

# Resistência da *Pseudomonas Aeruginosa* à Carbenicilina. Avaliação do Teste de Difusão em Placa

LUIZ EDUARDO BERMUDEZ  
EDUARDO BRAZ NETO  
ERALDO VIDAL

Departamento de Microbiologia e Comissão de Controle de Infecção Hospitalar — Hospital do INCa — Rio de Janeiro

As infecções por *Pseudomonas aeruginosa* têm se tornado um grande problema em pacientes com câncer.<sup>1,3</sup> Isto se deve à resistência deste organismo à maioria dos antibióticos que inibem muitas outras bactérias,<sup>4,5</sup> o que por sua vez, o torna a principal causa de mortalidade entre os pacientes hospitalizados.<sup>6</sup> A terapia para as infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, particularmente em pacientes neutropênicos, foi praticamente ineficaz até à introdução da gentamicina e da carbenicilina no final dos anos 60.<sup>7,9</sup> Desde então, numerosos trabalhos<sup>8,9</sup> têm documentado o valor da carbenicilina, associada ou não a aminoglicosídeos, na terapia de tais infecções. Estudos ocasionais<sup>10,11</sup> relatam a resistência da *Pseudomonas aeruginosa* adquirida durante o tratamento com carbenicilina,

quando essa droga foi utilizada isoladamente. Recentemente, tem sido relatado na literatura um aumento na resistência da *P. aeruginosa* à carbenicilina, mesmo quando utilizada em associação com outros antibióticos.<sup>4,11</sup>

Em nosso Hospital, observou-se um importante aumento na resistência da *Pseudomonas aeruginosa* à carbenicilina nos últimos 14 meses. Existem evidências epidemiológicas de que essa resistência tenha provavelmente ocorrido por indução enzimática na bactéria, secundária ao uso em demasia das cefalosporinas.<sup>5</sup>

Neste estudo, examinamos a relação entre a sensibilidade encontrada à carbenicilina no antibiograma realizado pelo método de difusão em placa e no realizado pelo método de diluições progressivas, a fim de

confirmar o alto grau de resistência observada no Hospital.

## MÉTODOS

**BACTÉRIAS:** Trinta amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas no Hospital, no período de março a maio de 1983; todos os organismos isolados produziram infecção de sítios diferentes. As bactérias foram cultivadas imediatamente em ágar-sangue e CETRIMIDE (NNN tri-metilamônia 0,5 g/l) durante 18 a 24 horas, sendo identificadas após este período por provas bioquímicas específicas, no laboratório de Microbiologia do INCa. Todas as *Pseudomonas* eram resistentes à ação da carbenicilina, pelo método da difusão em placa, incubada durante 18 a 24 horas.

**ANTIBIOGRAMAS:** A sensibilidade das amostras de

*Pseudomonas aeruginosa* foi estudada primeiramente em placa pela técnica de difusão com discos, de Kirby-Bauer.<sup>1,2</sup> Após confirmada a resistência em placa, utilizando discos de carbenicilina contendo uma concentração de 100 ug/ml (Laboratório Victor Lorian — Rio de Janeiro), as amostras foram submetidas a uma bateria de concentrações seriadas de carbenicilina (Laboratório Glaxo), isto é, a suspensão inicial contendo 833,3 ug/ml de carbenicilina foi sucessivamente diluída à metade. A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada pelo crescimento visual e correspondeu à mais baixa concentração da droga que inibiu o crescimento visível de qualquer bactéria.<sup>1,3</sup> O meio utilizado em ambos os métodos foi o de Mueller-Hinton. As placas e os tubos foram lidos após incubação em estufa a 37° C, durante 18 a 24 horas.

## RESULTADOS

Foram estudadas trinta amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diversos sítios, em pacientes internados no Instituto Nacional do Câncer. As *Pseudomonas* eram escolhidas por apresentarem resistência à carbenicilina quando a sensibilidade foi testada pelo método de difusão em placa. Das cepas isoladas, 33% o foram de urina, 24% de secreção de vias respiratórias, 14% de colonização intestinal, 10% do sangue e 19% de secreção de ferida cirúrgica. Não foi observada qualquer relação entre o sítio de infecção e o fato das *Pseudomonas* apresentarem sensibilidade diferente à carbenicilina quando esta foi testada pelo método de diluições sucessivas.

As concentrações de carbenicilina, usadas no método de diluições sucessivas estão na tabela 1. Das trinta amostras testadas, 7 (23%) apresentaram sensibilidade à ação da carbenicilina em concentrações menores do que 100 ug/ml. Destas, quatro (13%) apresentaram sensibilidade a concentrações menores do que 23,3 ug/ml. As outras três (10%), apresentaram sensibilidade à carbenicilina na concentração de 83 ug/ml, isto é, muito próxima da encontrada no disco de papel. Vinte e duas bactérias (73%) apresentaram resistência à ação da carbenicilina mesmo em concentrações muito altas, como 833 ug/ml. Apenas uma bactéria (3%) apresentou sensibilidade a 138 ug/ml, dosagem também próxima da encontrada no disco de papel. Em relação ao total, em 23 das 30 bactérias testadas (76%) a sensibilidade testada pelo método de diluição sucessiva foi semelhante à encontrada pelo método de difusão em placa.

## CONCLUSÕES

Resistência à ação da carbenicilina tem sido encontrada em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em diversos hospitais.<sup>9,10,11,14</sup> Muitas vezes essa resistência é adquirida na vigência do tratamento, principalmente quando a carbenicilina é utilizada como droga única.<sup>10,13</sup> Em nosso hospital, após o início do uso em grande escala de cefalosporinas, nós observamos um aumento acentuado na resistência das *Pseudomonas aeruginosas* isoladas à carbenicilina, quando testadas "in vitro".<sup>5</sup> Sabe-se que o desenvolvimento de resistência de uma bactéria a um antibiótico é

grandemente devido à frequência com que tal antibiótico é usado.<sup>15</sup> Recentemente tem-se observado que alguns antibióticos beta-lactâmicos são capazes de induzir a produção de beta-lactamases pelas bactérias gram-negativas,<sup>16</sup> tornando-as resistentes a diversos antibióticos beta-lactâmicos.

Das formas de resistência da *Pseudomonas aeruginosa* à carbenicilina, isto é, por diminuição da afinidade da carbenicilina pela proteína ligadora de penicilina,<sup>17</sup> transferência de plasmídeos<sup>18</sup> ou produção de beta-lactamase geneticamente mediada, induzida pela presença do antibiótico, aquela encontrada no Hospital do INCA parece dever-se principalmente aos dois últimos mecanismos citados. Tal resistência múltipla a antibióticos beta-lactâmicos, parece ser devida à seleção de mutantes geneticamente reprimidos em cepas possuindo penicilinases cromossomiais induzíveis.<sup>19,20</sup>

Como o grau de resistência encontrada "in vitro" à carbenicilina não correspondeu ao grau de cura das infecções, já que dos trinta casos estudados 21 (70%) obtiveram cura utilizando a carbenicilina sempre associada a aminoglicosídeos, nós comparamos os resultados dos testes de sensibilidade por disco com os resultados obtidos através da diluição sucessiva dos antibióticos. Observou-se que 23% das amostras testadas mostravam-se sensíveis a concentrações de carbenicilina encontradas "in vivo", isto é, concentrações abaixo de 100 ug/ml. Quatro das amostras (13%) mostravam sensibilidade a concentrações de 23,3 ug/ml, concentrações estas capazes de ser encontradas em todos os tecidos do organismo. Mesmo a pequena significância encontrada neste estudo, le-

vanta a possibilidade de que o disco de carbenicilina contendo 100 ug/ml da droga, não seja capaz de oferecer resultado confiável em alguns casos. Algumas hipóteses poderiam explicar este achado: 1) a concentração da droga encontrada no disco é baixa, não permitindo concentrações adequadas nas regiões circunscritas; 2) a difusão da carbenicilina no meio de Mueller-Hinton sofre variações por fatores outros não estudados; 3) variações de temperatura, pH e tempo de incubação podem alterar a produção de beta-lactamase pelas bactérias, ou ainda 4) alterar a atividade da enzima em relação ao antibiótico; e finalmente, 5) que algumas dessas cepas já tenham tido contato prévio com a carbenicilina, principalmente através do tratamento clínico, com posterior indução genética para a produção enzimática, e que após a semeadura laboratorial tenham perdido total ou parcialmente essa propriedade. Estas variações já foram descritas anteriormente por outros autores e observadas em nosso laboratório, em relação às beta-lactamases produzidas pelo *Staphylococcus aureus*<sup>2,1</sup> quando estudada a sensibilidade à oxacilina e cefalosporinas.

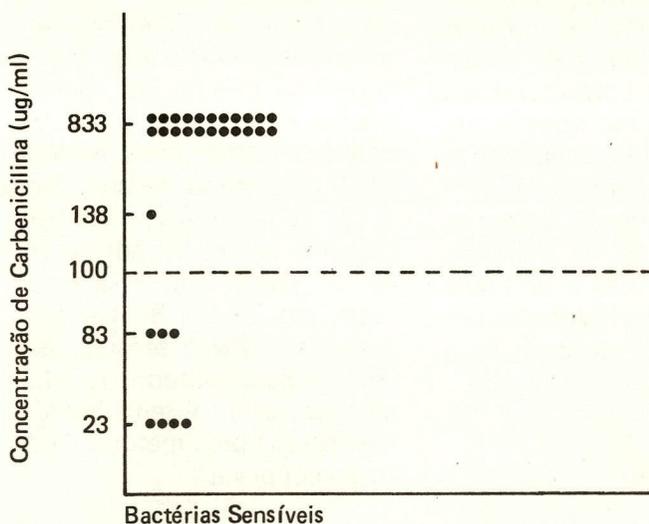
Em conclusão, estes dados mostram que a incidência de resistência da *Pseudomonas aeruginosa* isolada em nosso hospital é alta, porém é necessário aperfeiçoar-se o antibiograma em placa para a carbenicilina, já que em diversos casos foi observada discordância entre o resultado obtido em placa e aquele obtido por diluição em caldo. Ampliando o estudo, pudemos observar que existe uma boa correlação entre um halo de inibição de 19 mm ou mais e uma CIM de 100 ug/ml ou menos. Portan-

to, as dúvidas no método somente ocorrem quando a bactéria é pouco sensível ou resistente à droga, isto é, apresenta CIM que excede 100 ug/ml.

3. FORKNER, C.E.; FREI, E.; EDG-COMB, J.H.; UTZ, J.P. — *Pseudomonas septicemia: observations of twenty-three cases*. Am. J. Med., 25:877, 1958.
4. BROWN, M.R.W. — *Resistance of Pseudomonas aeruginosa*. John Wi-

**Tabela 1**  
Número de bactérias sensíveis a cada concentração testada

Concentração	Número de Bactérias Sensíveis (%)
23,3 ug/ml	4 (13%)
83,0 ug/ml	3 (10%)
138,0 ug/ml	1 (4%)
833,3 ug/ml	22 (73%)



## SUMMARY

*Thirty isolates of carbenicillin-resistant Pseudomonas aeruginosa, using the disk diffusion test were studied for "in vitro" susceptibility to carbenicillin using broth dilution method. Differences between the methods were observed when the bacterias were sensitive for lower concentrations of carbenicillin.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FISHMAN, L.S.; ARMSTRONG, D. — *Pseudomonas aeruginosa bacteremia in patients with neoplastic disease*. Cancer, 30:764, 1972.
2. WHITECAR, J.P., Jr.; LUNA, M.; BODEY, G.P. — *Pseudomonas bacteremia in patients with malignant diseases*. Am. J. Med. Sci., 260:216, 1970.

- ley, Inc, New York, 1975.
5. BERMUDEZ, L.E.; VIDAL, E.; MARQUES SILVA, V.M., al. — *Estudo da resposta de cepas de Pseudomonas aeruginosa à quatro antibióticos beta-lactâmicos e três aminoglicosídeos "in vitro"*. Rev. Bras. Cancerol.: in press.
6. BERMUDEZ, L.E. — *Comunicação Pessoal*.
7. CURTIN, J.A.; PTERSDORF, R.G.; BENNETT, I.L. — *Pseudomonas bacteremia: review of ninety-one cases*. Ann. Intern. Med., 54:1077, 1961.
8. MC HENRY, M.C.; GAVAN, T.L.; VANOMMEN, R.A., al. — *Therapy with gentamicin for bacteremic infections: results with 53 patients*. J. Infect. Dis., 124:S164, 1971.
9. SOLBERG, C.O.; KJELLSTRAND, K.M.; MATSEN, J.M. — *Carbenicillin therapy of severe Pseudomonas aeruginosa infections*. J. Chronic. Dis., 24:19, 1971.
10. HOLMES, K.K.; CLARK, H.; al — *Emergence of resistance in Pseudomonas during carbenicillin therapy*. Antimicrob. Agents Chemother.,

- 9:391, 1969.
11. SNELLING, C.F.T.; RONALD, A.R., al. — *Resistance of gram-negative bacilli to gentamicin and carbenicillin*. J. Infect. Dis., 124:S264, 1971.
  12. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERIS, J.C. — *Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol., 45:493, 1966.
  13. *Manual of Clinical Microbiology*, edited by Blair, J.E.; Lennett, E.H.; Truant, J.P.; Bethesda, American Society for Microbiology, 1970.
  14. GREENE, W.; MOODY, M., al. — *Pseudomonas aeruginosa resistant to carbenicillin and gentamicin*. Ann. Intern. Med., 79:684, 1973.
  15. FINLAND, M. — *Changing patterns of susceptibility of common bacterial pathogens to antimicrobial agents*. Ann. Intern. Med., 76:1009, 1972.
  16. SANDERS, C.C.; SANDERS, W.E.; GOERING, R.V. — *In vitro antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin*. Antimicrob. Agents. Chemother., 21:968, 1982.
  17. RODRIGUES-TEBAR, A.; ROJO, F., al. — *Carbenicillin resistance of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents. Chemother., 22:255, 1982.
  18. TARDIF, G.; GRANT, R. — *Transfer of INc N Plasmids to Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents. Chemother., 22:142, 1982.
  19. GOOTZ, T.D.; SANDERS, C.C.; GOERING, R.V. — *Resistance to cefamandole: derepression of beta-lactamases by cefoxitin and mutation in Enterobacter cloacae*. J. Infect. Dis., 146:34, 1982.
  20. SANDERS, C.C.; SANDERS, W.E., Jr.; GOERING, R.V. — *In vitro and In vivo antibacterial effects of combinations of beta-lactams antibiotics*. Antimicrob. Agents. Chemother., 19:634, 1981.
  21. CANAWATI, H.N.; WITTE, J.J.; SÁ-PICO, F.L. — *Temperature effect on the susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to four different cephalosporins*. Antimicrob. Agents. Chemother., 21:173, 1982.