

Estudo da Resposta de Cepas de *Pseudomonas Aeruginosa* a Quatro Antibióticos B-lactâmicos e três Aminoglicosídeos "in vitro"

LUIZ EDUARDO BERMUDEZ
Comissão de Controle de Infecção Hospitalar – INCa.

ERALDO VIDAL
Chefe de Bacteriologia – INCa.

VERA MARIA MARQUES SILVA
Bióloga da Bacteriologia – INCa.

MONICA MANES SILVA
Bióloga da Bacteriologia – INCa.

JULIO CESAR CARESTIATO
Bioquímico da Bacteriologia – INCa.

EDUARDO BRAZ NETO
Biólogo da Bacteriologia – INCa.

Até o aparecimento da carbenicilina no fim da década de 60, praticamente nenhuma penicilina ou cefalosporina exibia atividade significativa contra a *Pseudomonas aeruginosa*.¹ Nos últimos dez anos, um número cada vez maior de antibióticos B-lactâmicos têm sido isolados;² porém no INCa, somente a cefalotina, cefalexina, ampicilina e a carbenicilina estão disponíveis para o uso clínico.

Os aminoglicosídeos representam uma classe de antimicrobianos com atividade contra a *Pseudomonas aeruginosa*. Porém mais recentemente têm sido descritas, com frequência cada vez maior, cepas de *P. aeruginosa* resistentes à gentamicina, tobramicina e até mesmo à amicacina.^{3,4,5,6} Plasmídeos das cepas de *Pseudomonas* resistentes têm sido isolados, mostrando que a resistência aos antimicrobianos é transmitida, de uma

bactéria para outra, por conjugação.^{5,6,7}

No Hospital do Instituto Nacional do Câncer (INCa), a incidência de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* corresponde a 23,9% dos casos identificados. Sabe-se que em infecções causadas por este germe, para que a terapêutica seja eficaz, é necessária a utilização de associação antibiótica, mais especificamente um aminoglicosídeo e um antibiótico B-lactâmico, que possuam ação sinérgica.^{8,9} No Hospital do INCa, as infecções por *Pseudomonas aeruginosa* têm-se tornado um problema sério, desde o aparecimento de cepas resistentes a todas as drogas disponíveis.⁶

A carbenicilina é um derivado da benzilpenicilina (α -carboxibenzilpenicilina) com atividade bactericida contra a *P. aeruginosa*. A amicacina parece ser o aminoglicosídeo de maior atividade

contra a *Pseudomonas* devido à raridade de enzimas capazes de inativar a ação da droga.¹⁰ O baixo grau de sensibilidade da *P. aeruginosa* à carbenicilina em nosso hospital e a detecção de micro-epidemia por cepas resistentes à amicacina, o que pode acarretar na transmissão desta tendência às demais cepas existentes no hospital, levaram-nos a estudar comparativamente a resposta da *Pseudomonas aeruginosa*, "in vitro", aos antibióticos B-lactâmicos e aos aminoglicosídeos mais utilizados.

MÉTODOS:

ANTIBIÓTICOS: Os antibióticos são fornecidos pelas indústrias farmacêuticas fabricantes. A Ampicilina é sal da Roche, a Cefalotina da Lilly. A Carbenicilina é fornecida pela Beecham e a Cefalexina pela Lorenzini. A Amicacina e Gentamicina foram forneci-

das pela CEME e a Tobramicina pela Lilly.

As concentrações utilizadas foram preparadas com água destilada estéril.

CEPAS BACTERIANAS: As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas em infecções diversas no Hospital do INCa; aproximadamente em 25% das infecções do trato respiratório, 31% das infecções cirúrgicas, 29% das infecções urinárias, e os 15% restantes das infecções de pele, líquido pleural, sangue e outras. As cepas foram cultivadas em ágar sangue e CETRIMIDE (NNN tri-metilamônia 0,5g/l) durante 18 a 24 hs., sendo identificadas após este período, por provas bioquímicas específicas.

ANTIBIOGRAMAS: A susceptibilidade das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos foi estudada em placas pela técnica de difusão com discos de Kirby-Bauer.¹¹ Diversas amostras foram submetidas a diluições para identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM dos antibióticos foi estipulada pelo método de diluições progressivas da droga para um mesmo inócuo de bactérias. O material é deixado em estufa a 37° durante 18 hs., sendo a leitura realizada através da turvação do meio. As dosagens utilizadas como CIM nos discos empregados foram de: 100 ug/ml para a carbenicilina, 10 ug/ml para a ampicili-

na, 30 ug/ml para a cefalotina, 30 ug/ml para a amicacina, 10 ug/ml para a gentamicina, 30 ug/ml para a tobramicina e 30 ug/ml para a cefalexina. O meio utilizado para as diluições foi o de Mueller-Hinton. As placas foram lidas após 24 horas de incubação a 37° C. A CIM foi considerada como a mais baixa concentração de antibiótico inibindo o crescimento visível.

RESULTADOS

Foi estudada a sensibilidade de 218 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no Hospital do INCa, aos antibióticos B-lactâmicos e aminoglicosídeos.

PENICILINAS E CEFALOSPORINAS: Duas penicilinas e duas cefalosporinas foram testadas. A ampicilina apresentou pouca atividade contra as amostras em teste. Apenas 3% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas em feridas cirúrgicas (secreção abdominal), foram sensíveis. Todas as amostras isoladas na urina, trato respiratório, sangue, pele e líquido foram resistentes ao antibiótico. A cefalotina e cefalexina tiveram comportamento semelhante entre si, apresentando baixa atividade, principalmente porque as concentrações utilizadas foram de 30 ug/ml. Em concentrações de 16 ug/ml de cefalotina, apenas 4,6% das amostras iso-

ladas na urina, 5,5% no trato respiratório, 11% no sangue (p 0,10), 7,5% nas secreções cirúrgicas, 66% no líquido e 10% na pele foram sensíveis. A carbenicilina, penicilina anti-pseudomonas, também mostrou pequena atividade contra as amostras de *P. aeruginosa* identificadas. Em estudo realizado no nosso hospital (Bermudez, em comunicação pessoal), a sensibilidade das *P. aeruginosa* à carbenicilina era de aproximadamente 80% até 6 meses atrás. Porém através da aquisição de resistência, provavelmente induzida geneticamente, as amostras de *P. aeruginosa* isoladas no hospital mostram-se atualmente produtoras de grande quantidade de B-lactamases.

Nas 218 amostras estudadas a carbenicilina foi ativa contra 12,5% das cepas isoladas na urina, 24% no trato respiratório, 45% no sangue, 25,4% em feridas cirúrgicas e em 15% na pele. As cepas foram resistentes até mesmo a concentrações de 138,3 ug/ml de carbenicilina.

AMINIGLICOSÍDEOS: As atividades dos três aminoglicosídeos testados foram relativamente desiguais (tabela 1). A gentamicina, menos ativa, inibiu poucas cepas em concentrações de 8 ug/ml. A amicacina mostrou CIM mais baixas, com grande número de cepas susceptíveis a concentrações de 0,5 ug/ml. A amicacina foi capaz de inibir o

Tabela 1
Atividade comparativa de 7 antibióticos contra 218 amostras de *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Urina	Secreção Respirat.	Sangue	Secreção Cirúrgica	Líquor	Pele
Cefalotina	3(4,6%)	3(5,5%)	1(11%)	5(7,5%)	2(66%)	2(10%)
Amicacina	52(81,6%)	52(95 %)	9(100%)	60(90 %)	—	18(90%)
Ampicilina	—	—	—	3(4,8%)	—	—
Tobramicina	38(59,4%)	26(47 %)	1(11%)	31(47 %)	—	8(40%)
Gentamicina	21(33 %)	20(37 %)	1(11%)	28(42 %)	—	3(15%)
Cefalexina	2(40 %)	5(6,2 %)	—	8(8,0%)	—	—
Carbenicilina	8(12,5%)	13(24 %)	4(45%)	17(25,4%)	—	3(15%)

crescimento de 81,6% das *Pseudomonas* isoladas na urina, 95% no trato respiratório, 100% no sangue, 90% em feridas cirúrgicas e 90% na pele. A tobramicina em concentrações de 30 ug/ml foi ativa contra 59,4% das amostras isoladas na urina, 47% no trato respiratório, 11% no sangue, 47% em infecções cirúrgicas, e 40% na pele.

CONCLUSÕES

Este estudo examinou a resposta "in vitro" de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a quatro penicilinas e três aminoglicosídeos. Das quatro penicilinas testadas, nós encontramos uma resposta muito fraca da *Pseudomonas aeruginosa* à ampicilina, cefalotina e cefalexina, fato já firmado há muitos anos, já que estas drogas são extremamente sensíveis à B-lactamases das *Pseudomonas*. O achado de que 66% das cepas isoladas em líquido são sensíveis à cefalotina, não tem explicação possível até o momento, já que corresponde a apenas dois casos encontrados.² Em relação à carbenicilina, nós podemos classificar as cepas em resistentes, susceptíveis e hipersusceptíveis; sendo as últimas aquelas sensíveis a concentrações plasmáticas de carbenicilina em torno de 23 ug/ml. Estas cepas dificilmente são encontradas. A grande maioria das cepas encontradas na prática clínica, ou tem CIMs de 30-64 ug/ml, ou são resistentes à droga.¹¹ Em nosso hospital, a percentagem de *Pseudomonas* resistentes à carbenicilina é extremamente grande, fato que vem ocorrendo principalmente nos últimos seis meses. Em trabalho realizado previamente, mostramos que a carbenicilina é utilizada somente em casos suspeitos ou comprovados de infecção por *P. aeruginosa*,¹² o que torna menos provável a

indução de resistência pelo uso indiscriminado da droga; isto é, resistência por indução genética. Existe a possibilidade de que o uso indiscriminado de outros antibióticos B-lactâmicos possa induzir a produção de B-lactamases capazes de inativar a ação da carbenicilina. É de interesse comentar que o número de cepas isoladas de *Pseudomonas* resistentes à carbenicilina começou a crescer em período subsequente a um importante aumento no consumo de cefalosporinas no hospital (Bermudez, comunicação pessoal). Esse fenômeno já foi descrito anteriormente em relação aos aminoglicosídeos,¹³ e precisa de maiores estudos para ser comprovado ou não.

Entre os aminoglicosídeos estudados, somente a amicacina foi efetiva contra quase todas as cepas isoladas, excetuando-se as isoladas na urina, contra as quais a amicacina foi efetiva em 81,6% dos casos. Esta resistência aumentada das cepas encontradas na urina, em relação às encontradas em secreções respiratórias, sangue, infecções cirúrgicas e pele talvez possa ser explicada pela freqüente transmissão de resistência entre as bactérias encontradas em infecções urinárias.¹⁴ Os estudos epidemiológicos previamente realizados indicam que provavelmente esta resistência é mediada por plasmídeos.⁶

É interessante notar a distribuição bimodal das cepas resistentes à tobramicina. Apenas uma cepa das nove isoladas no sangue foi sensível à droga, enquanto aproximadamente 50% das cepas isoladas em outros locais foi sensível à mesma. Apesar do número de cepas não ser grande, a porcentagem de 11% de sensibilidade encontrada é significativa. A resistência dessas cepas poderia ser devida à produção de enzimas inativantes da droga. Esta hipótese torna-se mais provável quando

verificamos que fenômeno relativamente semelhante ocorre em relação à gentamicina, e não ocorre em relação à amicacina. Das hidroxilases e fosforilases produzidas pelos gram-negativos, apenas uma é capaz de inativar a amicacina, enquanto que todas as seis têm capacidade de inativar tanto a tobramicina quanto a gentamicina.¹⁵ A gentamicina também apresentou baixo poder de ação contra a *Pseudomonas*, o que se deve provavelmente ao uso da droga em larga escala no hospital.

Concluindo, três pontos devem ser enfatizados. Primeiro, as cefalosporinas ou possuem CMI muito alta contra as *Pseudomonas*, ou não são efetivas, não devendo ser utilizadas em infecções por este germe. Em segundo, dos açúcares aminados, a amicacina é a de maior poder de ação; porém deve ser usada com muito critério quando o paciente apresentar infecção urinária por *Pseudomonas*. E, em terceiro, é sempre bom ter em mente o que parece ser, para alguns antibióticos, o contraste entre a bem conhecida atividade "in vivo" e os pobres resultados "in vitro".^{16,17}

SUMMARY

Two hundred eighty one *Pseudomonas aeruginosa* isolates were tested for their susceptibility to four penicillins and three aminoglycosides, by the agar diffusion and agar dilution methods. Amikacin was the most active of seven B-lactam and aminode sugars antibiotics, inhibiting 95% of the strains, except when these were isolates of urinary tract infections. Penicillins and cephalosporins showed poor activity. Among others aminoglycosides, tobramycin inhibited nearly 50% of the strains tested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KNUDSEN, E.T.; ROLINSON, G.N.; SUTHERLAND, R. — Carbenicillin: a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. Br. Med. J., 3:75, 1967.

2. ZAK, O. — *Antibiotics and Pseudomonas aeruginosa*. In L.D. Sabath (ed.) *Pseudomonas aeruginosa*. Huber, Bern, 1980, 133-159.
3. BRYAN, L.E.M.S.; SHAHRABADI — *Gentamicin resistance in P. aeruginosa: R-factor mediated resistance*. Antimicrob. Agents Chemother., 6:919, 1974.
4. HOLMES, R.K.; MINSHEW, B.H.; GOULD, K.; et al. — *Resistance of P. aeruginosa to gentamicin and related aminoglycoside antibiotics*. Antimicrob. Agents Chemother., 6:253, 1974.
5. JACOBY, G.A. — *Properties of R plasmids determining gentamicin resistance by acetylation in P. aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 6:239, 1974.
6. PANZA, M.; BERMUDEZ, L.E.; VIDAL, E.; col. — *Boletim da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do INCa*, Dez. 82.
7. KATO, T.; SATO, Y.; et al. — *Plasmid-mediated Gentamicin resistance of Pseudomonas aeruginosa and its lack of expression in E. coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 22:358, 1982.
8. YU, V.L.; FELEGIE, T.P.; YEE, R.B.; et al. — *Synergistic interaction in vitro with use of three antibiotics simultaneously against Pseudomonas*. J. Infect. Dis., 142:602, 1980.
9. BODEY, G.P.; et al. — *B-lactam antibiotics alone or in combination with gentamicin for therapy of gram negative bacillary infection in neutropenic patient*. Am. J. Med. Sci., 271:179, 1976.
10. DAVES, J.; COURVALIN, P. — *Mechanisms of resistance to aminoglycosides*. Am. J. Med., 62:868, 1977.
11. NOGUCHI, H.; KUBO, M.; et al. — *Antibacterial activity of apalcillin (PC-904) against gram-negative bacilli, especially ampicillin, carbenicillin and gentamicin-resistant clinical isolates*. Antimicrob. Agents Chemother., 13:745, 1978.
12. AGUIAR, N.; BERMUDEZ, L.E.; VIDAL, E.; et al. — *Controle da infecção hospitalar no Instituto Nacional do Câncer*. Rev. Bras. Cancerol., 29(1):7, 1982.
13. YOUNG, L. — *Use of Amikacin in patients with leucopenia*. International Symposium of Leukemia. St. Jude Children's Research Hospital Memphis, Tenn., 1978.
14. BERMUDEZ, L.E.; PANZA, M.; VIDAL, E. — *Análise dos fatores relacionados à incidência de infecções urinárias em pacientes com câncer*. Rev. Bras. Cancerol. (Nesta edição).
15. EISENSTEIN, B. — *Antibiotic action*. In Stollerman, *Advances in Internal Medicine*. Year Book Medical Publ., Chicago, III, 1981.
16. CANAWATI, H.; WITTE, J.; et al. — *Temperature effect on the susceptibility of Methicillin-resistant S. aureus to four different Cephalosporins*. Antimicrob. Agents Chemother., 21:173, 1982.
17. RICHMOND, M.H. — *Resistance of P. aeruginosa to antibiotics*. In L.D. Sabath (ed.) *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes, and their treatment*. Huber, Bern, 1980, pp. 176-192.