.
119. Dalla-Costa LM, Coelho JM, *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3403-6.
120. Sabath LD, Abraham EP. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J* 1966; 98: 11C-3C.
121. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 564-70.
122. Shannon K, King A, Phillips I. Beta-lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17: 45-50.
123. Cuchural GJ Jr, Malamy MH, Tally FP. Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 645-8.
124. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489-95.
125. Watanabe K, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147-51.

126. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 71-8.
127. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, *et al.* Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1229-35.
128. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, *et al.* Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2023-7.
129. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(Suppl 6): 2-9.
130. Lee K, Yum JH, Yong D, *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* 2005; 49: 4485-91.
131. Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M'Zali FH. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 194: 53-7.
132. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, *et al.* IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter spp.* collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710-4.
133. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, *et al.* Molecular characterization of *bla*(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 33-9.

134. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1343-8.

135. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, *et al.* Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255-8.

136. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2368-71.

137. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, *et al.* Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2014-6.

138. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, *et al.* IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-β-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003; 47: 1522-8.

139. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. Genetic characterization of a novel metallo-β-lactamase gene, bla_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY Worldwide Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob. Chemother* 2003; 52: 583-90.

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

141. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, *et al.* Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584-90.
142. Poirel L, Naas T, Nicolas D, *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-7.
143. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, *et al.* Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2224-8.
144. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4026-8.
145. Koh TH, Wang GC, Sng LH. IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2334-6.
146. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 329-32.
147. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5094-101.
148. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, *et al.* Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -

lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 474-5.

149. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleki LS, *et al.* VIM-12, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae* That Resembles a VIM-1/VIM-2 Hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5153-6.

150. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-9.

151. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654-61.

152. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1406-9.

153. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 2004; 427: 72-4.

154. Iwanaga M, Toma C, Miyazato T, Insisiengmay S, Nakasone N, Ehara M. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2364-9.

155. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 57-61.

156. 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: 40-3.
157. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2755-9.
158. Jones RN, Deshpande LM, Bell JM, *et al.* Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant Gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 289-94.
159. Kimura S, Alba J, Shioto K, *et al.* Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 458-61.
160. 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* 2005; 55: 61-70.
161. Lolans K, Queenan AM, Bush K, Sahud A, Quinn JP. First Nosocomial Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Producing an Integron-Borne Metallo- β -Lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3538-40.
162. Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 77-9.

163. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C *et al.* First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. J Clin Microbiol 2005; 43: 516-9.

164. Sader HS, Reis AO, Silbert S *et al.* IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 73-6.

165. Viana Vieira V, Lourenco da Fonseca E, Paulo Vincente AC. Metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. Clin Microbiol Infect 2005; 11:937.

166. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother 2005; URL: <http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/dki390v1>

167. Gaspareto PB. Pesquisa de genes de metalo- β -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em três hospitais universitários de Porto Alegre. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

168. Martins AF. Caracterização de metalo- β -lactamases produzidas por amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em dois hospitais de Porto Alegre. Dissertação de Mestrado 2005. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

169. Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, *et al.* Virulence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1876-8.

170. Bellais S, Mimos O, Leotard S, Jacolot A, Petitjean O, Nordmann P. Efficacy of beta-lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2032-4.
171. Giamarellou H, Antoniadou A. Antipseudomonal antibiotics. *Med Clin North Am* 2001; 85: 19-42.
172. Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, *et al*. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2006-11.
173. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1119-25.
174. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4433-9.
175. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, *et al*. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4051-5.
176. Borgmann S, Wolz C, Grobner S, *et al*. Metallo-beta-lactamase expressing multi-resistant *Acinetobacter baumannii* transmitted in the operation area. *J Hosp Infect* 2004; 57: 308-15.

177. Lee NY, Yan JJ, Lee HC, Liu KH, Huang ST, Ko WC. Clinical experiences of bacteremia caused by metallo-beta-lactamase-producing gram-negative organisms. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37: 343-9.

178. Hsueh PR, Tseng SP, Teng LJ, Ho SW. Pan-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infection at a university hospital in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 670-3.

5 PRIMEIRO ARTIGO

5.1 Versão em inglês

Formatado conforme normas do *The Lancet*

The influence of metallo- β -lactamase production on *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infections mortality: a prospective observational study

Alexandre Prehn Zavascki, Afonso Luís Barth, Ana Lúcia Saraiva Gonçalves, Juliana Fernandes Fernandez, Ana Lúcia Didonet Moro, Andreza Francisco Martins, Fabiano Ramos, Luciano Zubaran Goldani

Infectious Diseases Service, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 6690 Ipiranga Avenue (A P Zavascki MD, F Ramos); Medicine: Medical Sciences Postgraduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (A P Zavascki MD, A L Barth MD, PhD, L Z Goldani MD, PhD); Microbiology Unit, Clinical Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (A L Barth MD, PhD, A L S Gonçalves MD, A F Martins MD), School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (J F Fernandez); School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (A L D Moro); Division of Infectious Diseases, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil (L Z Goldani MD, PhD)

Correspondence to:

Alexandre Prehn Zavascki

apzavascki@terra.com.br

Summary

Background *P. aeruginosa* producing metallo- β -lactamases (MBL-PA) has been emerging worldwide severely limiting treatment options for infections by this organism. Nevertheless, clinical features and the optimal treatment for these infections remain unknown.

Methods A prospective observational study of patients with *P.aeruginosa* nosocomial infections was conducted at two teaching hospitals. A Cox proportional hazards model was performed to assess the effect of MBL production on mortality and to identify the determinants of such effect. Subgroup analysis of MBL-PA patients was also performed.

Findings 298 patients with *P. aeruginosa* infections were included. Infections by MBL-PA resulted in higher in-hospital mortality than non-MBL-PA (51.2% versus 32.1%; relative risk 1.60, 95% CI 1.20–2.12). Severe sepsis or septic shock (adjusted hazard ratio [AHR] 3.62, 95% CI 2.41–5.43), age (AHR 1.02, 95% CI 1.01–1.03) and use of appropriate therapy <72 hours (AHR 0.49, 95% CI 0.32–0.76) were significantly associated with mortality. Beginning appropriate therapy <72 hours significantly reduced mortality among MBL-PA infected patients (AHR 0.33, 95% CI 0.17–0.65).

Interpretation MBL-PA infections resulted in higher mortality rates most likely related to a higher frequency of severe sepsis and septic shock and a less frequent early institution of appropriate antimicrobial therapy for MBL-PA infections. The latter may be the only modifiable variable able to reduce mortality. Empirical treatments should be reviewed at institutions with high prevalence of MBL.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of nosocomial infections all over the world.¹ This organism is uniquely problematic because of a combination of inherent resistance to many drug classes, its ability to acquire resistance to all relevant treatments and its frequent role in severe nosocomial infections, which are associated with high mortality regardless of adequate antimicrobial therapy.¹

In recent years, the metallo- β -lactamases (MBLs) have emerged as one of the most feared resistance mechanisms because of their ability to hydrolyze virtually all β -lactams agents, including the carbapenems, and because their genes are carried on highly mobile elements.^{2,3} So far, five major clinically important groups of MBLs have been identified: IMP, VIM, SPM, GIM, and the recently described SIM.²⁻⁴ Initially limited to the Southeast Asia, MBLs have rapidly spread through Europe, followed by Latin America, especially after 2000.² Recently, MBLs have been described in North America² and Oceania,⁵ while their prevalence has continued to increase in many countries from other continents, giving the problem a worldwide dimension.⁶ The spread of these enzymes in nosocomial Gram-negative rods, notably among *P. aeruginosa*, severely limits therapeutic options for infections by these pathogens.^{2,3} Since *P. aeruginosa* usually harbours multiple resistance mechanisms, inactivating drugs potentially effective against MBL producers, the emergence of these enzymes drastically compromises the ability to effectively treat nosocomial infections by this organism, bringing us closer to the much feared 'end of antibiotics'.^{1,3}

The molecular and biochemical properties of MBLs have been extensively investigated. However, clinical features of infections caused by organisms producing these enzymes as well as the optimal therapy for these infections remain unknown.² Although two studies have compared mortality between *P. aeruginosa* producing MBL (MBL-PA) and non-MBL-PA,^{7,8} neither studies have controlled for potential confounding factors associated with mortality nor evaluated antimicrobial therapeutic options for these infections.

The aim of this study was to assess the influence of MBL production on the mortality of patients with *P. aeruginosa* nosocomial infections and to investigate which factors determine this effect. Other aims were to identify risk factors for mortality and to evaluate antimicrobial therapeutic options for MBL-PA infections.

Methods

Study design

A prospective observational study of consecutive patients with *P.aeruginosa* nosocomial infections was performed at two tertiary-care teaching hospitals in Porto Alegre, southern Brazil. The study period was from September 2004 to June 2005 at São Lucas Hospital (SLH), a 600-bed hospital, and from January to June 2005 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a 1200-bed hospital. Patients with positive cultures for *P. aeruginosa* were eligible for the study. They were excluded if they were <18 years, if they had cystic fibrosis, if *P. aeruginosa* was recovered <48 hours of hospital admission (unless the patient had been hospitalized in the last 60 days) or if they did not fulfil the CDC criteria for infections.⁹ Selected patients were followed from the first isolation of *P. aeruginosa* to discharge from hospital or death.

Data were collected from medical charts and/or hospital computer system databases, during and after the patients' hospitalization. The researchers were blinded for the MBL status of *P. aeruginosa* isolates. The ethics review boards of both hospitals have approved this study.

Microbiology, MBL identification and molecular typing

Biochemical tests which included: oxidase, oxidation of glucose on OF-medium, arginine and nitrate, growth in cetrimide agar, and production of characteristic pigments (blue and green) were used to identify *P. aeruginosa*. Susceptibility was determined by the disk-diffusion method according to NCCLS guidelines.¹⁰ The following antibiotics were tested:

amikacin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, piperacillin-tazobactam and polymyxin B. All isolates resistant to ceftazidime were screened for MBL production with ceftazidime in the presence of 2-mercaptopropionic acid as previously described.¹¹

A sample of MBL-PA was submitted to PCR for detection of the *bla*_{SPM-1} gene.¹² Those isolates without PCR amplification product for *bla*_{SPM-1} were further tested using *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} primers as detailed elsewhere.¹³

DNA macrorestriction using *Spe*I followed by PFGE was performed for molecular typing of selected isolates.¹⁴ Restriction fragment profiles were compared visually and were analysed using the Tenover criteria.¹⁵

Variables and definitions

The primary outcome was in-hospital mortality for any cause. The variable studied was MBL production. Secondary outcomes were occurrence of bacteraemia, recurrence of infection (another *P. aeruginosa* infection after successful treatment of a previous one), microbiologic response (at least one negative culture from the infection site after successful treatment of infection), length of hospital stay after infection, length of need for vasoactive drugs and length of mechanical ventilation (the latter three outcomes were assessed in survivors).

Potentially confounding variables were categorized into three groups: 1) Variables related to the patients' baseline status: age; sex; Charlson comorbidity score;¹⁶ baseline diseases, including cardiac diseases (acute myocardial infarction, unstable angina, congestive heart failure or arrhythmias), pulmonary disease (asthma, chronic obstructive pulmonary disease or pulmonary fibrosis), neurological diseases (neurovascular or other

diseases with cognitive, sensitive and/or motor impairment), solid and haematological malignancy, diabetes mellitus, AIDS, cirrhosis, and renal insufficiency (serum creatinine $>166.6 \mu\text{mol/L}$); iatrogenic immunosuppression, such as chemotherapy-induced neutropenia (neutrophile count $<1.0 \times 10^9$ cells/L), and/or receipt of corticoid drugs (prednisone $\geq 10\text{mg/daily}$ or equivalent doses) or other immunosuppressive agents for >14 days; presence of other concomitant infections (infections by other organisms at a site other than that infected by *P. aeruginosa*, excluding coagulase-negative staphylococci in a single blood culture); and previous surgical procedure during hospital stay; 2) Variables related to the infection: presentation with severe sepsis or septic shock;¹⁷ site of infection; infection by *P. aeruginosa* at more than one site (not including patients with an identified primary site and bacteraemia); polymicrobial infection (isolation of another organism from the same site of infection); and associated bacteraemia (isolation of *P. aeruginosa* from one or more blood samples); and 3) Variables related to the treatment of infections: receiving appropriate empirical therapy (defined as the administration of an antimicrobial agent to which the isolate was susceptible *in vitro* in <24 hours of sample collection); time to appropriate therapy (only for those who have not received appropriate empirical therapy: time in days from the sample collection to the first dose of appropriate therapy); surgical procedure for treatment of the infection, when it was needed; development of treatment toxicities: nephrotoxicity, hepatotoxicity, and haematotoxicity (only those which were not explained by other causes and led to interruption of treatment were considered); and treatment with antibiotic associations (treatment with more than one agent with *in vitro* susceptibility). Aminoglycosides in monotherapy were not considered appropriate treatment therapy despite of *in vitro* susceptibility.

Specific antibiotics used for the treatment of MBL-PA infections were evaluated only in the subgroup analysis. For analysis purposes, defined daily doses (DDDs) were: polymyxin B 2.0 mg/kg, aztreonam 6.0g, and piperacillin-tazobactam 13.5g.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using SPSS for Windows, Version 13.0. Bivariate analysis was performed separately for each of the variables. Relative risks (RRs) and 95% CIs were calculated for binomial variables. P values were calculated using chi-squared or Fischer exact test for categorical variables, and Student's *t*-test or the Wilcoxon rank-sum test for continuous variables.

A Cox proportional hazards model was used to assess the effect of MBL production on the incidence rate of death adjusting for potential confounders. Adjusted hazard ratios (AHRs) and 95% CIs were calculated. The model was constructed using a hierarchized framework of the variables as proposed elsewhere.¹⁸ Variables for which the p value was <0.20 in bivariate analysis were included in the model according to the following sequence: Step 1: variables related to the patients' baseline status; Step 2: variables accepted in step 1 plus those related to the infection; Step 3: variables accepted after step 2 plus those related to the treatment. A p value of 0.05 was set as the limit for acceptance or removal of the new terms in each step. MBL production was included and remained in the model independent of the p value. Survival curves were prepared with a Kaplan-Meier estimation and compared using the log rank test. All tests were two-tailed and a p value <0.05 was considered significant.

The rationale for the hierarchized approach was to assess which factors mediate the effect of MBL production on mortality. Each step shows the effect of MBL production on

mortality adjusting for the specific group of variables included in the model as well as those accepted from previous steps. Our previous hypothesis was that MBL-PA infections were significantly associated with increased mortality and, using the hierarchized approach, it would be expected that MBL production would lose its statistical significance or substantially decrease its magnitude of the effect when variables which mediate such effect were included in the model.

A bivariate analysis was done for the subgroup of patients with MBL-PA infections. Variables with a p value <0.20 were included in a Cox proportional hazards model. Another Cox model was constructed for patients who received appropriate therapy, including variables that were a priori judged clinically relevant, in order to evaluate different antibiotic agents for the treatment of MBL-PA.

Role of the funding source

The study sponsor had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

A total of 532 patients presented the isolation of *P. aeruginosa* (287 from HCPA and 245 from SLH). Two-hundred thirty-four patients were excluded due to the following criteria: age <18 years (n=86), isolate recovered <48 hours of admission (n=59), cystic fibrosis (n=52; most of them were also <18 years) and did not fulfil the CDC criteria for infection (n=37). A total of 298 patients were included in the study. Eighty-six (28.9%) patients presented infections due to MBL-PA.

The overall in-hospital mortality of patients with *P. aeruginosa* infections was 37.6% (112 of 298): 51.2% (44 of 86) for patients with MBL-PA infections and 32.1% (68 of 212) for patients with non-MBL-PA infections (RR 1.60, 95% CI 1.20–2.12, $p<0.01$). The incidence rate of death was 17.3 per 1000 patient-days among MBL-PA infected patients and 11.8 per 1000 patient-days among non-MBL-PA infected ones ($p=0.02$) (Figure 1). The characteristics of patients as well as variables related to presentation of infections and treatments according to in-hospital mortality are shown in table 1.

Table 2 presents the results of multivariable analysis. Step 1 showed that MBL production (AHR 1.49, 95% CI 1.01–2.21, $p<0.05$), higher age (AHR 1.02, 95% CI 1.01–1.03, $p<0.001$) and higher Charlson score (AHR 1.09, 95% CI 1.01–1.17, $p<0.05$) were significantly associated with death. With the inclusion of variables related to infection in the model (step 2), the effect of MBL production on mortality has lost its statistical significance (AHR 1.37, 95% CI 0.92–2.04, $p=0.12$). Severe sepsis or septic shock (AHR 3.45, 95% CI 2.27–5.25, $p<0.001$) and age (AHR 1.02, 95% CI 1.01–1.03, $p=0.01$) were significantly associated with death. In the last step, variables related to the treatment were included in the model. MBL production has remained statistically non-significant and the magnitude of its effect on mortality has substantially decreased (AHR 1.07, 95% CI 0.72–

1.60, $p=0.73$). Variables associated with in-hospital mortality in the final model were severe sepsis or septic shock (AHR 3.62, 95% CI 2.41–5.43, $p<0.001$), age (AHR 1.02, 95% CI 1.01–1.03, $p<0.01$) and initiation of appropriate antimicrobial therapy <72 hours of the onset of infection (AHR 0.49, 95% CI 0.32–0.76, $p=0.001$).

Episodes of bacteraemia were more common among MBL-PA than non-MBL-PA (24.4% versus 10.8%, respectively; RR 2.25, 95% CI 1.32–3.85, $p<0.01$). The number of cultures performed per days of hospitalization after infection ratio did not differ between the groups (median 0.48 for MBL-PA versus 0.44 for non-MBL-PA, $p=0.59$). Five (26.3%) of 19 MBL-PA patients presented microbiologic response versus 15 (39.5%) of 38 non-MBL-PA (RR 0.67, 95% CI 0.29–1.56, $p=0.49$), and 7 (8.1%) of 86 MBL-PA patients presented recurrence of infection versus 34 (16.1%) of 212 non-MBL-PA (RR 0.50, 95% CI 0.23–1.09, $p=0.10$). Among survivors, MBL-PA patients presented a significantly longer length of hospital stay (median 28 days, IQR 19–44 versus 20 days, IQR 12–35, $p<0.01$), need for vasoactive drugs therapy (median 15 days, IQR 3–20 versus 2 days, IQR 2–6, $p<0.01$), and tended to be longer on mechanical ventilation than non-MBL-PA ones (median 15 days, IQR 7–20 versus 8 days, IQR 3–12, $p=0.25$).

A subgroup analysis was performed for 86 patients with MBL-PA infections. Variables included in the Cox model were: age ($p=0.09$), Charlson score ($p=0.03$), severe sepsis or septic shock ($p<0.001$), lower respiratory tract infection ($p<0.01$) and appropriate therapy <72 hours ($p<0.05$). The variables independently associated with in-hospital mortality among MBL-PA were: appropriate therapy <72 hours (AHR 0.33, 95% CI 0.17–0.65, $p=0.001$) and severe sepsis or septic shock (AHR 4.38, 95% CI 1.99–9.65, $p<0.001$) (figure 2).

Thirty-nine of these 86 patients received appropriate antibiotic therapy (Table 3). No therapy was significantly associated with lower in-hospital mortality ($p=0.37$). Patients treated only with β -lactams had lower in-hospital mortality than patients treated with polymyxin B, although without statistical significance (30.8 versus 45.5%, respectively, RR 0.68, 95% CI 0.29–1.61, $p=0.31$). The incidences rate of death were 7.1 per 1000 patient-days and 10.3 per 1000 patient-days for those treated with β -lactams and polymyxin B, respectively ($p=0.38$). Two patients who received appropriate combination therapy with polymyxin B plus aztreonam were excluded from this latter analysis. There was also no statistically significant difference in the incidence rate of death between those treated with β -lactams and those treated with polymyxin B (AHR 0.69, 95% CI 0.22–2.13, $p=0.51$) after adjusting for severe sepsis or septic shock and appropriate therapy <72 hours. DDDs were similar among survivors and non-survivors (mean \pm standard deviation 0.90 \pm 0.31 versus 0.93 \pm 0.33, $p=0.53$).

Sixty-three antibiotic resistance profiles were identified among the isolates, but only six among the 86 MBL-PA, including: susceptibility only to polymyxin B and aztreonam (34 isolates, 39.5%), susceptibility only to polymyxin B (30, 34.9%), susceptibility to polymyxin B, aztreonam and amikacin (11, 12.7%), susceptibility to polymyxin B and piperacillin-tazobactam (7, 8.1%), susceptibility to polymyxin B, aztreonam and piperacillin-tazobactam (3, 3.8%), and susceptibility to polymyxin B and ciprofloxacin (1, 1.2%). Among non-MBL-PA the commonest antibiotic profile was susceptibility to all tested drugs (63 of 212 isolates, 29.9%). Fourteen MBL-PA from SLH were tested for the presence of MBL genes and all were positive for *bla*_{SPM-1}. Of 14 MBL-PA isolates from this hospital submitted to molecular typing, 13 (92.9%, 95% CI 66.1–99.8) were clonally

related and only one showed a distinct DNA macrorestriction profile. Ten (100%) of 10 MBL-PA from HCPA submitted to molecular typing comprised a single clone.

Discussion

The present study showed that MBL-PA infections resulted in higher mortality rates than non-MBL-PA infections. Notably, our findings suggest that this effect was partially mediated through both a more severe presentation of such infections and a less frequent early institution of appropriate therapy for MBL-PA infections.

In previous studies, the mortality was also higher among patients infected by MBL-PA.^{7,8} Hirakata and colleagues⁷ have shown that infection-related death was significantly higher among MBL-PA patients than non-MBL-PA (5·8% versus 1·2%, respectively, Odds Ratio 5·00, 95% CI 1·09–22·9). Laupland and colleagues⁸ have reported a higher case-fatality among MBL-PA patients than non-MBL-PA (25% versus 13%, RR 1·98, 95% CI 1·00–3·90). These authors have suggested an increased virulence of MBL isolates based on higher mortality rates among MBL-PA patients,^{7,8} and because MBL-PA isolates have caused more infections than non-MBL-PA.⁷ Unfortunately, both studies were importantly limited by the lack of a multivariable analysis to control for important confounders, including treatment of these patients.

Assuming that severe sepsis or septic shock could be clinical markers of an increased virulence, a potential higher virulence mediating the effect of MBL on mortality might be inferred from the fact that the inclusion of severe sepsis or septic shock in the Cox model has made MBL production statistically non-significant. In addition, patients with MBL-PA presented more episodes of bacteraemia, and MBL-PA survivors presented a significantly longer need for vasoactive drugs therapy and a trend for a longer length of mechanical ventilation.

The inappropriateness of early therapy was the major determinant of higher mortality among MBL-PA patients, because the magnitude of the effect of MBL production on mortality has substantially decreased with the inclusion of appropriate therapy <72 hours in the multivariate model (AHR 1.49 in step 1, 1.37 in step 2, and 1.07 in step 3). Moreover, despite the loss of statistical significance in step 2 of multivariate analysis, MBL production clearly tended to maintain its effect on mortality regardless the inclusion of infection-related variables (AHR 1.37, 95% CI 0.92–2.04, $p=0.12$). Both hospitals recommend cefepime or piperacillin-tazobactam, or a carbapenem if one of the former agents has already been used, as empirical therapy for suspected Gram-negative nosocomial infections. Antibiotics that are potentially active against MBL-PA, such as polymyxin B or aztreonam, are not routinely recommended, and this may explain the difficulties in early appropriateness of therapy, a crucial factor in the outcome of Gram-negative infections.^{19,20} Severe sepsis or septic shock and higher age were strongly associated with death in accordance with other studies on *P. aeruginosa* bacteremia.^{19,20}

Patients treated with β -lactam-based therapies, represented mainly by aztreonam but also by piperacillin-tazobactam, had comparable mortality rates with those treated with polymyxin B-based therapies, indicating that aztreonam, and also piperacillin-tazobactam, might be useful agents in the armamentarium against these infections, if there was *in vitro* susceptibility.

Almost all isolates were susceptible only to aztreonam and polymyxin B, although aztreonam-resistant ones were also very common, and only a few remained susceptible to ciprofloxacin and amikacin. MBL-PA isolates susceptible to piperacillin-tazobactam were detected in some isolates. This interesting finding has previously been reported in some IMP and VIM producing *P. aeruginosa*.^{21,22} We also showed that SPM-1 was the major

MBL type, although only 14 isolates were analyzed for the presence of MBL genes. The finding that almost all MBL-PA genotyped isolates comprised a single strain indicates that horizontal transmission continues to be a major determinant of the spread of MBL as previously reported.¹²

Besides the fact that only a few isolates were tested for the presence of MBL genes and submitted to molecular typing, a limitation of our study was that only 39 patients with MBL-PA infections received appropriate antimicrobial therapy, thereby limiting the study power to detect differences between treatments. In addition, this subgroup multivariable model had fewer than 10 outcome events per independent variable, potentially compromising its accuracy due to model overfitting, and its results should be parsimoniously analyzed.²³ Although small differences in susceptibility profiles can occur among distinct MBL types, MBL-PA isolates usually have similar profiles regardless of the type of enzyme. Thus, we think that these results may be generalized for organisms producing other MBL types.

In conclusion, patients with MBL-PA infections presented higher mortality than non-MBL-PA. Early appropriate antimicrobial therapy may be the only modifiable factor able to decrease mortality. Hospitals with high prevalence of MBL-PA should review empirical therapeutic approaches in order to include organisms producing these enzymes. Aztreonam and piperacillin-tazobactam seem to be effective options for the treatment of MBL-PA infections if there is *in vitro* susceptibility. Since novel therapeutics against Gram-negative rods are not a near perspective and the emergence of this resistance mechanism is a real threat for almost all available options, measures such as improved infection control policies and public health infrastructure are urgently required to control the spread of MBL-mediated resistances.

Contributors

A P Zavascki, A L Barth and L Z Goldani conceived the study. A P Zavascki wrote the first draft of the report. All authors contributed to the final draft. A P Zavascki did the analysis and A L Barth and L Z Goldani contributed to data interpretation. A L S Gonçalves and A F Martins carried out microbiology tests and prepare them for analysis. A L D Moro, J F Fernandez and F Ramos carried out the cohort follow-up, extract the data from it and prepared them for analysis.

Conflict of interest statement

All authors disclose any potential conflict of interest that could biases our work.

Acknowledgments

We are grateful to Patrick Barcelos Gaspareto, Cláudia Meirelles Leite, Larissa Lutz, Denise Pires Machado and Rodrigo Pires dos Santos for the support in microbiologic tests. This study has received financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Ministry of Education, Brazil, and Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

1. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 634–40.
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 306–25.
3. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 2005; **41**(Suppl 4): S276–78.
4. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4485–91.
5. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1549–56.
6. Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, Fritsche TR, Toleman MA, Walsh TR. Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **51**: 77–84.
7. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, Kondoh A, Matsuda J, Hirayama M, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 26–32.
8. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S, Pitout JD. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary health region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis* 2005; **192**: 1606–12.
9. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; **16**: 128–40.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Tests. NCCLS Document M100-S10. Pennsylvania, 2004.

11. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 40–43.
12. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005. *Advanced published on 20 October*.
13. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 73–76.
14. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woddford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology. Protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press Inc, 1998:33–50.
15. Tenover FC, Arbeit 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* 1995; **33**: 2233–39.
16. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; **40**: 373–83.
17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; **101**: 1644–55.
18. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* 1997; **26**: 224–27.
19. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 760–66.
20. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1306–11.

21. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou MF, Woodford N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 255–58.
22. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castaneda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5094–101.
23. Concato J, Feinstein AR, Holford TR. The risk of determining risk with multivariable models. *Ann Intern Med* 1993; **118**: 201–10.

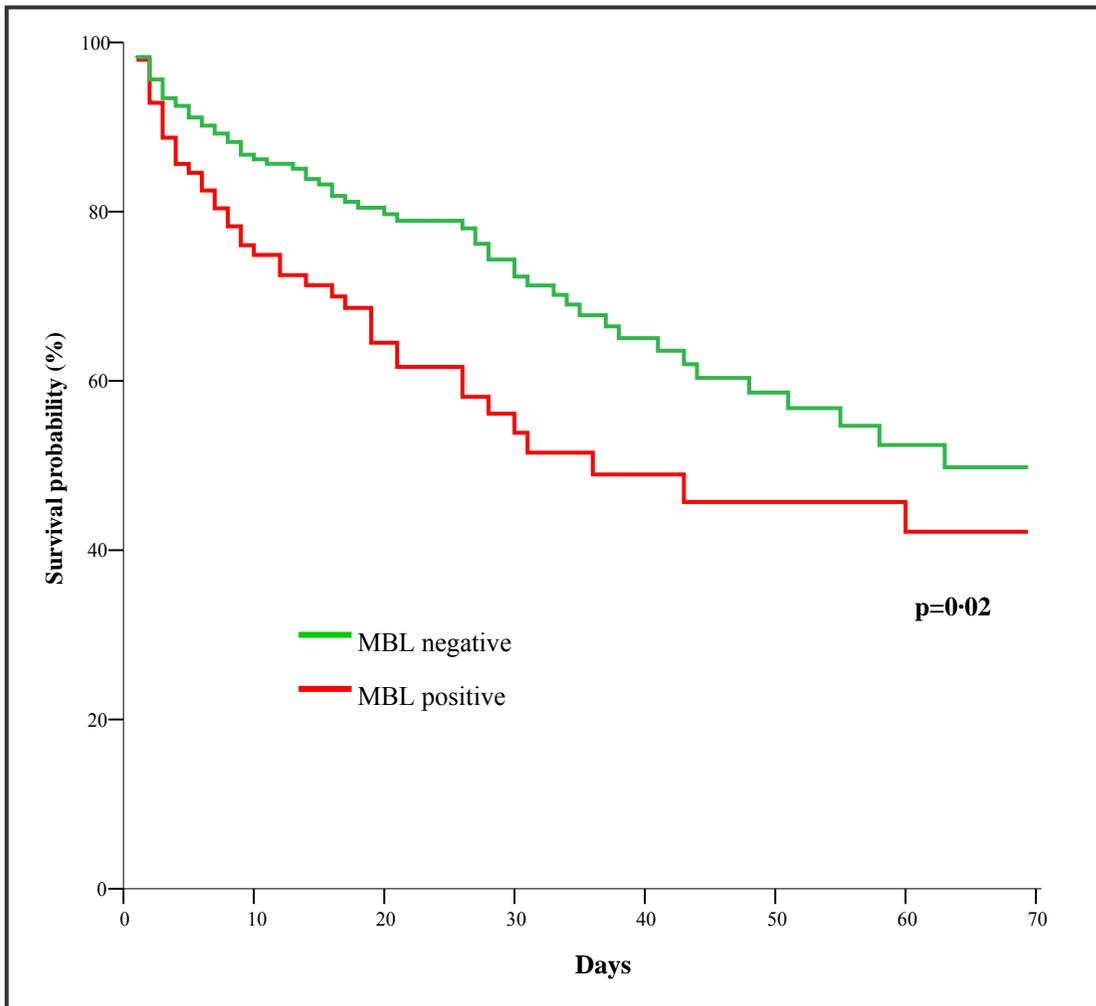


Figure 1. Survival curves of 298 patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection according metallo- β -lactamase production

Variables	Hospital mortality	
	Non-survivors n=112	Survivors n=186
Related to the patient		
Age, years*	64.4±16.6	56.6±18.0
Sex, male*	75 (67.0)	107 (57.5)
Charlson score, median (25-75% percentile)†	4 (2–6)	3 (1–5)
Comorbidities		
Neurological‡	45 (40.2)	52 (28.0)
Cardiac§	64 (57.1)	88 (47.3)
Pulmonary	40 (35.7)	53 (28.5)
Malignancy‡	33 (29.5)	32 (17.2)
Diabetes	29 (25.9)	46 (24.7)
Renal	25 (22.3)	43 (23.1)
Cirrhosis	13 (11.6)	14 (7.5)
AIDS	9 (8.2)	10 (5.4)
Iatrogenic immunosuppression	42 (37.5)	60 (32.3)
Other infections*	44 (39.3)	38 (20.4)
Previous surgery	53 (47.3)	94 (50.5)
<p>Values are number (%) or mean±standard deviation unless otherwise indicated. *p≤0.001. †p≤0.01. ‡p≤0.05. §p<0.20.</p>		

Table 1. Characteristics of 298 patients, and variables related to presentation of infections and treatments, according to in-hospital mortality

Variables	Hospital mortality	
	Non-survivors n=112	Survivors n=186
Related to the infection		
Severe sepsis or septic shock*	76 (67.9)	34 (18.3)
Site of infection		
Lower respiratory tract*	73 (65.2)	77 (41.4)
Urinary tract§	16 (14.3)	45 (24.2)
Skin and soft tissue§	13 (11.6)	34 (18.3)
Central venous catheter	6 (5.4)	17 (9.1)
Intra-abdominal	7 (6.3)	18 (9.7)
Primary bloodstream	6 (5.4)	6 (3.2)
Others	3 (2.7)	8 (4.3)
>1 site	11 (9.9)	18 (9.7)
Polymicrobial§	52 (46.4)	65 (34.9)
Bacteraemia‡	24 (21.4)	20 (10.8)
Related to the treatment		
Appropriate empirical therapy†	18 (16.1)	62 (33.3)
Time to adequacy of therapy, days‡	5.7±5.1	4.4±2.6
Antibiotic association	11 (9.8)	27 (14.5)
Surgical procedure‡	15 (13.2)	44 (23.7)
Toxicity	3 (3.2)	8 (4.9)
<p>Values are number (%) or mean±standard deviation unless otherwise indicated. *p≤0.001. †p≤0.01. ‡p≤0.05. §p<0.20.</p>		
<p>Table 1 (Cont.). Characteristics of 298 patients, and variables related to presentation of infections and treatments, according to in-hospital mortality</p>		

Variables	AHR (95% CI)	p
Step 1		
MBL production	1.49 (1.01–2.21)	<0.05
Age	1.02 (1.01–1.03)	<0.001
Charlson score	1.09 (1.01–1.17)	<0.05
Sex, male	1.23 (0.83–1.83)	0.31
Other infection	1.03 (0.69–1.53)	0.88
Step 2		
MBL production	1.37 (0.92–2.04)	0.12
Age	1.02 (1.01–1.03)	<0.01
Severe sepsis or septic shock	3.45 (2.27–5.25)	<0.001
Charlson score	1.08 (0.99–1.16)	0.06
Polymicrobial infection	1.31 (0.88–1.92)	0.18
LRT infection	1.30 (0.86–1.96)	0.21
Bacteremia	0.92 (0.57–1.48)	0.73
Step 3		
MBL production	1.07 (0.72–1.60)	0.73
Age	1.02 (1.01–1.03)	<0.01
Severe sepsis or septic shock	3.62 (2.41–5.43)	<0.001
Appropriate therapy <72 hours	0.49 (0.32–0.76)	0.001
Surgical procedure	0.69 (0.39–1.20)	0.19
AHR=adjusted hazard ratio. MBL=metallo-β-lactamase.		
Table 2. Multivariate analysis of factors associated with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nosocomial infections mortality		

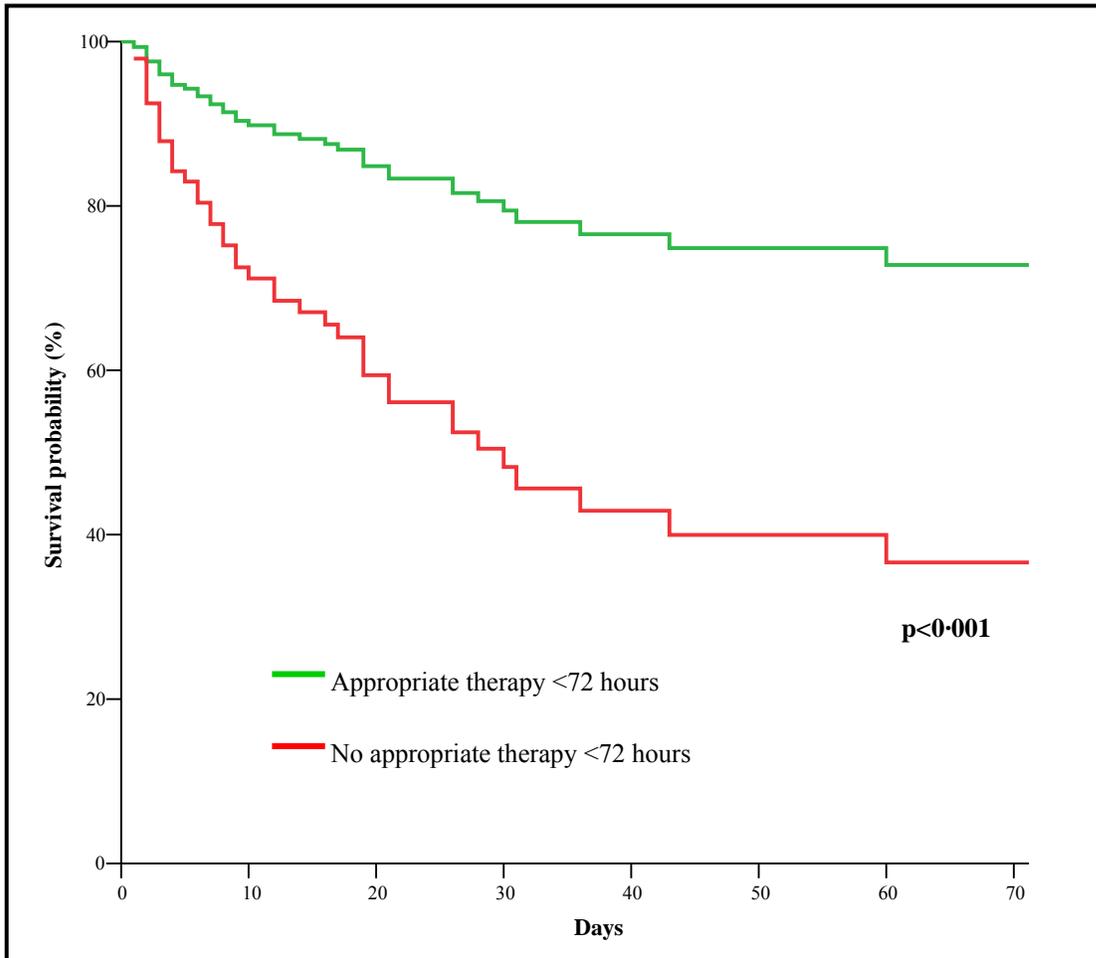


Figure 2. Estimated survival curves of 86 patients with *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase infections according appropriate therapy <72 hours, adjusted for severe sepsis or septic shock

Treatment	Total n=39 (%)	Non-survivors n=15 (%)	DDD, Mean ± SD
aztreonam	15 (38·5)	5 (33·3)	0·85±0·30
polymyxin B	6 (15·4)	4 (66·7)	0·83±0·42
piperacillin-tazobactam	7 (17·9)	3 (42·9)	1·21±0·21
polymyxin B + β-lactam without <i>in vitro</i> susceptibility	5 (12·8)	1 (20·0)	0·92±0·33
polymyxin B + aztreonam*	2 (5·1)	2 (100·0)	1·06±0·90
aztreonam + amikacin	1 (2·6)	0 (0·0)	0·5±0·00
aztreonam + another β-lactam without <i>in vitro</i> susceptibility	1 (2·6)	0 (0·0)	1·00±0·00
aztreonam + both another β-lactam + amikacin without <i>in vitro</i> susceptibility	1 (2·6)	0 (0·0)	1·00±0·00
piperacillin-tazobactam + another β-lactam without <i>in vitro</i> susceptibility	1 (2·6)	0 (0·0)	1·33±0·00

DDD=define daily dose, aztreonam=6·0g, polymyxin B=2·0mg/kg, piperacillin-tazobactam=13·5g.
SD=standard deviation. *DDD for polymyxin B.

Table 3. Antibiotic therapy and mortality of 39 patients with *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-β-lactamase infections who have received appropriate therapy

5.2 Versão em português

Influência da produção de metalo- β -lactamase na mortalidade de infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa*: um estudo prospectivo observacional

Alexandre Prehn Zavascki, Afonso Luís Barth, Ana Lúcia Saraiva Gonçalves, Juliana Fernandes Fernandez, Ana Lúcia Didonet Moro, Andreza Francisco Martins, Fabiano Ramos, Luciano Zubarán Goldani

Serviço de Infectologia, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6690 (A P Zavascki MD, F Ramos); Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (A P Zavascki MD, A L Barth MD, PhD, L Z Goldani MD, PhD); Unidade de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (A L Barth MD, PhD, A L S Gonçalves MD, A F Martins MD), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (J F Fernandez); Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (A L D Moro); Divisão de Infectologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil (L Z Goldani MD, PhD)

Correspondência para:

Alexandre Prehn Zavascki

apzavascki@terra.com.br

Resumo

Conhecimento *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase (MBL-PA) têm emergido em todo o mundo limitando gravemente as opções terapêuticas para infecções por esse organismo. Entretanto, as características clínicas e o tratamento ótimo para essas infecções permanecem desconhecidos.

Métodos Um estudo prospectivo observacional de pacientes com infecções nosocomiais por *P.aeruginosa* foi conduzido em dois hospitais universitários. Um modelo de Cox foi feito para avaliar o efeito da produção de MBL sobre a mortalidade e para identificar os determinantes desse efeito. Uma análise do subgrupo de pacientes com infecções por MBL-PA também foi realizada.

Achados 298 pacientes com infecções nosocomiais por *P. aeruginosa* foram incluídos. Infecções por MBL-PA resultaram em maior mortalidade hospitalar do que por não-MBL-PA (51,2% versus 32,1%; risco relativo 1,60, IC 95% 1,20–2,12). Sepses graves ou choque séptico (*hazard ratio* ajustado [HRA] 3,62, IC 95% 2,41–5,43), idade (HRA 1,02, IC 95% 1,01–1,03) e adequação da terapia <72 horas (HRA 0,49, IC 95% 0,32–0,76) foram significativamente associados com mortalidade. Início de terapia apropriada <72 horas reduziu significativamente a mortalidade em pacientes com MBL-PA (HRA 0,33, IC 95% 0,17–0,65).

Interpretação Infecções por MBL-PA resultaram em maiores taxas de mortalidade provavelmente devido a uma maior frequência de sepses graves e choque séptico e a uma menos frequente instituição precoce de terapia apropriada, e essa última pode ser a única variável modificável capaz de reduzir a mortalidade. Tratamentos empíricos devem ser revisados em instituições com alta prevalência de MBL.

Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares em todo o mundo.¹ Este organismo é singularmente problemático devido a uma combinação de resistência intrínseca a várias classes de drogas, a sua habilidade para adquirir resistência a todos os tratamentos antimicrobianos, e ao seu freqüente envolvimento em infecções graves, que estão usualmente associadas a elevados índices de mortalidade a despeito de terapia apropriada.¹

Nos últimos anos, as metalo- β -lactamases têm emergido como um dos mais temidos mecanismos de resistência por sua capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, e por que os genes codificadores dessas enzimas são carregados em elementos altamente móveis.^{2,3} Até o momento, cinco principais grupos de metalo- β -lactamases clinicamente relevantes foram identificados: IMP, VIM, SPM, GIM e o recentemente descrito, SIM.²⁻⁴ Inicialmente limitadas ao Sudeste Asiático, as metalo- β -lactamases rapidamente se disseminaram pela Europa, seguida pela América Latina, especialmente após o ano 2000. Recentemente, bactérias produtoras de metalo- β -lactamases foram identificadas na América do Norte² e na Oceania,⁵ enquanto a prevalência de MBL entre patógenos Gram-negativos aumenta progressivamente em países dos outros continentes, particularmente na América Latina, dando ao problema uma dimensão mundial.⁶ A disseminação deste mecanismo de resistência, notadamente em isolados de *P. aeruginosa*, limita gravemente as opções terapêuticas para infecções causadas por essas bactérias.^{2,3} Uma vez que a *P. aeruginosa* possui múltiplos mecanismos de resistência, inativando drogas potencialmente efetivas no tratamento de bactérias produtoras de metalo-

β -lactamases, a emergência desse mecanismo de resistência compromete drasticamente a capacidade de tratar infecções nosocomiais por esse organismo, nos deixando realmente próximos da chamada “era pós-antibiótica”.^{1,3}

As propriedades bioquímicas e moleculares das metalo- β -lactamases têm sido extensamente investigadas. Entretanto, as características clínicas dessas infecções, seus desfechos, assim como o tratamento ótimo para elas, não são conhecidos.² Apesar de dois estudos terem comparado a mortalidade de pacientes com infecções por *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase (MBL-PA) e não-produtoras (não-MBL-PA), nenhum deles apresentou controle para diversas variáveis potencialmente confundidoras, assim como não avaliaram a terapia antimicrobiana para o tratamento dessas infecções.^{7,8}

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da produção de metalo- β -lactamases na mortalidade de pacientes com infecções nosocomiais por *P. aeruginosa*, e identificar que fatores são mediadores desse efeito. Outros objetivos foram identificar fatores associados à mortalidade em pacientes com infecções por PA-MBL (MBL-PA) e avaliar a terapia antimicrobiana para essas infecções.

Métodos

Delineamento do Estudo

Um estudo prospectivo observacional de pacientes com infecções nosocomiais por *P.aeruginosa* selecionados consecutivamente foi realizado em dois hospitais terciários de ensino em Porto Alegre, sul do Brasil. O período de estudo foi de setembro de 2004 a junho de 2005, no Hospital São Lucas (HSL), um hospital de 600 leitos, e de janeiro até junho de 2005 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), um hospital de 1200 leitos. Pacientes com culturas positivas para *P. aeruginosa* foram elegíveis para o estudo. Foram excluídos pacientes com <18 anos de idade, com fibrose cística, que tiveram isolamento de *P. aeruginosa* <48 horas de hospitalização (a menos que o paciente apresentasse hospitalização nos últimos 60 dias), ou que não preenchessem os critérios do CDC para infecções.⁹ Pacientes selecionados foram acompanhados desde o primeiro isolamento de *P. aeruginosa* até a alta hospitalar ou óbito.

Os dados foram coletados de prontuários médicos e/ou bancos de dados de sistemas computacionais hospitalares, durante e após a hospitalização dos pacientes. Os pesquisadores estavam cegados para a situação de MBL dos isolados de *P. aeruginosa*. Os comitês de ética de ambos os hospitais aprovaram esse estudo.

Microbiologia, identificação da MBL e tipagem molecular

Testes bioquímicos que incluíram: oxidase, oxidação de glicose em meio - OF, arginina e nitrato, crescimento em ágar, e produção de pigmentos característicos (azul e verde), foram usados para identificação bacteriana. A sensibilidade foi determinada pelo método de disco

de difusão segundo as diretrizes do NCCLS.¹⁰ Foram testados os seguintes antibióticos: amicacina, aztreonam, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam e polimixina B. Todos os isolados resistentes para ceftazidima foram examinados para a produção de MBL com ceftazidima na presença de ácido 2-mercaptopropiônico.¹¹

Uma amostra de MBL-PA foi submetida a PCR para detecção do gene *bla*_{SPM-1}.¹² Aqueles que não apresentaram produto de amplificação de PCR para *bla*_{SPM-1} foram ainda testados usando *primers* de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}, conforme previamente descrito.¹³

Macrorestrição de DNA usando *SpeI* seguida de PFGE foi realizada para tipagem molecular de isolados selecionados.¹⁴ Perfis de restrição foram comparados visualmente e foram analisados usando os critérios de Tenover.¹⁵

Variáveis e definições

O desfecho primário foi mortalidade hospitalar por qualquer causa. A variável estudada foi a produção de MBL. Os desfechos secundários foram episódios de bacteremia, recorrência da infecção (outra infecção por *P. aeruginosa* após o tratamento bem sucedido de uma infecção anterior), resposta microbiológica (pelo menos uma cultura negativa do sítio de infecção após o tratamento bem sucedido de infecção), tempo de internação hospitalar após infecção, tempo necessário de uso de drogas vasoativas e tempo de ventilação mecânica (estes últimos três desfechos foram avaliados nos sobreviventes).

Potenciais variáveis de confusão foram categorizadas em três grupos: 1) Variáveis relacionadas à situação basal dos pacientes: idade, sexo; escore de comorbidade de Charlson;¹⁶ doenças de base, incluindo cardiopatias (infarto agudo do miocárdio, angina instável, insuficiência cardíaca congestiva ou arritmias), doenças pulmonares (asma, doença

pulmonar obstrutiva crônica ou fibrose pulmonar), doenças neurológicas (doenças neurovasculares ou outras patologias com prejuízo cognitivo, sensitivo e/ou motor), doença neoplásica maligna sólida e hematológica, diabetes, Aids, cirrose e insuficiência renal (creatinina sérica $>166,6 \mu\text{mol/L}$); imunossupressão iatrogênica, como neutropenia induzida por quimioterápicos (contagem de neutrófilos $<1,0 \times 10^9$ células/L), e/ou uso de corticoesteróides (prednisona $\geq 10\text{mg/dia}$ ou doses equivalentes) ou outros agentes imunossupressores durante >14 dias; presença de outras infecções concomitantes (infecções por outros organismos em sítio outro que o infectado por *P. aeruginosa*, excluindo estafilococos coagulase-negativos em uma única cultura de sangue); e procedimento cirúrgico prévio durante a hospitalização; 2) Variáveis relacionadas à infecção: apresentação com sepse grave ou choque séptico;¹⁷ sítio de infecção; infecção por *P. aeruginosa* em mais de um sítio (não incluindo pacientes com sítio primário identificado e bacteremia); infecção polimicrobiana (isolamento de outro organismo do mesmo sítio de infecção por *P. aeruginosa*); e bacteremia associada (isolamento de *P. aeruginosa* de uma ou mais amostras de sangue); e 3) Variáveis relacionadas ao tratamento de infecções: recebimento de terapia empírica apropriada (definida como a administração de um agente antimicrobiano que o isolado fosse sensível *in vitro* em <24 horas da coleta da amostra); tempo até a adequação da terapia (somente nos que não receberam terapia empírica apropriada: tempo em dias desde a coleta da amostra até a primeira dose de tratamento apropriado); procedimento cirúrgico para o tratamento da infecção, quando houvesse necessidade; desenvolvimento de toxicidades relacionadas ao tratamento; nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e hematotoxicidade (foram consideradas apenas aquelas que não eram explicadas por outras causas e determinaram a interrupção do tratamento); e tratamento com associações de antibióticos (tratamento com mais de uma agente com sensibilidade *in*

vitro). Aminoglicosídeos em monoterapia não foram considerados tratamento empírico apropriado, mesmo com sensibilidade *in vitro*. Antibióticos específicos usados para o tratamento de infecções por MBL-PA foram avaliados apenas na análise de subgrupo. Para fins de análise, as doses diárias definidas (DDD) dos antibióticos foram: polimixina B 2,0 mg/kg, aztreonam 6,0g, e piperacilina-tazobactam 13,5g.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando SPSS para Windows, Versão 13.0. Análise bivariada foi realizada separadamente para cada uma das variáveis. Riscos relativos (RRs) e IC 95% foram calculados para variáveis binomiais. Valores de p foram calculados usando o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer para variáveis categóricas, e o teste *t* de Student ou de Wilcoxon-Mann-Whitney para variáveis contínuas.

Um modelo de Cox foi usado para avaliar o efeito da produção de MBL sobre a taxa de incidência de óbitos, ajustando para potenciais variáveis de confusão. *Hazard ratios* ajustados (HRAs) e IC 95% foram calculados. O modelo foi construído usando uma estrutura hierarquizada das variáveis conforme proposto previamente.¹⁸ Variáveis para as quais o valor de p foi <0,20 na análise bivariada foram incluídas no modelo conforme a seqüência a seguir: Passo 1: variáveis relacionadas à condição basal dos pacientes; Passo 2: variáveis aceitas no passo 1, mais aquelas relacionadas à infecção; Passo 3: variáveis aceitas após o passo 2, mais aquelas relacionadas ao tratamento. Um valor p de 0,05 foi estabelecido como o limite para o aceite ou remoção de novos termos em cada passo. A produção de MBL foi incluída e permaneceu no modelo independente do valor p. Foram preparadas curvas de sobrevida com a estimativa de Kaplan-Meier e comparadas usando-se

o teste *log rank*. Todos os testes foram bicaudais e um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A justificativa para a abordagem hierarquizada foi avaliar que fatores mediarão um potencial efeito da produção de MBL na mortalidade. Cada passo mostra o efeito da produção de MBL na mortalidade, ajustado para o grupo específico de variáveis incluídas no modelo, bem como aqueles aceitos de passos anteriores. A nossa hipótese prévia era de que infecções por MBL-PA estavam significativamente associadas a maior mortalidade, e usando a abordagem hierarquizada, espera-se que a produção de MBL perdesse a sua significância estatística ou diminuísse substancialmente a sua magnitude de efeito quando as variáveis que intermedeiam tal efeito fossem incluídas no modelo.

Uma análise bivariada foi feita para o subgrupo de pacientes com infecções de MBL-PA. Variáveis com um valor p de $< 0,20$ foram incluídas em um modelo de Cox. A fim de avaliar diferentes agentes antibióticos no tratamento de MBL-PA, um outro modelo de Cox foi construído para os pacientes que receberam terapia apropriada, incluindo variáveis que foram consideradas *a priori* clinicamente relevantes.

O papel da fonte financiadora

Os financiadores do estudo não desempenharam qualquer papel no delineamento do estudo, coleta de dados, interpretação de dados ou redação do artigo. O autor correspondente teve pleno acesso a todos os dados no estudo, e teve a responsabilidade final pela decisão de submeter o estudo à publicação.

Resultados

P. aeruginosa foi isolada em um total de 532 pacientes (287 do HCPA e 245 do HSL). Duzentos e trinta e quatro pacientes foram excluídos devido aos seguintes critérios: idade <18 anos (n=86), isolado <48 horas de hospitalização (n=59), fibrose cística (n=52; a maioria desses também era <18 anos) e não preenchimento dos critérios do CDC para infecção (n=37). Um total de 298 pacientes foram incluídos no estudo. Oitenta e seis (28,9%) pacientes apresentaram infecções causadas por MBL-PA.

A mortalidade total de pacientes com infecções por *P. aeruginosa* foi de 37,6% (112 de 298): 51,2% (44 de 86) para pacientes com infecção por MBL-PA e 32,1% (68 de 212) para pacientes com infecções por não-MBL-PA (RR 1,60, IC 95% 1,20–2,12, $p<0,01$). A taxa de incidência de óbitos foi de 17,3 por 1000 pacientes-dia entre pacientes com infecções por MBL-PA, e 11,8 por 1000 pacientes-dia entre aqueles com infecções por não-MBL-PA ($p=0,02$) (Figura 1). As características dos pacientes, bem como variáveis relacionadas à apresentação das infecções e tratamentos, conforme a mortalidade hospitalar são mostradas na tabela 1.

A tabela 2 apresenta os resultados da análise multivariada. O Passo 1 mostrou que a produção de MBL (HRA 1,49, IC 95% 1,01–2,21, $p<0,05$), idade (HRA 1,02, IC 95% 1,01–1,03, $p<0,001$) e escore Charlson mais elevado (HRA 1,09, IC 95% 1,01–1,17, $p<0,05$) foram significativamente associados à mortalidade. Com a introdução no modelo de variáveis relacionadas à infecção (Passo 2), o efeito da produção de MBL na mortalidade perdeu a sua significância estatística (HRA 1,37, IC 95% 0,92–2,04, $p=0,12$). Sepses grave ou choque séptico (HRA 3,45, IC 95% 2,27–5,25, $p<0,001$) e idade (HRA 1,02, IC 95% 1,01–1,03, $p=0,01$), foram significativamente associados à mortalidade. No

último passo, variáveis relacionadas ao tratamento foram incluídas no modelo. A produção de MBL permaneceu estatisticamente não-significativa e a magnitude do seu efeito na mortalidade diminuiu importantemente (HRA 1,07, IC 95% 0,72–1,60, $p=0,73$). Variáveis associadas à mortalidade hospitalar no modelo final foram sepse grave ou choque séptico (HRA 3,62, IC 95% 2,41–5,43, $p<0,001$), idade (HRA 1,02, IC 95% 1,01–1,03, $p<0,01$) e início da terapia apropriada <72 horas (HRA 0,49, IC 95% 0,32–0,76, $p=0,001$).

Episódios de bacteremia foram mais comuns entre as MBL-PA do que não-MBL-PA (24,4% versus 10,8%, respectivamente; RR 2,25, IC 95% 1,32–3,85). A razão do número de culturas por dias de hospitalização após a infecção não foi diferente entre os grupos (média 0,48 para MBL-PA versus 0,44 para não-MBL-PA, $p=0,59$). Cinco (26,3%) de 19 pacientes com MBL-PA tiveram resposta microbiológica versus 15 (39,5%) de 38 pacientes não-MBL-PA (RR 0,67, IC 95% 0,29–1,56, $p=0,49$), e 7 (8,1%) de 86 pacientes MBL-PA apresentaram recidiva da infecção versus 34 (16,1%) de 212 não-MBL-PA (RR 0,50, IC 95% 0,23–1,09, $p=0,10$). Entre os sobreviventes, pacientes com MBL-PA apresentaram um tempo de internação hospitalar significativamente maior (mediana 28 dias, AIQ 19–44 versus 20 dias, AIQ 12–35, $p<0,01$), mais longo período de necessidade de tratamento com drogas vasoativas (mediana 15 dias, AIQ 3–20 versus 2 dias, AIQ 2–6, $p<0,01$), e tenderam a um maior tempo de ventilação mecânica (mediana 15 dias, AIQ 7–20 versus 8 dias, AIQ 3–12, $p=0,25$).

Uma análise de subgrupo foi realizada para 86 pacientes com infecções por MBL-PA. As variáveis incluídas no modelo de Cox foram: idade ($p=0,09$), escore de Charlson ($p=0,03$), sepse grave ou choque séptico ($p<0,001$), infecção do trato respiratório inferior ($p<0,01$) e terapia apropriada <72 horas ($p<0,05$). As variáveis independentemente associadas com mortalidade hospitalar entre as MBL-PA foram: terapia apropriada <72

horas (HRA 0,33, IC 95% 0,17–0,65, $p=0,001$) e sepse grave ou choque séptico (HRA 4,38, IC 95% 1,99–9,65, $p<0,001$) (figura 2).

Desses 86 pacientes, 39 receberam antibioticoterapia adequada (Tabela 3). Nenhuma terapia foi associada significativamente com mortalidade hospitalar ($p=0,37$). Pacientes tratados somente com β -lactâmicos apresentaram menor mortalidade hospitalar comparados com aqueles tratados com polimixina B embora sem significância estatística (30,8 versus 45,5%, respectivamente; RR 0,68, IC 95% 0,29–1,61, $p=0,31$). As taxas de incidência de óbitos foram 7,1 por 1000 pacientes-dia e 10,3 por 1000 pacientes-dia para os tratados com β -lactâmicos e com polimixina B, respectivamente ($p=0,38$). Dois pacientes que receberam terapia combinada com aztreonam e polimixina B apropriada foram excluídos dessa última análise. Após ajuste para sepse grave ou choque séptico e terapia apropriada <72 horas, também não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de incidência de óbitos entre os tratados com β -lactâmicos e com polimixina B (HRA 0,69, IC 95% 0,22–2,13, $p=0,51$). DDDs foram similares entre sobreviventes e não-sobreviventes (média \pm desvio padrão 0,90 \pm 0,31 versus 0,93 \pm 0,33, $p=0,53$).

Sessenta e três perfis de resistência aos antibióticos foram identificados entre os isolados, mas apenas seis entre os 86 isolados de MBL-PA incluindo: sensibilidade somente a polimixina B e aztreonam (34 isolados, 39,5%); sensibilidade somente a polimixina B (30, 34,9%); sensibilidade a polimixina B, aztreonam e amicacina (11, 12,7%) sensibilidade a polimixina B e piperacilina-tazobactam (7, 8,1%); sensibilidade a polimixina B, aztreonam e piperacilina-tazobactam (3, 3,8%), e sensibilidade a polimixina B e ciprofloxacino (1, 1,2%). Entre as não-MBL-PA, o perfil mais comum foi sensibilidade a todas as drogas testadas (63 de 212 isolados, 29,9%). Quatorze MBL-PA do HSL foram testados para a presença de genes de MBL e todos foram positivos para *bla*_{SPM-1}. De 14

isolados de MBL-PA desse hospital submetidos à tipagem molecular, 13 (92,9%, IC 95% 66,1–99,8) pertenciam ao mesmo clone e somente um apresentou um perfil de macrorestrição distinto. Dez (100%) de 10 MBL-PA do HCPA submetidos à tipagem molecular formavam um único clone.

Discussão

O presente estudo mostrou que as infecções por MBL-PA resultaram em taxas de mortalidade mais elevadas do que infecções por não-MBL-PA. É digno de nota que os nossos achados sugerem que esse efeito foi parcialmente mediado tanto por uma apresentação mais grave de tais infecções como por uma menos freqüente adequação precoce da terapia para as infecções por MBL-PA.

Em estudos comparativos anteriores, a mortalidade também foi mais elevada entre pacientes infectados por MBL-PA.^{7,8} Hirakata e colegas⁷ demonstraram que o número de óbitos relacionados à infecção foi significativamente mais elevado nos pacientes com MBL-PA do que nos com não-MBL-PA (5,8% versus 1,2%, respectivamente; *Odds ratio* 5,00, IC 95% 1,09–22,9). Laupland e colaboradores⁸ também relataram um número maior óbitos relacionados nos pacientes MBL-PA do que nos pacientes não-MBL-PA (25% versus 13%; RR 1,98, IC 95% 1,00–3,90). Esses estudos sugeriram uma maior virulência dos isolados produtores de MBL baseados nas maiores taxas de mortalidade dos pacientes com MBL-PA,^{7,8} e porque os isolados de MBL-PA causaram mais infecções que os não-MBL-PA.⁷ Infelizmente, ambos os estudos foram limitados pela ausência de uma análise multivariada para controle de importantes confundidores, inclusive o tratamento desses pacientes.

Assumindo que sepse grave e choque séptico pudessem ser marcadores clínicos de maior virulência, uma potencial maior virulência mediando o efeito da produção de MBL sobre a mortalidade poderia ser inferida a partir do fato de que a inclusão de sepse grave ou choque séptico no modelo de Cox, tornou a produção de MBL estatisticamente não

significativa. Além disso, os pacientes com MBL-PA apresentaram mais episódios de bacteremia, e os sobreviventes com MBL-PA apresentaram uma duração significativamente maior de tratamento com drogas vasoativas e uma tendência a maior tempo de ventilação mecânica.

A inadequação da terapia precoce foi o principal determinante da maior mortalidade dos pacientes com MBL-PA, porque a magnitude do efeito da produção de MBL sobre a mortalidade diminuiu substancialmente com a inclusão da terapia apropriada <72 horas no modelo de análise multivariada (HRA 1,49 no passo 1, HRA 1,37 no passo 2, e HRA 1,07 no passo 3). Além disso, apesar da perda da significância estatística no passo 2 da análise multivariada, a produção de MBL claramente tendeu a manter o seu efeito sobre a mortalidade, a despeito da inclusão das variáveis relacionadas à infecção (HRA 1,37, IC 95% 0,92–2,04, $p=0,12$). Ambos os hospitais recomendam cefepima ou piperacilina-tazobactam, ou um carbapenêmico se um dos agentes mencionados antes já tiver sido usado, como terapia empírica para infecções nosocomiais com possível participação de Gram-negativos. Antibióticos potencialmente ativos contra MBL-PA, tais como polimixina B ou aztreonam, não são recomendados de rotina, e isso poderia explicar as dificuldades na adequação precoce do tratamento, um fator crucial para o desfecho de infecções por bacilos Gram-negativos.^{19,20} Sepses graves ou choque séptico e idade foram fortemente associadas à mortalidade, em acordo com estudos prévios sobre bacteremia por *P. aeruginosa*.^{19,20}

Pacientes tratados com esquemas contendo β -lactâmicos, representados sobretudo por aztreonam, mas também por piperacilina-tazobactam, apresentaram taxas de mortalidade comparáveis a dos pacientes com tratamento baseado em polimixina B, indicando que aztreonam, e também piperacilina-tazobactam, poderiam ser agentes úteis no armamentário contra essas infecções, desde que esteja assegurada a sensibilidade *in vitro*.

Quase todos os isolados foram sensíveis apenas a aztreonam e polimixina B, embora a resistência a aztreonam também fosse muito comum, e apenas alguns continuaram sensíveis a ciprofloxacino e amicacina. Isolados de MBL-PA sensíveis a piperacilina-tazobactam foram encontrados. Esse achado interessante foi anteriormente relatado em algumas *P. aeruginosa* produtoras de IMP e VIM.^{21,22} Nós também demonstramos que a SPM-1 foi o principal tipo de MBL, embora somente 14 isolados terem sido testados para a presença de genes de MBL. O achado de quase todos os isolados genotipados pertencerem a um único clone demonstra que a transmissão horizontal continua a ser um determinante importante da disseminação das MBLs conforme previamente relatado.¹²

Além do fato de que somente poucos isolados foram testados para a presença de genes de MBL e genotipados, uma limitação do nosso estudo foi que apenas 39 pacientes com infecções por MBL-PA receberam terapia antimicrobiana adequada, dessa forma limitando o poder do estudo de detectar diferenças entre os tratamentos. Além disso, no modelo de análise multivariada deste subgrupo havia menos de 10 eventos de desfecho por variável independente, potencialmente comprometendo a sua exatidão devido a um *overfitting* do modelo,²³ e seus resultados devem ser analisados parcimoniosamente. Embora pequenas diferenças em perfis de sensibilidade possam ocorrer entre diferentes tipos de MBL, os isolados de MBL-PA geralmente têm perfis semelhantes, independente do tipo de enzima. Assim, acreditamos que esses resultados podem ser generalizados para organismos que produzem outros tipos de MBL.

Em conclusão, pacientes com infecções por MBL-PA apresentaram mortalidade maior do que os não-MBL-PA. Antibioticoterapia apropriada precoce pode ser o único fator modificável capaz de diminuir a mortalidade. Hospitais com uma alta prevalência de MBL-PA deveriam revisar as abordagens terapêuticas empíricas de modo a incluir organismos

produtores dessas enzimas. Aztreonam e piperacilina-tazobactam parecem ser opções efetivas para o tratamento de infecções de MBL-PA, se houver sensibilidade *in vitro*. Como novas terapias contra bacilos Gram-negativos não são uma perspectiva próxima e a emergência desse mecanismo de resistência é uma ameaça real para quase todas as opções disponíveis, medidas tais como melhores políticas de controle de infecção e infra-estrutura de saúde pública são urgentemente necessárias para controlar a disseminação de resistências mediadas por MBL.

Contribuições

A P Zavascki, A L Barth e L Z Goldani planejaram o estudo. A P Zavascki escreveu a primeira versão do artigo. Todos os autores contribuíram para a versão final do artigo. A P Zavascki realizou a análise estatística, e A L Barth e L Z Goldani contribuíram para a interpretação dos dados. A L S Gonçalves e A F Martins, realizaram os testes microbiológicos e prepararam os dados para a análise. A L Didonet Moro, J F Fernandez e F Ramos realizaram o seguimento da coorte, extraíram os dados e os prepararam para a análise.

Declaração de conflito de interesses

Todos os autores descartam qualquer potencial conflito de interesse que pudesse ter enviesado os resultados do nosso trabalho.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Patrick Barcelos Gaspareto, Cláudia Meirelles Leite, Larissa Lutz, Denise Pires Machado e Rodrigo Pires dos Santos pelo apoio em testes microbiológicos. Este estudo recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Ministério da Educação, Brasil, e da Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Referências

1. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 634–40.
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 306–25.
3. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 2005; **41**(Suppl 4): S276–78.
4. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4485–91.
5. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1549–56.
6. Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, Fritsche TR, Toleman MA, Walsh TR. Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **51**: 77–84.
7. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, Kondoh A, Matsuda J, Hirayama M, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 26–32.
8. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, Elsayed S, Pitout JD. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary health region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis* 2005; **192**: 1606–12.
9. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; **16**: 128–40.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Tests. NCCLS Document M100-S10. Pennsylvania, 2004.

11. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 40–43.
12. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005; *Advanced published on 20 October*.
13. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 73–76.
14. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woddford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology. Protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press Inc, 1998:33–50.
15. Tenover FC, Arbeit 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* 1995; **33**: 2233–39.
16. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; **40**: 373–83.
17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; **101**: 1644–55.
18. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* 1997; **26**: 224–27.
19. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 760–66.
20. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1306–11.

21. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou MF, Woodford N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 255–58.
22. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castaneda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5094–101.
23. Concato J, Feinstein AR, Holford TR. The risk of determining risk with multivariable models. *Ann Intern Med* 1993; **118**: 201–10.

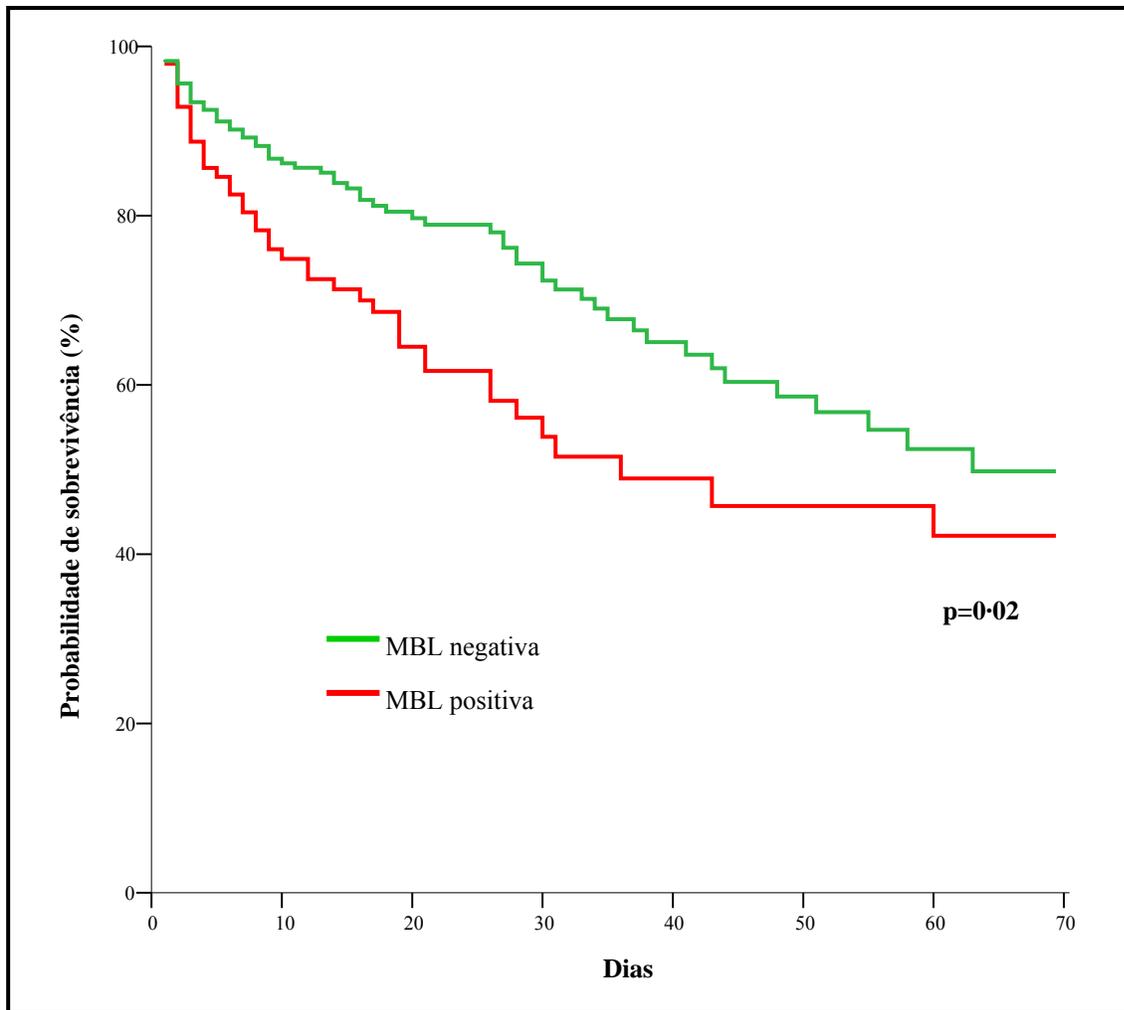


Figura 1. Curvas de sobrevivência de 298 pacientes com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com a produção de metalo- β -lactamase (MBL)

Variáveis	Mortalidade hospitalar	
	Não-sobreviventes n=112	Sobreviventes n=186
Relacionadas ao <i>status</i> basal do paciente		
Idade, anos*	64,4±16,6	56,6±18,0
Sexo, masculino*	75 (67,0)	107 (57,5)
Escore de Charlson, mediana (percentil 25–75%)†	4 (2–6)	3 (1–5)
Comorbidades		
Neurológica‡	45 (40,2)	52 (28,0)
Cardíaca§	64 (57,1)	88 (47,3)
Pulmonar	40 (35,7)	53 (28,5)
Neoplasia maligna‡	33 (29,5)	32 (17,2)
Diabetes	29 (25,9)	46 (24,7)
Renal	25 (22,3)	43 (23,1)
Cirrose	13 (11,6)	14 (7,5)
Aids	9 (8,2)	10 (5,4)
Imunossupressão iatrogênica	42 (37,5)	60 (32,3)
Outras infecções*	44 (39,3)	38 (20,4)
Cirurgia prévia	53 (47,3)	94 (50,5)
Valores são número (%) ou média±desvio padrão a menos que indicado de outra forma. *p≤0,001. †p≤0,01. ‡p≤0,05. §p<0,20.		

Tabela 1. Características dos 298 pacientes, e variáveis relacionadas à apresentação das infecções e tratamento, de acordo com a mortalidade hospitalar

Variáveis	Mortalidade hospitalar	
	Não-sobreviventes	Sobreviventes
	n=112	n=186
Relacionadas à infecção		
Sepse grave ou choque séptico*	76 (67,9)	34 (18,3)
Sítio de infecção		
Trato respiratório inferior*	73 (65,2)	77 (41,4)
Trato urinário§	16 (14,3)	45 (24,2)
Pele e tecidos moles§	13 (11,6)	34 (18,3)
Cateter venoso central	6 (5,4)	17 (9,1)
Intra-abdominal	7 (6,3)	18 (9,7)
Primário de corrente sanguínea	6 (5,4)	6 (3,2)
Outros	3 (2,7)	8 (4,3)
>1 site	11 (9,9)	18 (9,7)
Polimicrobiana§	52 (46,4)	65 (34,9)
Bacteremia‡	24 (21,4)	20 (10,8)
Relacionadas ao tratamento		
Terapia empírica apropriada†	18 (16,1)	62 (33,3)
Tempo de adequação da terapia, dias§	5,7±5,1	4,4±2,6
Associação de antibióticos	11 (9,8)	27 (14,5)
Procedimento cirúrgico‡	15 (13,2)	44 (23,7)
Toxicidade	3 (3,2)	8 (4,9)
Valores são número (%) ou média±desvio padrão a menos que indicado de outra forma. *p≤0,001.		
†p≤0,01. ‡p≤0,05. §p<0,20.		
Tabela 1 (Cont.). Características dos 298 pacientes, e variáveis relacionadas à apresentação das infecções e tratamento, de acordo com a mortalidade hospitalar		

Variáveis	HRA (IC 95%)	p
Passo 1		
Produção de MBL	1,49 (1,01–2,21)	<0,05
Idade	1,02 (1,01–1,03)	<0,001
Escore de Charlson	1,09 (1,01–1,17)	<0,05
Sexo, masculino	1,23 (0,83–1,83)	0,31
Outras infecções	1,03 (0,69–1,53)	0,88
Passo 2		
Produção de MBL	1,37 (0,92–2,04)	0,12
Idade	1,02 (1,01–1,03)	<0,01
Sepse grave e choque séptico	3,45 (2,27–5,25)	<0,001
Charlson score	1,08 (0,99–1,16)	0,06
Polymicrobial infection	1,31 (0,88–1,92)	0,18
Lower respiratory tract infection	1,30 (0,86–1,96)	0,21
Bacteremia	0,92 (0,57–1,48)	0,73
Passo 3		
Produção de MBL	1,07 (0,72–1,60)	0,73
Idade	1,02 (1,01–1,03)	<0,01
Sepse grave ou choque séptico	3,62 (2,41–5,43)	<0,001
Terapia apropriada < 72 horas	0,49 (0,32–0,76)	0,001
Procedimento cirúrgico	0,69 (0,39–1,20)	0,19
HRA= <i>hazard ratio</i> ajustado. MBL= Metalo-β-lactamase.		

Tabela 2. Análise multivariada dos fatores associados com mortalidade de infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa*

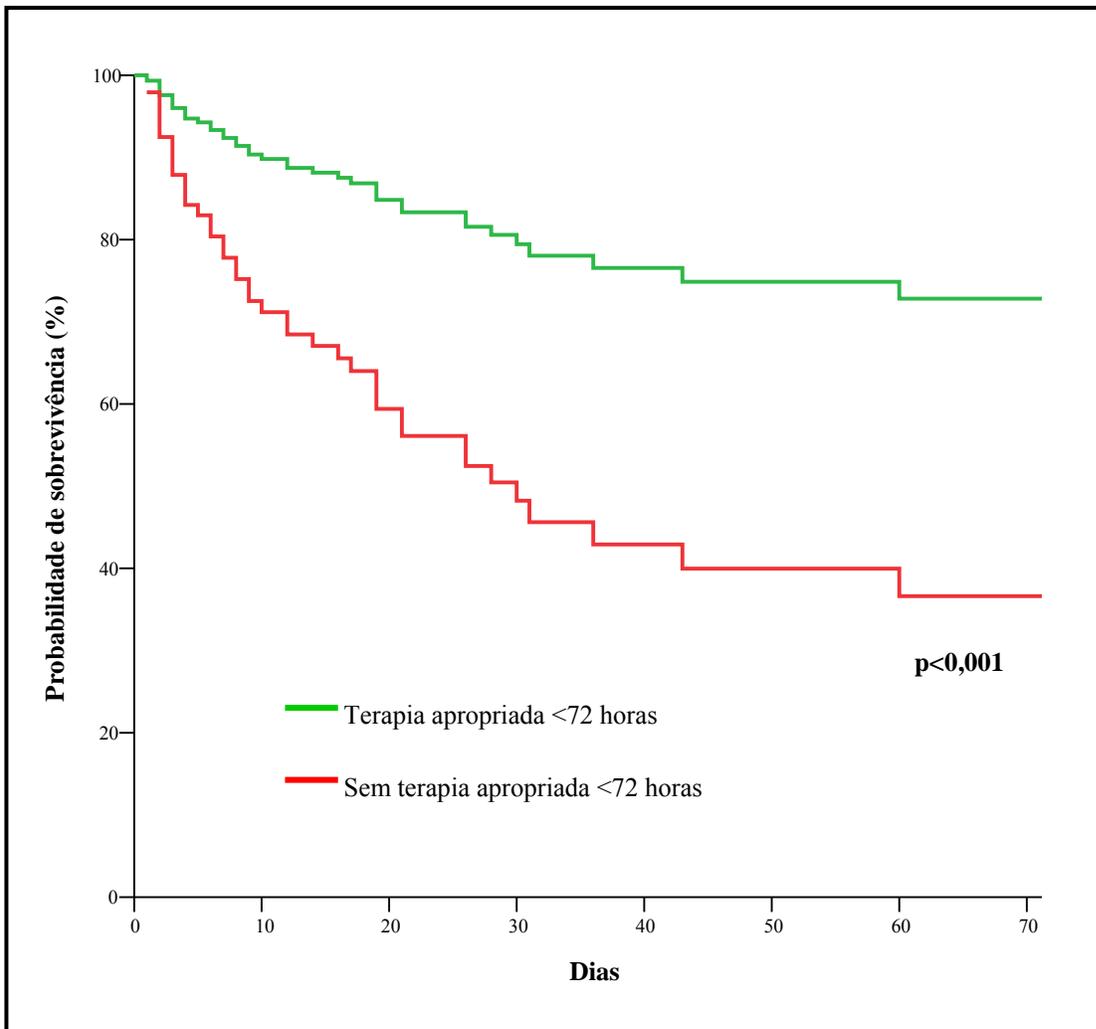


Figura 2. Curvas de sobrevivência estimadas de 86 pacientes com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase conforme terapia apropriada <72 horas, ajustado para sepse grave ou choque séptico.

Tratamento	Total n=39 (%)	Óbitos n=15 (%)	DDD, Média ± DP
aztreonam	15 (38,5)	5 (33,3)	0,85±0,30
polimixina B	6 (15,4)	4 (66,7)	0,83±0,42
piperacilina-tazobactam	7 (17,9)	3 (42,9)	1,21±0,21
polimixina B + β-lactâmico sem sensibilidade <i>in vitro</i>	5 (12,8)	1 (20,0)	0,92±0,33
polimixina B + aztreonam*	2 (5,1)	2 (100,0)	1,06±0,90
aztreonam + amicacina	1 (2,6)	0 (0,0)	0,5±0,00
aztreonam + outro β-lactâmico sem sensibilidade <i>in vitro</i>	1 (2,6)	0 (0,0)	1,00±0,00
aztreonam + outro β-lactâmico + amicacina, ambos sem sensibilidade <i>in vitro</i>	1 (2,6)	0 (0,0)	1,00±0,00
piperacilina-tazobactam + outro β-lactâmico sem sensibilidade <i>in vitro</i>	1 (2,6)	0 (0,0)	1,33±0,00

DDD=dose diária definida, aztreonam=6,0g, polimixina B=2,0mg/kg, piperacilina-tazobactam=13,5g. DP=desvio padrão. *DDD para polimixina B.

Tabela 3. Terapia antibiótica e mortalidade de 39 pacientes com infecções por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-β-lactamase que receberam tratamento apropriado

6 SEGUNDO ARTIGO

6.1 Versão em inglês

Formatado conforme normas do *Clinical Infectious Diseases*

Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase nosocomial infections: two case-control studies in hospitals with low and high prevalence of enzyme production

Alexandre Prehn Zavascki,^{1,2} Afonso Luís Barth,^{2,3} Ana Lúcia Saraiva Gonçalves,³ Ana Lúcia Didonet Moro,⁴ Juliana Fernandes Fernandez,⁵ Andreza Francisco Martins,³ Patrick Barcelos Gaspareto,³ Cláudia Meirelles Leite,⁶ Fabiano Ramos,¹ Luciano Zubaran Goldani^{2,7}

¹Infectious Diseases Service, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, and ²Medicine: Medical Sciences Postgraduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and ³Microbiology Unit, Clinical Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ⁴Medical School, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, and ⁵Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and ⁶Microbiology Laboratory, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, and ⁷Division of Infectious Diseases, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Background. *P. aeruginosa* producing metallo- β -lactamase (MBL-PA) has been emerging worldwide severely limiting treatment options for these organisms. Risk factors for MBL-PA infections are poorly known.

Methods. Two case-control studies were performed in teaching hospitals with high and low prevalence of MBL-PA (hospital 1 and 2, respectively). Cases were patients with MBL-PA infections and controls were those with non-MBL-PA infections. A logistic regression model was constructed for both studies. The role of horizontal transmission was assessed through genotyping of selected isolates with DNA macrorestriction followed by PFGE.

Results. Sixty-six cases and 93 controls were analyzed in the study from hospital 1, and 20 cases and 119 controls in the study from hospital 2. Exposure to β -lactams (Odds ratio [OR], 4.66; 95% Confidence Interval [CI], 2.12–10.24) or fluorquinolones (OR, 8.55; 95% CI, 2.13–34.25) were independently associated with MBL-PA infections in hospital 1, while only to β -lactams (OR, 4.30; 95% CI, 1.55–11.95) in hospital 2. Renal failure (OR, 3.43; 95% CI, 1.34–8.78), urinary tract infection (OR, 3.26; 95% CI, 1.27–8.43) and neurological disease (OR, 2.77; 95% CI, 1.28–6.03) were found to be independent risk factors in the study from hospital 1, and presence of urinary catheter (OR, 5.33; 95% CI, 1.45–19.65) were found in the study from hospital 2. Genotyping revealed the presence of clonal dissemination of MBL-PA isolates.

Conclusions. Antimicrobial exposure, particularly to β -lactams, is an important risk factor for MBL-PA infections even when horizontal transmission plays a major role in the spread of MBL-PA isolates.

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of nosocomial infections, particularly pneumonia [1]. This organism is uniquely problematic because of a combination of inherent resistance to many drug classes, its ability to acquire resistance to all relevant treatments and its frequent role in serious infections [2].

The metallo- β -lactamases (MBLs) have emerged as one of the most feared resistance mechanism because of their ability to hydrolyze virtually all β -lactam agents, including the carbapenems, and because their genes are carried on highly mobile elements [3, 4]. The prevalence of MBL production in *P. aeruginosa* has been increasing in many countries from Southeast Asia, Europe, Latin America and, more recently, North America and Oceania [4, 5].

Strategies for preventing antimicrobial resistance are more likely to succeed if they are guided by a better understanding of its risk factors. The identification of exposures associated with colonization or infection by resistant pathogens has been attempted in order to potentially correct modifiable variables and to improve knowledge on both epidemiology and pathogenesis of resistant organisms. Only two case-control studies have assessed risk factors for acquiring *P. aeruginosa* producing MBL (MBL-PA) [6, 7]. However, these studies have not evaluated risk factors for infections by such organisms, and they were limited either by the lack of a multivariable analysis [6], or by the small number of case patients, thereby significantly decreasing the power to detect differences between exposures [7].

The current report included two case-control studies carried out at institutions with high and low MBL prevalence, and it is the first to assess risk factors for MBL-PA nosocomial infections.

PATIENTS AND METHODS

Study design. Two case-control studies with incident cases were performed in two tertiary-care teaching hospitals in Porto Alegre, southern Brazil. The study period was from September 2004 to June 2005 at Hospital São Lucas (hospital 1), a 600-bed hospital, and from January to June 2005 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (hospital 2), a 1200-bed hospital. Patients with positive cultures for *P. aeruginosa* were eligible for the study. Patients were excluded if they were <18 years, if they had cystic fibrosis, if *P. aeruginosa* was recovered <48 hours of hospital admission (unless the patient had been hospitalized in the last 60 days) or if they did not fulfil the CDC criteria for infections [8].

Bacterial identification, antimicrobial susceptibility and screening for MBL production.

Biochemical tests were used to identify *P. aeruginosa* which included: oxidase, oxidation of glucose on OF-medium, arginine and nitrate, growth in ceftrimide agar, and production of characteristic pigments (blue and green). Susceptibility was determined by the disk-diffusion method according to NCCLS guidelines [9]. All isolates resistant to ceftazidime were screened for MBL production with ceftazidime in the presence of 2-mercaptopropionic acid [10].

MBL identification. A sample of MBL-PA isolates was firstly submitted to PCR for detection of the *bla*_{SPM-1} gene. It was performed on total DNA using SPM primers (forward: 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3', reverse: 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'). The cycling parameters were 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min an extension at 68°C for 1 min and a final extension

at 68°C for 5 min. PCR products were visualized by electrophoresis on 2,0% agarose gels stained with 1% ethidium bromide.

Isolates that did not produce PCR amplification products with *bla*_{SPM-1} primers were further tested for the presence of the *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} genes as previously described [11].

Molecular typing. DNA macrorestriction using *Spe*I followed by PFGE was performed in selected isolates [12]. Restriction fragment profiles were compared visually and were analysed using the Tenover criteria [13].

Definitions. Cases were those patients with nosocomial infections by MBL-PA and controls were those infected by non-MBL-PA. The variables potentially associated with the MBL-PA infections included: age; sex; Charlson comorbidity score [14]; baseline diseases, including cardiac diseases (acute myocardial infarction, unstable angina, congestive heart failure or arrhythmias), pulmonary disease (asthma, chronic obstructive pulmonary disease or pulmonary fibrosis), neurological diseases (neurovascular or other diseases with cognitive, sensitive and/or motor impairment), solid and hematological malignancy, diabetes mellitus, AIDS, cirrhosis, and renal failure (serum creatinine >2.0 mg/dL); iatrogenic immunosuppression, such as chemotherapy-induced neutropenia (neutrophile count <1,000 cells/mm³), and/or receipt of corticoid drugs or other immunosuppressive agents for >14 days; length of hospital stay; intensive care unitm (ICU) stay; previous surgical procedure during hospital stay; site of infection; polymicrobial infection; presence of devices (central venous catheter, endotracheal tube and urinary catheter); and antimicrobial exposure (only those used for at least 48 hours during the last 14 days were analysed): β-lactams (aztreonam, cefepime, ceftazidime, ertapenem, imipenem, meropenem

or piperacillin-tazobactam), fluorquinolones (ciprofloxacin or levofloxacin), aminoglycosides (gentamicin or amikacin), anaerobicidal agents (clindamycin or metronidazole) and vancomycin.

Data were collected from medical charts and/or hospital computer system databases, during and after patients' hospitalization. The researches were blinded for the MBL status of *P. aeruginosa* isolates.

Statistical analysis. All statistical analyses were carried out using SPSS for Windows, Version 13.0. Bivariate analysis was performed separately for each of the variables. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated for binomial variables. *P* values were calculated using chi-squared test or Fischer exact test for categorical variables, and Student's *t*-test or Wilcoxon rank-sum test for continuous variables.

A logistic regression model was constructed to identify independent risk factors. Variables for which the *P* value was $<.2$ in bivariate analysis were included in the model according the magnitude of its effect. A *P* value of .05 was set as the limit for acceptance or removal of the new terms in the model. All tests were two-tailed, and a *P* value of $<.05$ was considered significant.

RESULTS

A total of 532 patients presented the isolation of *P. aeruginosa* (245 from hospital 1 and 287 from hospital 2). Two-hundred thirty-four patients were excluded due to the following criteria: age <18 years (n=86), isolate recovered <48 hours of admission (n=59), cystic fibrosis (n=52; most of them were also <18 years) and did not fulfil the CDC criteria for infection (n=37). Two-hundred ninety-eight patients presented at least one episode of *P. aeruginosa* nosocomial infection during the study period: 159 from hospital 1 and 139 from hospital 2. Sixty-six (41.5%) patients had MBL-PA infections at hospital 1, while 20 (14.4%) had MBL-PA infections at hospital 2.

The results of bivariate analysis of risk factors for MBL-PA infections from hospitals 1 and 2 are shown in tables 1 and 2, respectively. Recent use of a β -lactam or a fluorquinolone were significant risk factors for MBL-PA infections at hospital 1 (OR, 4.66; 95% CI, 2.12–10.24; and OR, 8.55; 95% CI, 2.13–34.25, respectively). Other variables non-related to antibiotic exposure that were statistically significant in the multivariate model from hospital 1 were renal failure (OR, 3.43; 95% CI, 1.34–8.78), urinary tract infection (OR, 3.26; 95% CI, 1.27–8.43), and neurological disease (OR, 2.77; 95% CI, 1.28–6.03). Multivariate analysis from hospital 2 showed that the recent use of a β -lactam (OR, 4.30; 95% CI, 1.55–11.95) and the presence of urinary catheter device (OR, 5.33; 95% CI, 1.45–19.65) were associated with MBL-PA infections. The results of multivariate analysis are presented in table 3.

Fourteen MBL-PA from hospital 1 were tested for the presence of MBL genes and all were positive for the *bla*_{SPM-1} gene. Thirteen (92.9%; 95% CI, 66.1–99.8) of 14 MBL-PA from hospital 1 submitted to molecular typing comprised a single clone. Twelve presented identical macrorestriction profiles or were subtypes with less than three distinct

bands, and one presented 6 distinct bands. A single isolate revealed a distinct DNA macrorestriction profile. Ten (100%) of 10 MBL-PA from hospital 2 submitted to molecular typing comprised a single clone with identical isolates or with less than 3 distinct bands.

DISCUSSION

The present report was carried out at two teaching-hospitals, with high and low to moderate prevalence of MBL-PA infections at each of them. At both, horizontal transmission had previously been shown to be a major determinant of the dissemination of MBL-PA isolates [15; and unpublished data], and the current study confirmed such findings by the presence of a single clone among almost all MBL-PA isolates from hospital 1, and among all from hospital 2.

Our study showed that the use of a β -lactam agent or a fluorquinolone were significant risk factors for infections by MBL-PA at hospital 1, while only β -lactam was found at hospital 2. Since MBLs determine resistance to almost all β -lactam agents, it was expected that exposure to that drug class would be a risk factor for MBL-PA infections. Notably, our results indicated that the selective pressure imposed by antibiotic use remains an important risk factor for infections by antibiotic-resistant *P. aeruginosa*, even when horizontal transmission is well documented. Exposure to fluorquinolones was a risk factor found among patients from hospital 1, although MBL-PA patients from hospital 2 also presented a trend for higher exposures to fluorquinolones than controls in bivariate analysis (30 versus 16%, respectively; OR, 2.26; 95% CI, 0.77–6.61). Interestingly, the finding of exposure to fluorquinolones as a risk factor for SPM-1 MBL-PA has been previously reported [7], and there is a link between SPM-1 MBL and fluorquinolones that might account for such association. The *bla*_{SPM-1} gene is surrounded by mobile genetic regions closely related to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, which are in turn associated with other antibiotic resistance genes [3]. These regions can be mobilized under bacterial stress, and it has been shown that resistance elements linked to these regions increased 300-

fold when exposed to fluorquinolones [3]. Thus, exposure to fluorquinolone might be a risk factor specifically for SPM-1 MBL through the mobilization of its genetic apparatus.

Renal failure and urinary tract infections were also interesting findings in the study from hospital 1 as well as the presence of urinary catheter device in the study from hospital 2. Renal failure has been found to be a risk factor for imipenem-resistant *P. aeruginosa* in a previous study conducted at hospital 1 [16], and the urinary catheter has also been reported as a risk factor for multidrug-resistant *P. aeruginosa* [17] and for IMP-1 MBL-PA [6]. In the same way, resistance among isolates recovered from urine has usually been reported as higher than from other sites [6]. There is no obvious explanation for these associations. It has been demonstrated that substances eluted from siliconized latex urinary catheters were related to the loss of the OprD outer membrane protein, leading to imipenem resistance [18], but there is no reported association with MBLs-mediated resistance. Otherwise, it could be speculated that biofilm from urinary devices might be a favourable reservoir for some resistant isolates. Another explanation would be the cross-transmission among patients with renal failure or those using an urinary catheter, due to an epidemiologic relationship among these patients. However, we did not find any epidemiologic factor, including geographic, that could differentiate them from patients without the presence of these variables. Notably, urinary device was a risk factor even controlling for ICU stay.

The finding that patients with neurological diseases presented a higher risk for MBL-PA infections at hospital 1 was not expected. Although a spurious association could not be ruled out, neurological disease was also associated with MBL-PA in the bivariate analysis in the study from hospital 2, and it is possible that an unknown factor could mediate such association. For instance, Defez et al. [17] have found bedridden as a risk factor for multidrug-resistant *P. aeruginosa*.

Besides the urinary source and urinary catheter, Hirakata et al. [6] have also found that prolonged hospitalization, antineoplastic chemotherapy and corticosteroid therapy were risk factors for acquiring IMP-1 MBL-PA. Longer length of antimicrobial therapy and higher total doses of β -lactam therapy were also risk factors [6]. Unfortunately, fluorquinolone exposure was not assessed [6]. Nevertheless, no multivariable analysis was performed in this study, thus to a large extent limiting definitive conclusions.

Nouér et al. [7] have only found fluorquinolone exposure to be a risk factor for SPM-1 MBL-PA. Interestingly, chronic renal failure and dialysis were among the few variables significantly associated with SPM-1 MBL in bivariate analysis [7]. Unfortunately, the small number of patients in this study (14 cases and 28 controls) has limited its power to detect differences between exposures in multivariate analysis [7].

A limitation of our report was that the study from hospital 2 also had a small number of cases, thereby limiting its power. We have also not tested all isolates for the presence of MBL genes, although all tested *P. aeruginosa* isolates were SPM-1 producers. We used patients with non-MBL-PA infections as controls rather than a sample of hospitalized patients, representative of the base population, selected by a criteria other than infection by *P. aeruginosa*, as proposed elsewhere [19]. Using this latter design it would not be possible to distinguish whether the variables were risk factors for MBL-PA infections or for *P. aeruginosa* infections regardless of the MBL status [20]. However, the design adopted in our study clearly overestimates the magnitude of the effect of antibiotic exposure [19].

In conclusion, antibiotic exposure, notably to β -lactams, is a significant risk factor for MBL-PA infections even when cross-transmission is a major determinant of isolates dissemination. Fluorquinolones may be a risk factor for SPM-1 MBL through a mobilization of SPM-1 genetic apparatus. The finding that variables related to urinary tract

diseases are being found as risk factors for resistant *P. aeruginosa* in this and other studies deserves further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Larissa Lutz, Denise Pires Machado and Rodrigo Pires dos Santos for the support in microbiologic tests. This study has received financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Ministry of Education, Brazil, and Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

1. Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* **2003**; 45:279–85.
2. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **2002**; 34:634–40.
3. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **2005**; 18:306–25.
4. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* **2005**; 41(Suppl 4): S276–8.
5. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* **2005**; 41: 1549–56.
6. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **2003**; 37:26–32.
7. Nouer SA, Nucci M, de-Oliveira MP, Pellegrino FL, Moreira BM. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 3663-7.
8. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* **1988**; 16:128–40.

9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Tests. NCCLS Document M100-S10. Pennsylvania, **2004**.
10. 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.
11. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11: 73–76.
12. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woddford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology. Protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press Inc, 1998:33–50.
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: 2233–39.
14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* **1987**; 40: 373–83.
15. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2005**.
Advanced published on 20 October.

16. Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies. J Hosp Infect **2005**; 59: 96-101.
17. Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N *et al*. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. J Hosp Infect **2004**; 57: 209-16.
18. Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L *et al*. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **2003**; 47: 2313-5.
19. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y *et al*. Methodological principles of case-control studies that analysed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. Clin Infect Dis **2001**; 32: 1055-61.
20. Zavascki AP. Assessing risk factors for acquiring antimicrobial-resistant pathogens: a time for a comparative approach. Clin Infect Dis **2004**; 39: 871-2

Table 1. Bivariate analysis of risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase infections from hospital 1.

Variables	MBL + (n=66)	MBL – (n=93)	OR (95% CI)	P
Age, years ^a	62.4±17.6	62.6±16.8	–	.95
Sex, male	41(61.1)	58(62.4)	0.99 (0.52–1.90)	.89
Charlson score ^b	3 (2–4)	2 (1–5)	–	.11
Comorbidities				
Cardiac	29 (43.9)	46 (49.4)	0.80 (0.42–1.50)	.59
Pulmonary	12 (18.2)	19 (20.4)	0.87 (0.39–1.93)	.88
Neurological	28 (42.4)	23 (24.7)	2.24 (1.14–4.42)	.03
Malignancy	14 (21.2)	23 (24.7)	0.82 (0.39–1.72)	.74
Diabetes	19 (28.8)	21 (22.6)	1.39 (0.67–2.85)	.48
Renal	19 (28.8)	13 (14.0)	2.49 (1.13–5.49)	.04
Cirrhosis	5 (7.6)	5 (5.4)	1.44 (0.40–5.20)	.40
AIDS	0 (0.0)	1 (1.1)	–	.86
Iatrogenic immunosuppression	26 (39.4)	24 (25.8)	1.87 (0.95–3.68)	.10
Previous surgery	31 (47.7)	54 (58.7)	0.64 (0.34–1.22)	.23
Intensive care unit stay	23 (34.8)	22 (23.7)	1.73 (0.86–3.46)	.17
Length of hospital stay ^b	20 (10–31)	13 (4–28)	–	.20
Site of Infection				
Lower respiratory tract	34 (51.5)	47 (50.5)	1.03 (0.55–1.95)	.96
Urinary tract	18 (27.3)	11 (11.8)	2.80 (1.22–6.41)	.02
Soft tissue infection	12 (18.2)	23 (24.7)	0.68 (0.31–1.48)	.43
Other sites	12 (33.3)	26 (28.0)	0.87 (0.39–1.93)	.88
Polymicrobial infection	23 (34.8)	39 (41.9)	0.74 (0.39–1.42)	.87

Table 1. Cont.

Variables	MBL + (n=66)	MBL – (n=93)	OR (95% CI)	<i>P</i>
Antibiotic exposure				
β-lactams	38 (57.6)	32 (34.4)	2.59 (1.35–4.95)	<.01
Fluorquinolones	9 (13.6)	4 (4.3)	3.51 (1.03–11.95)	.03
Vancomycin	11 (16.7)	7 (7.5)	2.45 (0.90–6.72)	.12
Aminoglycosides	3 (4.5)	4 (4.3)	1.06 (0.23–4.90)	.61
Anaerobicidal	18 (27.3)	20 (21.5)	1.37 (0.66–2.85)	.51
Presence of device				
Urinary catheter	37 (56.9)	39 (41.9)	1.83 (0.96–3.47)	.09
Central venous catheter	39 (59.1)	43 (46.2)	1.74 (0.92–3.32)	.12
Endotracheal tube	25 (38.5)	22 (23.7)	2.01 (1.01–4.02)	.07

NOTE. Values are number (%) unless otherwise indicated. MBL, metallo-β-lactamase; +, producers; –, non-producers; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^aMean ± standard deviation.

^bMedian (percentile 25%-75%).

Table 2. Bivariate analysis of risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase infections from hospital 2.

Variables	MBL + (n=20)	MBL – (n=119)	OR (95% CI)	P
Age, years ^a	59.8±18.0	55.5±18.2	–	.33
Sex, male	10 (50.0)	73 (61.3)	0.63 (0.24–1.63)	.48
Charlson score ^b	3.5 (3-5.5)	4 (2-6)	–	.68
Comorbidities				
Cardiac	15 (75.0)	62 (52.1)	2.76 (0.94–8.07)	.10
Pulmonary	13 (65.0)	57 (47.9)	2.02 (0.75–5.42)	.24
Neurological	12 (60.0)	34 (28.6)	3.75 (1.41–9.98)	.01
Malignancy	3 (15.0)	25 (21.0)	0.66 (0.18–2.45)	.39
Diabetes	6 (30.0)	29 (24.4)	1.33 (0.47–3.78)	.80
Renal	7 (35.0)	29 (24.4)	1.67 (0.61–4.59)	.47
Cirrhosis	1 (5.0)	16 (13.4)	0.34 (0.04–2.71)	.26
AIDS	1 (5.0)	17 (14.3)	0.32 (0.04–2.52)	.23
Iatrogenic immunosuppression	6 (30.0)	46 (38.7)	0.68 (0.24–1.90)	.62
Previous surgery	13 (65.0)	49 (41.2)	2.65 (0.99–7.31)	.08
Intensive care unit stay	11 (55.0)	32 (26.9)	3.32 (1.26–8.76)	.02
Length of hospital stay ^b	24.5 (14-42.5)	11 (4-30)	–	.02
Site of Infection				
Lower respiratory tract	8 (40.0)	61 (51.3)	0.63 (0.24–1.66)	.49
Urinary tract	7 (35.0)	25 (21.0)	2.03 (0.73–5.61)	.28
Soft tissue infection	1 (5.0)	11 (9.2)	0.52 (0.06–4.24)	.46
Other sites	4 (20.0)	26 (21.8)	0.89 (0.28–2.90)	.56
Polymicrobial infection	4 (20.0)	51 (42.9)	0.33 (0.11–1.06)	.05

Table 2. Cont.

Variables	MBL + (n=20)	MBL – (n=119)	OR (95% CI)	<i>P</i>
Antibiotic exposure				
β-lactam	12 (60.0)	29 (24.4)	4.66 (1.73–12.50)	<.01
Fluorquinolones	6 (30.0)	19 (16.0)	2.26 (0.77–6.61)	.23
Vancomycin	4 (20.0)	20 (16.8)	1.24 (0.37–4.09)	.47
Aminoglycosides	0 (0.0)	5 (5.2)	–	.45
Anaerobicidal	5 (25.0)	24 (20.2)	1.32 (0.44–3.99)	.85
Presence of device				
Urinary catheter	17 (85.0)	59 (49.6)	5.76 (1.60–20.70)	<.01
Central venous catheter	16 (80.0)	70 (58.8)	2.80 (0.88–8.89)	.06
Endotracheal tube	9 (45.0)	37 (31.1)	1.81 (0.69–4.75)	.33

NOTE. Values are number (%) unless otherwise indicated. MBL, metallo-β-lactamase; +, producers; –, non-producers; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^aMean ± standard deviation.

^bMedian (percentile 25%-75%).

Table 3. Multivariate analysis of risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase infections.

Variable	Hospital 1		Hospital 2	
	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>
β -lactam	4.66 (2.12–10.24)	<.001	4.30 (1.55–11.95)	<.01
Fluorquinolone	8.55 (2.13–34.25)	<.01	–	–
Renal failure	3.43 (1.34–8.78)	.01	–	–
Urinary tract infection	3.26 (1.27–8.43)	.02	–	–
Urinary catheter	–	–	5.33 (1.45–19.65)	.01
Neurological disease	2.77 (1.28–6.03)	.01	–	–

NOTE. OR, odds ratio; CI, confidence interval.

6.2 Versão em português

Fatores de risco para infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase: dois estudos caso-controle em hospitais com baixa e alta prevalência de produção da enzima

Alexandre Prehn Zavascki,^{1,2} Afonso Luís Barth,^{2,3} Ana Lúcia Saraiva Gonçalves,³ Ana Lúcia Didonet Moro,⁴ Juliana Fernandes Fernandez,⁵ Andreza Francisco Martins,³ Patrick Barcelos Gaspareto,³ Cláudia Meirelles Leite,⁶ Fabiano Ramos,¹ Luciano Zubaran Goldani^{2,7}

¹Serviço de Infectologia, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e

²Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e

³Unidade de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e ⁴Faculdade

de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e ⁵Faculdade de Medicina, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, e ⁶Laboratório de Microbiologia, Hospital São Lucas da Pontifícia

Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e ⁷Divisão de Infectologia, Hospital de Clínicas de Porto

Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Conhecimento. *P. aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase (MBL-PA) têm emergido em todo o mundo limitando gravemente as opções terapêuticas para esses organismos. Fatores de risco para infecções por MBL-PA são muito pouco conhecidos.

Métodos. Dois estudos caso-controle foram realizados em hospitais universitários com alta e baixa prevalência de infecções por MBL-PA (hospital 1 e 2, respectivamente). Casos foram pacientes com infecções por MBL-PA e controles foram aqueles com infecções por não-MBL-PA. Um modelo de regressão logística foi construído para ambos os estudos. O papel da transmissão cruzada foi avaliado através de genotipagem de isolados selecionados pelo método de macrorestrição de DNA seguido de PFGE.

Resultados. Sessenta e seis casos e 93 controles foram analisados no estudo do hospital 1, e 20 casos e 119 controles no estudo do hospital 2. Exposição a β -lactâmicos (*Odds ratio* [OR], 4.66; Intervalo de confiança de 95% [IC 95%], 2.12–10.24) ou fluorquinolonas (OR, 8.55; IC 95%, 2.13–34.25) foram independentemente associados com infecções por MBL-PA no hospital 1, enquanto somente exposição a β -lactâmicos (OR, 4.30; IC 95%, 1.55–11.95) no hospital 2. Insuficiência renal (OR, 3.43; IC 95%, 1.34–8.78), infecção do trato urinário (OR, 3.26; IC 95%, 1.27–8.43) e doença neurológica (OR, 2.77; IC 95%, 1.28–6.03) também foram achados como fatores de risco independentes no hospital 1, e a presença de cateter urinário (OR, 5.33; 95% CI, 1.45–19.65) foi achado no hospital 2. A genotipagem revelou a presença de disseminação clonal dos isolados de MBL-PA.

Conclusões. Exposição a antimicrobianos, particularmente a β -lactâmicos, é um importante fator de risco para infecções por MBL-PA mesmo quando a transmissão horizontal desempenha um papel importante na disseminação desses isolados.

A *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares em todo o mundo, principalmente pneumonias [1]. Este organismo é singularmente problemático devido a uma combinação de resistência intrínseca a várias classes de drogas, a sua habilidade para adquirir resistência a todos os tratamentos antimicrobianos, e ao seu freqüente envolvimento em infecções graves [2]

As metalo- β -lactamases (MBLs) têm emergido como um dos mais temidos mecanismos de resistência por sua capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, e por que os genes codificadores dessas enzimas são carregados em elementos altamente móveis [3, 4]. A prevalência de produção de MBL em *P. aeruginosa* tem aumentado em muitos países do Sudeste Asiático, Europa, América Latina e, mais recentemente, América do Norte e Oceania [4, 5].

As estratégias para a prevenção de resistência antimicrobiana terão maiores chances de sucesso se forem orientadas por uma melhor compreensão dos seus fatores de risco. Tenta-se a identificação de exposições associadas com colonização ou infecção por patógenos resistentes a fim de intervir em variáveis potencialmente modificáveis e melhorar o conhecimento, tanto sobre a epidemiologia como sobre a patogênese de organismos resistentes. Apenas dois estudos caso-controle avaliaram fatores de risco para a aquisição de *P. aeruginosa* produtora de MBL (MBL-PA) [6, 7]. Todavia, nenhum deles avaliou fatores de risco para infecções por esses organismos, e ambos foram limitados seja pela ausência de uma análise multivariada [6], ou seja pelo pequeno número de casos, assim diminuindo, significativamente, o poder para detectar diferenças entre exposições [7].

O presente artigo incluiu dois estudos caso-controle realizados em instituições com alta e baixa prevalência de MBL e é o primeiro a avaliar fatores de risco para infecções nosocomiais por MBL-PA.

PACIENTES E MÉTODOS

Delineamento do Estudo. Dois estudos caso-controle com casos incidentes foram realizados em dois hospitais terciários de ensino de Porto Alegre, sul do Brasil. O período de estudo foi de setembro de 2004 a junho de 2005, no Hospital São Lucas (hospital 1), um hospital de 600 leitos, e de janeiro até junho de 2005 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (hospital 2), um hospital de 1200 leitos. Pacientes com culturas positivas para *P. aeruginosa* foram elegíveis para o estudo. Foram excluídos pacientes com <18 anos de idade, com fibrose cística, que tiveram isolamento de *P. aeruginosa* <48 horas de hospitalização (a menos que o paciente apresentasse hospitalização nos últimos 60 dias), ou que não preenchessem os critérios do CDC para infecções [8].

Microbiologia, sensibilidade bacteriana e triagem para MBL. Testes bioquímicos que incluíram: oxidase, oxidação de glicose em meio - OF, arginina e nitrato, crescimento em ágar, e produção de pigmentos característicos (azul e verde), foram usados para identificação bacteriana. A sensibilidade foi determinada pelo método de disco de difusão segundo as diretrizes do NCCLS [9]. Todos os isolados resistentes para ceftazidima foram examinados para a produção de MBL com ceftazidima, na presença de ácido 2-mercaptopropiônico [10].

Identificação da MBL. Uma amostra de MBL-PA foi submetida à PCR para a detecção do gene *bla_{SPM-1}*. O PCR foi realizado em DNA total usando *primers* de SPM (para frente: 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3', reverso: 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'). Os parâmetros de ciclagem foram 95°C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min, uma extensão a 68°C por 1 min e uma

extensão final a 68°C por 5 min. Produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em géis de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio a 1%. Isolados que não produziram produtos de amplificação de PCR com *primers* de *bla*_{SPM-1} foram ainda testados para a presença dos genes de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2} conforme anteriormente descritos [11].

Tipagem molecular. Macrorestrição de DNA usando *SpeI* seguida de PFGE foi realizada para tipagem molecular de isolados selecionados [12]. Perfis de restrição foram comparados visualmente e foram analisados usando os critérios de Tenover [13].

Definições. Casos foram os pacientes com infecções por MBL-PA e controles foram aqueles com infecções por não-MBL-PA. As variáveis potencialmente associadas com infecções por MBL-PA incluem: idade; sexo; escore de comorbidade de Charlson [14]; doenças de base, incluindo cardiopatias (infarto agudo do miocárdio, angina instável, insuficiência cardíaca congestiva ou arritmias), doenças pulmonares (asma, doença pulmonar obstrutiva crônica ou fibrose pulmonar), doenças neurológicas (doenças neurovasculares ou outras patologias com prejuízo cognitivo, sensitivo e/ou motor), doença neoplásica maligna sólida e hematológica, diabetes, Aids, cirrose e insuficiência renal (creatinina sérica >2,0 mg/dL); imunossupressão iatrogênica, como neutropenia induzida por quimioterápicos (contagem de neutrófilos <1.000 células/mm³), e/ou uso de corticoesteróides (prednisona ≥10mg/dia ou doses equivalentes) ou outros agentes imunossupressores durante >14 dias; tempo de hospitalização; procedimento cirúrgico prévio durante a hospitalização; sítio de infecção; presença de dispositivos invasivos (sonda vesical de demora, tubo endotraqueal, e cateter venoso central); e exposição a antimicrobianos (somente antimicrobianos usados por pelo menos 48 horas nos últimos 14

dias foram analisados): β -lactâmicos (aztreonam, cefepima, ceftazidima, ertapenem, imipenem, meropenem ou piperacilina-tazobactam), fluorquinolonas (ciprofloxacino ou levofloxacino), aminoglicosídeos (gentamicina ou ampicilina), agentes anaeróbicos (clindamicina ou metronidazol) e vancomicina.

Os dados foram coletados de prontuários médicos e/ou bancos de dados de sistemas computacionais hospitalares, durante e após a hospitalização dos pacientes. Os pesquisadores estavam cegados para a situação de MBL dos isolados de *P. aeruginosa*. Os comitês de ética de ambos os hospitais aprovaram esse estudo

RESULTADOS

Um total de 532 pacientes apresentaram isolamento de *P. aeruginosa* (245 no hospital 1 e 287 no hospital 2). Duzentos e trinta e quatro pacientes foram excluídos devido aos seguintes critérios: idade <18 anos (n=86), isolado <48 horas de hospitalização (n=59), fibrose cística (n=52; a maioria desses também era <18 anos), e não preenchimento dos critérios do CDC para infecção (n=37). Duzentos e noventa e oito pacientes apresentaram pelo menos um episódio de infecção nosocomial por *P. aeruginosa* durante o período do estudo: 159 no hospital 1 e 139 no hospital 2. Sessenta e seis (41,5%) pacientes tiveram infecções por MBL-PA no hospital 1, enquanto que 20 (14,4%) tiveram infecções por MBL-PA no hospital 2.

Os resultados de análise bivariada de fatores de risco para infecções por MBL-PA nos hospitais 1 e 2 são apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Os resultados da análise multivariada são apresentados na tabela 3. O uso recente de um β -lactâmico ou de uma fluorquinolona foram fatores de risco significativos para infecções por MBL-PA no hospital 1 (OR, 4,66; IC 95%, 2,12–10,24; e OR, 8,55; IC 95%, 2,13–34,25; respectivamente). Outras variáveis, não-relacionadas à exposição a antibióticos, estatisticamente significativas no modelo de análise multivariada do hospital 1 foram insuficiência renal (OR, 3,43; IC 95%, 1,34–8,78), infecção do trato urinário (OR, 3,26; IC 95%, 1,27–8,43), e doença neurológica (OR, 2,77; IC 95%, 1,28–6,03). A análise multivariada do hospital 2 mostrou que o uso recente de um β -lactâmico (OR, 4,30; IC 95%, 1,55–11,95) e a presença de sonda urinária (OR, 5,33; IC 95%, 1,45–19,65) foram associados com infecções por MBL-PA.

Quatorze MBL-PA do hospital 1 foram testadas para a presença de genes de MBL e todas foram positivas para o gene *bla*_{SPM-1}. Treze (92,9%; IC 95%, 66,1–99,8) de 14 MBL-

PA do hospital 1 submetidas à tipagem molecular pertenciam a um único clone. Doze apresentaram perfil de macrorestrição idêntico ou foram subtipos com menos de 3 bandas distintas, e um isolado apresentou 6 bandas diferentes. Um único isolado apresentou um perfil de macrorestrição de DNA distinto. Dez (100%) de 10 MBL-PA do hospital 2 submetidas à tipagem molecular pertenciam a um único clone, sendo idênticos ou com menos de 3 bandas distintas.

DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado em dois hospitais universitários, com alta e baixa a moderada prevalências de infecções por MBL-PA em cada um. Em ambos, havia sido demonstrado anteriormente que a transmissão horizontal era um importante fator para a disseminação de isolados de MBL-PA [15; e dados não publicados], e o presente estudo confirma tais achados pela presença de um único clone entre quase todos os isolados de MBL-PA do hospital 1 e um único entre os isolados do hospital 2.

Nosso estudo demonstrou que o uso de um agente β -lactâmico ou de uma fluorquinolona foram fatores de risco significativos para infecções por MBL-PA no hospital 1, enquanto apenas exposição a β -lactâmicos foi encontrado no hospital 2. Como as MBLs determinam resistência a quase todos os agentes β -lactâmicos, era esperado que a exposição a essa classe de drogas seria um fator de risco para infecções por MBL-PA. Notadamente, nossos resultados indicaram que a pressão seletiva imposta pelo uso de antibióticos continua a ser um fator de risco importante para infecções por *P. aeruginosa* resistentes, mesmo quando a transmissão horizontal é bem documentada. Exposição a fluorquinolonas foi um fator de risco encontrado no estudo do hospital 1, embora pacientes com MBL-PA do hospital 2 também apresentassem uma tendência a maior exposição a fluorquinolonas do que os controles na análise bivariada (30 versus 16%, respectivamente; OR, 2,26; CI 95%, 0,77–6,61). Interessantemente, exposição a fluorquinolonas já havia sido relatada anteriormente como fator de risco para SPM-1 MBL-PA [7], e existe uma ligação entre SPM-1 MBL e fluorquinolonas que poderia explicar tal associação. O gene *bla*_{SPM-1} é cercado por regiões genéticas móveis estreitamente relacionadas à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, que, por sua vez, estão associadas com outros genes de resistência a antibióticos [3]. Essas regiões podem ser mobilizadas sob estresse bacteriano, e foi demonstrado que elementos de

resistência ligados a essas regiões aumentaram 300 vezes quando expostos a fluorquinolonas [3]. Assim, a exposição à fluorquinolona poderia ser um fator de risco especificamente para SPM-1 MBL, através da mobilização do seu aparato genético.

Insuficiência renal e infecções do trato urinário também foram achados interessantes no estudo do hospital 1, bem como o uso de sonda urinária, no estudo do hospital 2. Insuficiência renal já se havia sido reportada como um fator de risco para *P.aeruginosa* resistente a imipenem em estudo anterior realizado no hospital 1 [16], e uso de sonda urinária também já foi reportada como fator de risco para *P.aeruginosa* multi-resistente [17], e para MBL-PA tipo IMP-1 [6]. Da mesma forma, a resistência entre isolados de urina tem sido freqüentemente relatada como mais elevada do que de outros sítios [6]. Não há uma explicação óbvia para essas associações. Foi demonstrado que substâncias eluídas de sondas urinárias de látex siliconizado estavam associadas com a perda da proteína de membrana externa OprD, levando a resistência ao imipenem [18], porém não há nenhuma associação descrita com MBLs. De outra forma, poderia ser especulado que o biofilme formado em dispositivos urinários seria um reservatório favorável para alguns isolados resistentes. Outra explicação seria a transmissão cruzada entre pacientes com insuficiência renal ou aqueles usando sonda urinária, devido a uma relação epidemiológica entre esses pacientes. Contudo, nós não encontramos nenhum fator epidemiológico, inclusive geográfico, que os diferencia-se de pacientes em que essas variáveis eram ausentes. Notadamente, o uso de cateter urinário foi um fator de risco mesmo controlando para internação em UTI.

O achado do estudo do hospital 1 de que pacientes com patologias neurológicas apresentavam maior risco para infecções por MBL-PA não era esperado. Embora não possa ser descartada a possibilidade de uma associação espúria, doenças neurológicas também

estavam associadas com MBL-PA na análise bivariada no estudo do hospital 2, e pode ser possível que algum fator desconhecido possa mediar tal associação. Defez et al. [17], por exemplo, encontraram restrição ao leito como fator de risco para *P. aeruginosa* multi-resistente.

Além de isolados de urina e uso de sonda urinária, Hirakata et al. [6] constataram que hospitalização prolongada, quimioterapia antineoplásica e tratamento com corticóides foram fatores de risco para adquirir MBL-PA tipo IMP-1 [6]. Duração mais longa do tratamento antimicrobiano e doses totais mais elevadas de terapia com β -lactâmicos também foram fatores de risco [6]. Infelizmente, exposição a fluorquinolonas não foi avaliada [6]. Entretanto, nenhuma análise de multivariada foi realizada neste estudo, assim, limitando importantemente conclusões definitivas.

Nouér et al. [7] apenas encontraram a exposição a fluorquinolonas como fator de risco para MBL-PA tipo SPM-1. Interessante, insuficiência renal crônica e diálise estavam entre as poucas variáveis significativamente associadas com a aquisição de MBL-PA tipo SPM-1 na análise bivariada [7]. Infelizmente, o pequeno número de pacientes neste estudo (14 casos e 28 controles) limitou o seu poder para detectar diferenças na análise multivariada [7].

Uma limitação do nosso trabalho foi que o estudo do hospital 2 também apresentou um pequeno número de casos, assim limitando o seu poder. Também não testamos todos os isolados para a presença de genes de MBL, embora todos os testados fossem produtores de SPM-1 MBLs. Nós usamos como controles pacientes com infecções por não-MBL-PA, em vez de uma amostra de pacientes hospitalizados, representativa da população-base, selecionada por outro critério que não infecção por *P. aeruginosa*, conforme previamente proposto [19]. Usando o referido delineamento não seria possível diferenciar se as

variáveis eram fatores de risco para infecções por MBL-PA ou para infecções por *P. aeruginosa*, independente da produção de MBL [19]. Contudo, o delineamento adotado no nosso estudo claramente superestima a magnitude do efeito da exposição aos antibióticos [19].

Em conclusão, a exposição a antibióticos, notadamente a β -lactâmicos, é um fator de risco importante para infecções por MBL-PA, mesmo quando a transmissão cruzada é um determinante importante da disseminação dos isolados. Fluorquinolonas podem ser um fator de risco para MBL do SPM-1 através de uma mobilização do aparato genético dessa enzima. O fato de variáveis relacionadas a doenças do trato urinário estarem sendo reportadas como fatores de risco para *P.aeruginosa* resistentes neste e em outros estudos merece investigações adicionais.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Larissa Lutz, Denise Pires Machado e Rodrigo Pires dos Santos pelo apoio em testes microbiológicos. Este estudo recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Ministério da Educação e da Fundação de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS

1. Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* **2003**; 45:279–85.
2. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **2002**; 34:634–40.
3. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **2005**; 18:306–25.
4. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* **2005**; 41(Suppl 4): S276–8.
5. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* **2005**; 41: 1549–56.
6. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **2003**; 37:26–32.
7. Nóuer SA, Nucci M, de-Oliveira MP, Pellegrino FL, Moreira BM. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 3663-7.
8. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* **1988**; 16:128–40.

9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Tests. NCCLS Document M100-S10. Pennsylvania, **2004**.
10. 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.
11. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11: 73–76.
12. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woddford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology. Protocols and clinical applications*. New Jersey: Humana Press Inc, 1998:33–50.
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: 2233–39.
14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* **1987**; 40: 373–83.
15. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2005**.
Publicado on-line em 20 de outubro.
16. Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies. *J*

- Hosp Infect **2005**; 59: 96-101.
17. Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N *et al.* Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. J Hosp Infect **2004**; 57: 209-16.
 18. Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L *et al.* Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **2003**; 47: 2313-5.
 19. Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y *et al.* Methodological principles of case-control studies that analysed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. Clin Infect Dis **2001**; 32: 1055-61.
 20. Zavascki AP. Assessing risk factors for acquiring antimicrobial-resistant pathogens: a time for a comparative approach. Clin Infect Dis **2004**; 39: 871-2

Tabela 1. Análise bivariada dos fatores de risco para infecções por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase do hospital 1.

Variáveis	MBL + (n=66)	MBL – (n=93)	OR (IC 95%)	P
Idade, anos ^a	62,4±17,6	62,6±16,8	–	0,95
Sexo, masculino	41(61,1)	58 (62,4)	0,99 (0,52–1,90)	0,89
Escore de Charlson ^b	3 (2–4)	2 (1–5)	–	0,11
Comorbidades				
Cardíaca	29 (43,9)	46 (49,4)	0,80 (0,42–1,50)	0,59
Pulmonar	12 (18,2)	19 (20,4)	0,87 (0,39–1,93)	0,88
Neurológica	28 (42,4)	23 (24,7)	2,24 (1,14–4,42)	0,03
Neoplasia maligna	14 (21,2)	23 (24,7)	0,82 (0,39–1,72)	0,74
Diabetes	19 (28,8)	21 (22,6)	1,39 (0,67–2,85)	0,48
Renal	19 (28,8)	13 (14,0)	2,49 (1,13–5,49)	0,04
Cirrose	5 (7,6)	5 (5,4)	1,44 (0,40–5,20)	0,40
Aids	0 (0,0)	1 (1,1)	–	0,86
Imunossupressão iatrogênica	26 (39,4)	24 (25,8)	1,87 (0,95–3,68)	0,10
Cirurgia prévia	31 (47,7)	54 (58,7)	0,64 (0,34–1,22)	0,23
Internação em Unidade de Terapia Intensiva	23 (34,8)	22 (23,7)	1,73 (0,86–3,46)	0,17
Tempo de hospitalização ^b	20 (10–31)	13 (4–28)	–	0,20
Sítio de infecção				
Trato respiratório inferior	34 (51,5)	47 (50,5)	1,03 (0,55–1,95)	0,96
Trato urinário	18 (27,3)	11 (11,8)	2,80 (1,22–6,41)	0,02
Tecidos moles	12 (18,2)	23 (24,7)	0,68 (0,31–1,48)	0,43
Outros sítios	12 (33,3)	26 (28,0)	0,87 (0,39–1,93)	0,88
Infecção polimicrobiana	23 (34,8)	39 (41,9)	0,74 (0,39–1,42)	0,87

Tabela 1. Cont.

Variáveis	MBL + (n=66)	MBL – (n=93)	OR (IC 95%)	P
Exposição a antibióticos				
β-lactâmicos	38 (57,6)	32 (34,4)	2,59 (1,35–4,95)	<0,01
Fluorquinolonas	9 (13,6)	4 (4,3)	3,51 (1,03–11,95)	0,03
Vancomicina	11 (16,7)	7 (7,5)	2,45 (0,90–6,72)	0,12
Aminoglicosídeos	3 (4,5)	4 (4,3)	1,06 (0,23–4,90)	0,61
Anaerobicidas	18 (27,3)	20 (21,5)	1,37 (0,66–2,85)	0,51
Presença de dispositivo				
Cateter urinário	37 (56,9)	39 (41,9)	1,83 (0,96–3,47)	0,09
Cateter venoso central	39 (59,1)	43 (46,2)	1,74 (0,92–3,32)	0,12
Tubo endotraqueal	25 (38,5)	22 (23,7)	2,01 (1,01–4,02)	0,07

NOTA. Valores são número (%) a menos que indicado de outro modo. OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança.

^aMédia ± desvio padrão

^bMediana (percentil 25%-75%)

Tabela 2. Análise bivariada dos fatores de risco para infecções por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-β-lactamase do hospital 2.

Variáveis	MBL + (n=20)	MBL – (n=119)	OR (IC 95%)	P
Idade, anos ^a	59,8±18,0	55,5±18,2	–	0,33
Sexo, masculino	10 (50,0)	73 (61,3)	0,63 (0,24–1,63)	0,48
Escore de Charlson ^b	3,5 (3–5,5)	4 (2–6)	–	0,68
Comorbidades				
Cardíaca	15 (75,0)	62 (52,1)	2,76 (0,94–8,07)	0,10
Pulmonar	13 (65,0)	57 (47,9)	2,02 (0,75–5,42)	0,24
Neurológica	12 (60,0)	34 (28,6)	3,75 (1,41–9,98)	0,01
Neoplasia maligna	3 (15,0)	25 (21,0)	0,66 (0,18–2,45)	0,39
Diabetes	6 (30,0)	29 (24,4)	1,33 (0,47–3,78)	0,80
Renal	7 (35,0)	29 (24,4)	1,67 (0,61–4,59)	0,47
Cirrose	1 (5,0)	16 (13,4)	0,34 (0,04–2,71)	0,26
Aids	1 (5,0)	17 (14,3)	0,32 (0,04–2,52)	0,23
Imunossupressão iatrogênica	6 (30,0)	46 (38,7)	0,68 (0,24–1,90)	0,62
Cirurgia prévia	13 (65,0)	49 (41,2)	2,65 (0,99–7,31)	0,08
Internação em Unidade de Terapia Intensiva	11 (55,0)	32 (26,9)	3,2 (1,26–8,76)	0,02
Tempo de hospitalização ^b	24,5 (14–42,5)	11 (4–30)	–	0,02
Sítio de infecção				
Trato respiratório inferior	8 (40,0)	61 (51,3)	0,63 (0,24–1,66)	0,49
Trato urinário	7 (35,0)	25 (21,0)	2,03 (0,73–5,61)	0,28
Tecidos moles	1 (5,0)	11 (9,2)	0,52 (0,06–4,24)	0,46
Outros sítios	4 (20,0)	26 (21,8)	0,89 (0,28–2,90)	0,56
Infecção polimicrobiana	4 (20,0)	51 (42,9)	0,33 (0,11–1,06)	0,05

Tabela 2. Cont.

Variáveis	MBL + (n=20)	MBL – (n=119)	OR (IC 95%)	P
Exposição a antibióticos				
β-lactâmicos	12 (60,0)	29 (24,4)	4,66 (1,73–12,50)	<0,01
Fluorquinolonas	6 (30,0)	19 (16,0)	2,26 (0,77–6,61)	0,23
Vancomicina	4 (20,0)	20 (16,8)	1,24 (0,37–4,09)	0,47
Aminoglicosídeos	0 (0,0)	5 (5,2)	–	0,45
Anaerobicidas	5 (25,0)	24 (20,2)	1,32 (0,44–3,99)	0,85
Presença de dispositivo				
Cateter urinário	17 (85,0)	59 (49,6)	5,76 (1,60–20,70)	<0,01
Cateter venoso central	16 (80,0)	70 (58,8)	2,80 (0,88–8,89)	0,06
Tubo endotraqueal	9 (45,0)	37 (31,1)	1,81 (0,69–4,75)	0,33

NOTA. Valores são número (%) a menos que indicado de outro modo. OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança.

^aMédia ± desvio padrão

^bMediana (percentil 25%-75%)

Tabela 3. Análise multivariada dos fatores de risco para infecção por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase.

Variável	Hospital 1		Hospital 2	
	OR (IC 95%)	<i>P</i>	OR (IC 95%)	<i>P</i>
β -lactâmicos	4,66 (2,12–10,24)	<0,001	4,30 (1,55–11,95)	<0,01
Fluorquinolonas	8,55 (2,13–34,25)	<0,01	–	–
Insuficiência renal	3,43 (1,34–8,78)	0,01	–	–
Infecção do trato urinário	3,26 (1,27–8,43)	0,02	–	–
Cateter urinário	–	–	5,33 (1,45–19,65)	0,01
Doença neurológica	2,77 (1,28–6,03)	0,01	–	–

NOTA. OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança.

7 ANEXOS

7.1 Questionário de Pesquisa

INFLUÊNCIA DA PRODUÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASE NA MORTALIDADE DE INFECÇÕES POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Instituição: HSL () HCPA ()

Nome: _____ Sexo (m) (f) Idade: _____ anos

Registro: _____ Leito: _____ Data da Internação: _____ / _____ / _____

Data do isolamento: _____ / _____ / _____ Material: _____

Registro do laboratório: _____ Registro do Lab. de Microbiologia: _____

Perfil de Sensibilidade: imipenem () MIC: _____ meropenem () MIC: _____

aztreonam () MIC: _____ piperacilina-tazobactam () MIC: _____

cefepima () MIC: _____ ceftazidima () MIC: _____ ciprofloxacina () MIC: _____

amicacina () MIC: _____ gentamicina () MIC: _____

Desfecho principal na internação hospitalar:

1. Óbito () Alta () Se óbito: relacionado () não-relacionado ()

Desfechos secundários:

2. Cura clínica da infecção: sim () não ()

3. Tempo de hospitalização após infecção: _____ dia(s)

4. Instabilidade hemodinâmica decorrente da infecção? sim () não ()

Se sim, tempo: _____ dia(s)

5. Ventilação mecânica durante infecção? sim () não ()

Se sim, tempo: _____ dia(s)

6. Recidiva da infecção por *P. aeruginosa*? sim () não () Intervalo: _____ dia(s)

Óbito decorrente de recidiva: sim () não ()

7. Necessidade de procedimento cirúrgico para o tratamento da infecção? sim () não ()

8. Cura microbiológica? sim () número de culturais negativos após término de tto: _____

não () número de culturais positivos após término de tto: _____

9. Efeitos adversos relacionados ao antimicrobiano: nefrotoxicidade () leucopenia ()

neutropenia () plaquetopenia () aumento de transaminases () neurotoxicidade ()

10. Doença(s) de base: cardio-vascular () pulmonar () cerebro-vascular ()

outras doenças do sistema nervoso central () hepatopatia () insuficiência renal () aparelho digestivo () tecido conjuntivo () DM () neoplasia maligna ()

doença linfoproliferativa () outras doenças hematológicas () HIV/Aids ()

11. Escore de Charlson: _____

12. Quadro clínico associado no momento do isolamento: sepse () sepse grave () choque séptico () disfunção de múltiplos órgãos e sistemas () nenhum ()

13. Presença de imunossupressão iatrogênica no momento do isolamento:

neutropenia induzida por quimioterápicos () corticoterapia () uso de outras drogas imunossupressoras ()

14. Sítio de infecção: pulmonar () trato urinário () pele e tecidos moles ()
cateter venoso () trato digestivo () sistema nervoso central ()
corrente sanguínea () outros () _____;

15. Infecção em mais de 1 sítio? sim () não ()

16. Presença de metástases sépticas? sim () não ()

17. Infecção polimicrobiana? sim () não () se sim, germe: _____

18. Presença de bacteremia associada? sim () não ()

19. Infecções por outros microorganismos associada? sim () não ()

Se sim, sítio: _____ germe: _____

20. Antibioticoterapia prévia ao isolamento? sim () não ()

Se sim, qual(is)? _____

21. Adequação do tratamento empírico? sim () não ()

22. Tratamento empírico empregado: _____

Posologia: _____

23. Adequação do tratamento definitivo? sim () não ()

24. Tratamento definitivo empregado: _____

Posologia: _____

25. Tempo decorrido do momento do isolamento até adequação do tratamento antibiótico:

_____ dia(s)

26. Procedimento cirúrgico prévio? sim () não ()

27. Presença de procedimento invasivo:

cateter venoso central () sonda vesical de demora () tubo endotraqueal ()

dreno () nutrição parenteral () outros () _____

28. Densidade de culturas solicitadas: _____

7.2 Escore de Comorbidades de Charlson

DOENÇAS	
1 Ponto	Infarto Agudo do Miocárdio Insuficiência Cardíaca Congestiva Doença Vascular Periférica Acidente Vascular Encefálico Demência Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica Doença do tecido conjuntivo Doença hepática leve Úlcera péptica Diabetes Melitus (DM)
2 Pontos	Hemiplegia Doença renal moderada ou grave DM com dano em órgão alvo Qualquer tumor Leucemia Linfoma
3 pontos	Doença hepática moderada ou grave
6 pontos	Tumor sólido metastático Aids
TOTAL DE PONTOS	

Definições:

DM com dano em órgão alvo: retinopatia, neuropatia, nefropatia.

Incluir também se cetoacidose ou coma hiperosmolar

Doença renal grave: hemodiálise, transplantados, urêmicos.

Moderada: creatinina >3. Leve: creatinina entre 2-3.

Doença hepática grave: cirrose, hipertensão portal ou sangramento de varizes esofágicas (prévio ou atual). Moderada: cirrose, hipertensão portal sem sangramento de varizes esofágicas. Leve: cirrose sem hipertensão portal.

Resumo da referência:

Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40: 373–83.

The objective of this study was to develop a prospectively applicable method for classifying comorbid conditions which might alter the risk of mortality for use in longitudinal studies. A weighted index that takes into account the number and the seriousness of comorbid disease was developed in a cohort of 559 medical patients. The 1-yr mortality rates for the different scores were: "0", 12% (181); "1-2", 26% (225); "3-4", 52% (71); and "greater than or equal to 5", 85% (82). The index was tested for its ability to predict risk of death from comorbid disease in the second cohort of 685 patients during a 10-yr follow-up. The percent of patients who died of comorbid disease for the different scores were: "0", 8% (588); "1", 25% (54); "2", 48% (25); "greater than or equal to 3", 59% (18). With each increased level of the comorbidity index, there were stepwise increases in the cumulative mortality attributable to comorbid disease (log rank $\chi^2 = 165$; p less than 0.0001). In this longer follow-up, age was also a predictor of mortality (p less than 0.001). The new index performed similarly to a previous system devised by Kaplan and Feinstein. The method of classifying comorbidity provides a simple, readily applicable and valid method of estimating risk of death from comorbid disease for use in longitudinal studies. Further work in larger populations is still required to refine the approach because the number of patients with any given condition in this study was relatively small.