

LIANA CARBALLO MENEZES

**AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa*
RESISTENTES A CARBAPENENS ISOLADAS EM
HOSPITAIS BRASILEIROS: PERFIL DE
SENSIBILIDADE, DETECÇÃO DE METALO-BETA-
LACTAMASE E ANÁLISE DA SIMILARIDADE
GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2005

LIANA CARBALLO MENEZES

**AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa*
RESISTENTES A CARBAPENENS ISOLADAS EM
HOSPITAIS BRASILEIROS: PERFIL DE
SENSIBILIDADE, DETECÇÃO DE METALO-BETA-
LACTAMASE E ANÁLISE DA SIMILARIDADE
GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Orientadora:
Prof^a Dr^a Ana Cristina Gales

São Paulo
2005

MENEZES, Liana Carballo

Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenens isoladas em hospitais brasileiros: perfil de sensibilidade, detecção de metalo-beta-lactamase e análise da similaridade genética/ Liana Carballo Menezes - São Paulo, 2005. ix, 100f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Título em inglês: *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenens isolated from Brazilian Hospitals: susceptibility, . metallo-beta-lactamase detection, and genetic similarity.

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. Metalo- β -lactamase 3. Resistência 4. *spm* 5. PFGE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Antonio Roberto Chacra

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

São Paulo
2005

Dedico este trabalho a minha mãe Zulma e meu pai Luiz pela dedicação, confiança e amor em todos os momentos da minha vida.

Que sempre estiveram ao meu lado e me ensinaram a superar todas as dificuldades, pois o caminho percorrido para chegar até aqui não foi nada fácil e sem o apoio de vocês eu jamais conseguiria!

AGRADECIMENTOS

A DEUS primeiramente pôr minha existência, paz, amor e pôr tudo em que eu creio e para tudo que eu vivo, sem esta fé eu jamais conseguiria.

A Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Gales pelos ensinamentos e também pôr me conceder o privilégio da sua orientação; e acima de tudo pela lição de vida que me foi transmitida. Ana, muito obrigada não apenas pelas correções deste trabalho, mas no convívio diário, você é um exemplo a ser seguido como pessoa e como profissional.

Prof^o Dr^o Hélio Silva Sader pela grande oportunidade, por me receber no LEMC com grande profissionalismo e acima de tudo por ter me concedido o privilégio de fazer parte da família LEMC.

Ao Prof^o Dr^o Antônio Carlos Campos Pignatari, pelo grandioso convívio e pelas oportunidades nesse intenso convívio.

A Maria Cristina Bronharo Tognin pelo grande companheirismo e convivência diária, por todos os conselhos e opiniões decisivas em minha vida profissional.

A Adriana Oliver Reis pelos ensinamentos que propiciaram os meus primeiros passos como pesquisadora em microbiologia.

A Andreia Penteado, Juliana Gugel, Luciana Cirilo, Thais A. Fernandes, Kelly Santiago e Juliana Bertoli pelo companheirismo diário, por estarem sempre prontas a me ajudarem e sem dúvida vocês ocupam um imenso lugar no meu coração.

A Andrea Pereira pela amizade verdadeira, pelo incentivo, pelos conselhos, por sempre ter uma palavra acolhedora nos momentos mais difíceis e sem dúvida pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

A Jussimara Monteiro pela companhia diária, não só no laboratório como em casa também. Dizer muito obrigada seria muito pouco e injusto pois afinal foram intensos meses de convívio o que sempre foi um grande prazer estar ao seu lado diretamente, uma pessoa tão amiga, tão irmã.

Aos Pós Graduandos Rodrigo Elisandro Mendes e a Mariana Castanheira. supervisores do Laboratório Especial em Microbiologia Clínica LEMC-ALERTA, pela dedicação e colaboração para a realização deste trabalho.

A amiga Suzane Silbert que me acompanha desde o primeiro dia em que cheguei no LEMC até hoje, sem ela não estaria onde estou agora. Continue sendo o que você é, uma pessoa única.

A Soraya Sgambatti de Andrade pela amizade verdadeira, pelo incentivo, pelos conselhos, por sempre ter uma palavra acolhedora nos momentos mais difíceis e sem dúvida pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

A Secretária Rosana Capecce pela amizade, carinho e convivência diária.

A Jacira Donizetti pelo seu trabalho que é fundamental no LEMC e por todas as tardes esquentar o meu coração com seus doces chás

As Meninas do IDIPA Adryella, Agda, Ângela, Mirella e Renata. por me auxiliarem na identificação das cepas deste trabalho quando precisei.

As todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente do meu trabalho, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Agente Etiológico.....	1
1.2. Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.3. Terapia antimicrobiana.....	3
1.4. Mecanismo de Resistência Antimicrobiana em <i>P. aeruginosa</i>	5
1.4.1. Alteração de permeabilidade com alteração de proteínas de membrana externa (porinas).....	6
1.4.2. Alteração do sítio de ligação do antimicrobiano.....	7
1.4.3. Mecanismo ativo de efluxo de antimicrobianos.....	8
1.4.4. Produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos.....	9
1.4.4.1. Produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos.....	9
1.4.4.2. Produção de β -lactamases.....	9
1.5. Tipagem Molecular.....	22
2. OBJETIVO.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Amostras Bacterianas.....	26
3.2. Avaliação da Sensibilidade <i>In Vitro</i> aos Antimicrobianos.....	27
3.2.1. Teste de disco-difusão.....	28
3.2.2. Microdiluição em caldo.....	29
3.3. Detecção das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtoras de metalo- β -bactamase.....	30
3.3.1.1. Testes fenotípicos.....	30
3.3.1.1.1. Disco-aproximação.....	30
3.3.1.1.2. Etest®.....	31
3.3.1.1.3. Avaliação da Hidrólise de Carbapenems.....	32
3.3.1.2. Testes genotípicos.....	33
3.3.1.2.1. Pesquisa de genes relacionados à produção de M β L <i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{VIM-2} e <i>bla</i> _{SPM-1} pela técnica da reação de polimerase em cadeia.....	33
3.3.1.2.2. Clivagem dos produtos de PCR.....	35
3.3.1.2.3. Reação de seqüenciamento.....	36
3.4. Avaliação da similaridade genética das amostras de <i>Pseudomonas</i>	37

<i>aeruginosa</i> resistentes a carbapenens.....	
3.4.1. Ribotipagem automatizada.....	38
3.4.2. Eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE).....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Amostras Bacterianas	40
4.2. Avaliação da sensibilidade in vitro a antimicrobianos das 206 amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i> pelo método de disco-difusão	42
4.3. Avaliação das amostras de <i>P. aeruginosa</i> com sensibilidade reduzida a imipenem pela metodologia da microdiluição em caldo	43
4.4. Detecção do mecanismo de resistência aos carbapenens	46
4.4.1. Detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase pelo teste de disco-aproximação e Etest [®]	46
4.4.2. Avaliação da Hidrólise de Carbapenens	49
4.4.3. Detecção dos genes que codificam as metalo- β -lactamases	50
4.5. Clivagem e seqüenciamento dos amplicons obtidos com primers <i>bla</i> _{SPM-1}	53
4.6. Tipagem Molecular	53
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	71
8. REFERENCIAS	72
7. ABSTRACT	101
7. ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Amostra de *P. aeruginosa* apresentando teste fenotípico positivo para a produção de metalo- β -lactamase. A seta indica o disco de papel de filtro estéril contendo 3 μ l de uma solução pura de ácido 2-mercaptopropiônico a 1,2 g/ml.

Figura 2 – Amostra de *P. aeruginosa* apresentando teste fenotípico positivo para a produção de metalo- β -lactamase. A seta indica o disco de papel de filtro estéril contendo 5 μ l de uma solução de EDTA a 100mM.

Figura 3 – Etest M β L positivo para amostra de *P. aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase. Notar o decréscimo > 3 diluições na MIC do imipenem associado ao EDTA em comparação a MIC de imipenem sozinho.

Figura 4 – Localização dos centros médicos com amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenems, as cidades que estão marcadas com asterisco preto apresentam amostras com o gene *bla*_{SPM-1}.

Figura 5 – Reação de PCR utilizando-se o primer *bla*_{SPM-1}.

Figura 6 – Perfil de ribotipagem dos diferentes clones de *P. aeruginosa* isoladas dos distintos centros médicos brasileiros.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases. ESBL^b conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.

Tabela 2 – Metallo- β -lactamases pertencentes às famílias IMP, VIM, SPM e GIM.

Tabela 3 – Distribuição das 206 amostras de *P. aeruginosa* coletadas dos 25 centros brasileiros entre janeiro de 2001 e junho de 2003 de acordo com o sítio corporal.

Tabela 4 – Perfil de sensibilidade in vitro a antimicrobianos das 206 amostras de *P. aeruginosa* pela técnica de disco-difusão.

Tabela 5 – Potência antimicrobiana e porcentagem de sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados contra as 85 amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem.

Tabela 6 – Variabilidade genética das 82 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 isoladas em 15 distintos centros médicos brasileiros, correlacionados ao local e sítio corpóreo de isolamento.

ABREVIATURAS

AAC – *Acetiltransferases*

AMI - *Amicacina*

ANT – *Adeniltransferases*

APH – *Fosfotransferases*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATM - *Aztreonam*

ATP – *Trifosfato de adenosina*

BHI – *Brain-Heart Infusion*

CAZ - *Ceftazidima*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevetion*

CIPRO - *Ciprofloxacina*

CPM - *Cefepima*

DIPA – *Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias*

DNA – *Ácido desoxirribonucléico*

EDTA – *Ácido etilenodiaminotetracético*

GEN - *Gentamicina*

IMP- *Imipenem*

IOP – *Instituto de Oncologia Pediátrica*

LEMC – *Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Disciplina de Doenças Infecciosas Parasitárias da UNIFESP/EPM*

MER - *Meropenem*

MIC – *Concentração inibitória mínima*

MIC50 – *Concentração inibitória mínima para 50% das amostras*

MIC90 – *Concentração inibitória mínima para 90% das amostras*

MBL – *Metallo- β -lactamase*

2-MPA – *Ácido 2-mercaptopropiônico*

MYSTIC – *Meropemem Yearly Susceptibility Test Information Collection*

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NNISS – *National Nosocomial Infections Surveillance System*

OMP - *Outer Membrane Protein*

PBPs – *Proteínas ligadoras de penicilinas*

PCR – *Reação de polimerase em cadeia*

PIP/TAZ – *Piperacilina/Tazobactam*

POLIB – *Polimixina B*

RNA – *Ácido ribonucléico*

RND – *Resistance Nodulation Division*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis*

SPM-1 – *São Paulo Metallo- β -lactamase*

UFC – *Unidades formadoras de colônias*

UTI – *Unidade de terapia intensiva*

RESUMO

As infecções causadas por *P. aeruginosa* são freqüentemente de difícil tratamento devido a sua virulência e a resistência a vários antimicrobianos. Os carbapenens são geralmente ativos contra *P. aeruginosa* multirresistentes, porém, a resistência a estes compostos tem aumentado rapidamente. As altas taxas de resistência aos carbapenens são incomuns e geralmente é um indicativo da presença de metalo- β -lactamase. O propósito deste estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens isoladas de hospitais brasileiros, detectar a presença dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} e avaliar a similaridade genética entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens. Foram avaliadas 206 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens isoladas de 2001 a 2003 de 25 centros médicos. As 206 amostras foram testadas pelo método de disco-difusão. Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com a padronização do “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS). Os isolados resistentes aos carbapenens foram triados para a produção de metalo- β -lactamases pelo teste de aproximação de discos utilizando dois inibidores enzimáticos (EDTA e ácido 2-mercaptopropiônico). A produção de M β L foi confirmada pela metodologia do Etest[®] (fita Etest[®] MBL). Em seguida foi realizada a técnica de PCR para a pesquisa dos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}. A avaliação da similaridade genética foi realizada nas amostras produtoras de M β L e em uma amostra não produtora de M β L dos centros médicos pela técnica da ribotipagem automatizada e PFGE. Foram observadas altas taxas de resistência a maioria dos antimicrobianos. As polimixinas foram os únicos agentes a inibir o crescimento de 100,0% das amostras. A produção de M β L foi demonstrada em 98 (47,6%) das 206 amostras. O gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em 82 amostras (83,7%) e o gene *bla*_{IMP-1} em 3 amostras (16,3%). A análise da similaridade genética mostrou uma grande diversidade clonal entre as 98 amostras resistentes aos carbapenens (46 ribogrupos). **CONCLUSÃO:** Este

estudo indica uma alta prevalência de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenems produtoras de M β L e uma disseminação clonal destes microrganismos em regiões geográficas distintas no Brasil.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Agente Etiológico

A família *Pseudomonadaceae* é constituída por um grupo grande de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose. Dois esquemas foram propostos para classificar organismos desta família. Um primeiro esquema, proposto por Gillardi (1991), é baseado nas características fenotípicas e divide os microrganismos em sete grandes grupos: *fluorescens*, *stutzeri*, *alcaligenes*, *pseudomallei*, *acidovorans*, *facili-delafieldii* e *diminuta*. O segundo esquema, desenvolvido por Palleroni (1984), é baseado em estudos de homologia genética do RNA ribossômico e do DNA, classificando estes microrganismos em cinco grupos. Recentes estudos filogenéticos baseados na análise das seqüência de nucleotídeos da porção 16S do RNA ribossômico levaram a uma nova descrição do gênero *Pseudomonas* e limitaram as espécies de acordo com a homologia do RNA ribossômico em cinco grupos. O gênero *Pseudomonas* pertence ao grupo I, que incluem as espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* (Kerstens *et al.*, 1996; Anzai *et al.*, 2000).

Pseudomonas spp. são bacilos gram-negativos com aproximadamente 1.5 a 5.0 µm de comprimento e 0.5 a 1.0 µm de largura, são estritamente aeróbios tendo o oxigênio como acceptor final de elétron no metabolismo respiratório. Alguns microrganismos podem crescer em condições de anaerobiose utilizando nitrato ou arginina como acceptor final de elétron. São microrganismos não formadores de esporos e apresentam um ou mais flagelos polares. Estes microrganismos apresentam a prova da oxidase positiva, exceto *P. luteola* e *P. oryzihabitans*, e produzem catalase. A maioria degrada glicose oxidativamente e convertem nitrato em nitrito. São capazes de crescer em ágar MacConkey, apresentando-se como colônias não-fermentadores de lactose, e em temperaturas que variam de 5°C a 42°C, sendo 37°C a temperatura considerada ideal. Estes microrganismos são metabolicamente versáteis capazes utilizar uma variedade de carboidratos simples ou complexos, álcoois e aminoácidos como substratos.

Amostras de *Pseudomonas* spp. podem apresentar morfologias distintas, variando desde uma colônia plana, difusa, característica da maioria dos isolados clínicos, até colônias bem pequenas. Colônias de aspecto mucóide são comuns em amostras isoladas de infecções do trato respiratório, principalmente, de pacientes com fibrose cística. A maioria das amostras de *P. aeruginosa* pode ser identificada devido à sua morfologia e por possuírem pigmentação verde-azulada devido à produção de piocianina. As colônias também possuem um odor característico de frutas (Gillard *et al.*, 1980).

1.2 - Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Amostras de *Pseudomonas* spp. encontram-se amplamente distribuídas pela natureza, sendo preferencialmente encontradas no meio ambiente, como, na água, no solo e nas plantas, incluindo frutas e vegetais (Holt *et al.*, 1994). Devido à habilidade de sobreviver em meio aquoso, estes microrganismos, principalmente *P. aeruginosa*, têm se tornado importantes patógenos no ambiente hospitalar, pois são capazes de sobreviver em soluções aquosas como desinfetantes, sabões, pomadas, fluidos de diálise e equipamentos (Morrison *et al.*, 1984). A utilização de dispositivos respiratórios, como inaladores, circuitos utilizados para ventilação mecânica são descritos como importantes reservatórios destes patógenos facilitando a disseminação intra-hospitalar destes microrganismos. (Neu *et al.*, 1983; Pollack *et al.*, 2000).

As mãos dos profissionais de saúde representam outro modo importante na disseminação intra-hospitalar de *P. aeruginosa*, pois atuam como um elo entre o paciente e o ambiente (Widmer *et al.*, 1993 e Moolenaar *et al.*, 2000).

A colonização por esse microrganismo muitas vezes precede a infecção, como ocorre nas pneumonias associadas à ventilação mecânica, nas infecções do trato urinário, nas infecções de pele dos grandes queimados e em outros processos sépticos (Gould *et al.*, Wise *et al.*, 1985; Rello *et al.*, 2001).

assim como zoonoses, recebem e pcnts hosiali

antibioticoterapia de amplo espectro, podem estar colonizados com *P. aeruginosa*, em mais de 50% das vezes (Pollack *et al.*, 2000).

As infecções por bacilos Gram-negativos adquiridos no ambiente hospitalar constituem um dos maiores problemas de saúde pública, devido à sua frequência, à gravidade e ao custo no tratamento (Pittet *et al.*, 1993). Segundo dados do *National Nosocomial Infection Surveillance (NISS) System* do *Center for Diseases Control and Prevetion (CDC)* coletados entre 1986 e 1998, a *P. aeruginosa* é a segunda e a terceira causa mais freqüente de pneumonias hospitalares e de infecções urinárias, respectivamente. Ainda segundo esses dados, permanece como a quarta causa de infecções de sítio cirúrgico e o sétimo patógeno mais freqüentemente isolado em corrente sanguínea (NISS, 2003).

O Programa de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos SENTRY avaliou 70.067 amostras clínicas obtidas de paciente internados em hospitais da Ásia, Europa, Estados Unidos, Canadá e América Latina, no período de 1997 a 1999, e mostrou que deste total de amostras clínicas, 6.631 amostras foram identificadas como de *P. aeruginosa*. A ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* foi maior na América Latina (11,4%) e Ásia (11,4%) quando comparada à Europa (9,3%), aos Estados Unidos (8,7%) e ao Canadá (8,6%). O trato respiratório foi o sítio que apresentou a maior prevalência de infecção por *P. aeruginosa* (Gales *et al.*, 2001).

1.3 - Terapia antimicrobiana

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem penicilinas com atividade anti-*Pseudomonas* e cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam, carbapenens e fluorquinolonas (Carmeli *et al.*, 1999). A monoterapia com os aminoglicosídeos é raramente utilizada, pois, esses agentes são freqüentemente utilizados em regimes combinados aos beta-lactâmicos na tentativa de potencializar a atividade anti-bacteriana e evitar o desenvolvimento de resistência

bacteriana. Entre as opções terapêuticas, os carbapenens são potentes agentes antimicrobianos devido à grande estabilidade frente à hidrólise causada pela maioria das β -lactamases produzidas por *P. aeruginosa*, e também por apresentarem maior capacidade de penetração pela membrana externa bacteriana (Senda *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2001; Eron *et al.*, 1983.).

O surgimento e a disseminação de bactérias multirresistentes têm dificultado muito o tratamento das infecções hospitalares no Brasil. Devido ao alto grau de resistência a antimicrobianos, a introdução empírica da terapia antimicrobiana adequada é muitas vezes retardada, elevando assim a morbi-mortalidade dos pacientes. Além disso, a escolha da terapia antimicrobiana empírica para os diferentes tipos de infecções hospitalares se torna difícil à medida que a prevalência de bactérias multirresistentes aumenta, obrigando a utilização de combinações de antimicrobianos e/ou de drogas mais tóxicas.

Os carbapenens apresentavam excelente atividade contra *P. aeruginosa* e representavam a terapêutica empírica de escolha para infecções graves, causadas por este patógeno. Dessa maneira, até pouco tempo os carbapenens representavam a terapia mais “segura” para tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Atualmente a resistência a esta droga aumentou, entre os bacilos Gram-negativos, principalmente entre as amostras de *P. aeruginosa* (Hirakata *et al.*, 2003).

Um estudo do Programa SENTRY analisou o perfil de sensibilidade de 1894 amostras de *P. aeruginosa*, isoladas de seis países da América Latina, no período de 1997 a 2001. Comparando os resultados obtidos durante todos os anos do estudo, observaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) nas taxas de sensibilidade para todos os agentes antimicrobianos testados. Os dados mais

drogas utilizadas até o início da década de 60 (Edgar *et al.* e Dickinson *et al.*), voltaram a ser uma opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes em pacientes hospitalizados. Entretanto, a taxa de sucesso terapêutico reportada para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em pacientes graves, com alta pontuação de APACHE II e internados na UTI foi de 60% com o uso de colistina (Levin *et al.*, 1999). Dados semelhantes foram relatados por Linden (2003), no tratamento de 14 casos de infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes isolados de vários sítios, de pacientes transplantados e que estavam internados na UTI.

1.4 – Mecanismo de Resistência Antimicrobiana em *P. aeruginosa*

A emergência e disseminação de organismos multirresistentes revela uma variedade de fatores responsáveis pelo aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos. Alguns desses fatores incluem a mutação em genes de resistência ampliando seu espectro de atividade, e a aquisição de novos genes de resistência através da troca de informações genéticas entre os microrganismos. Além disso, o uso de antimicrobianos no meio hospitalar e na comunidade levam à pressão seletiva facilitando o desenvolvimento e a disseminação de clones bacterianos multirresistentes (Tenover *et al.*, 2001).

Bacilos Gram-negativos como *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* constituem importantes patógenos em hospitais brasileiros (Arruda *et al.*, 1999; Sader *et al.*, 1999). Vários estudos multicêntricos têm mostrado altas taxas de resistência aos carbapenems entre amostras de *P. aeruginosa* e cerca de 10 a 20% destas amostras seriam resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente (Gales *et al.*, 1997; Gales *et al.*, 2000; Sader *et al.*, 1998; Sader *et al.*, 1999).

Os mecanismos de resistência antimicrobianos desenvolvidos por *P. aeruginosa* podem ser:

- Alteração de permeabilidade com alteração de proteínas de membrana externa (porinas).
- Alteração do sítio de ligação do antimicrobiano.
- Mecanismo ativo de efluxo de antimicrobianos.
- Produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos.

1.4.1 - Alteração de permeabilidade com alteração de proteínas de membrana externa (porinas)

As proteínas de membrana externa, porinas, são estruturas protéicas tridimensionais presentes na membrana externa formando canais preenchidos por água e que permitem a entrada por difusão de moléculas hidrofílicas e de baixo peso molecular como os aminoácidos, sacarídeos, antibióticos β -lactâmicos (Livermore *et al.*, 2001), e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido *et al.*, 1994).

Dentre as diferentes porinas, OprC, OprD, OprE e OprF que se encontram na membrana externa da *P. aeruginosa*, a maior e mais abundante é a porina OprF, um polipeptídeo de 36-kDa. Provavelmente, esta é a mais utilizada pela maioria dos β -lactâmicos para penetrar no interior da bactéria (Vila & Marco *et al.*, 2002). As porinas OprC e OprE são canais inespecíficos, no entanto, são utilizadas para entrada na célula bacteriana pelos antimicrobianos, β -lactâmicos, cloranfenicol, fluorquinolonas e gentamicina (Vila & Marco, 2002; Yoneyama *et al.*, 1995).

A proteína OprD, inicialmente chamada de D2, presente em *P. aeruginosa*, é também permeável aos carbapenems, mas não a outros β -lactâmicos (Huang & Hancock *et al.*, 1996; Livermore *et al.*, 2001). A alteração na porina OprD, seja diminuindo seu número ou sua expressão, acarreta à resistência ao imipenem e à diminuição da sensibilidade ao meropenem (Livermore *et al.*, 2001; Vila & Marco *et al.*, 2002).

1.4.2 - Alteração do sítio de ligação do antimicrobiano

As proteínas ligadoras de penicilina (PBP) situadas na face externa da membrana citoplasmática, apresentam atividade enzimática de transglicosidase, transpeptidase, carboxipeptidases e endopeptidases, participando na terceira etapa da biossíntese do peptidoglicano (Spratt & Cromie *et al.*, 1988). Os antimicrobianos beta-lactâmicos são análogos estereoquímicos das subunidades formadoras do peptidoglicano, ou seja, do substrato destas enzimas. A resistência a estas drogas pode ocorrer devido a alterações nas PBPs. Apesar de infreqüentes, alterações nas PBPs já foram reportadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Godfrey, Bryan & Rabin *et al.*, 1981). A resistência à penicilina em *P. aeruginosa* foi associada à diminuição da quantidade da PBP-3 (Gotoh, Nunomura e Nishino, 1990). A resistência a carbapenems descrita em *P. aeruginosa* foi também associada a alterações na PBP-4 (Bellido *et al.*, 1999).

A alteração no sítio de ação constitui o principal mecanismo de resistência às fluorquinolonas. As topoisomerasas são enzimas capazes de alterar o estado topológico do DNA. A DNA girase, topoisomerase II, é um tetrâmero que possui duas subunidades GyrA e GyrB codificadas respectivamente pelos genes *gyrA* e *gyrB*. A topoisomerase IV possui as subunidades ParC e ParE codificadas pelos genes *parC* e *parE*, os quais são homólogos aos genes *gyrA* e *gyrB*. A resistência às quinolonas ocorre de maneira gradual e cumulativa.. Altos graus de resistência às fluoroquinolonas estão associadas à mutação nos genes *gyrA* e *parC* às quais levam a alteração nas subunidades GyrA e ParC (Hooper *et al.*, 2001). Em *P. aeruginosa* mutações nas topoisomerasas do tipo II associadas a expressão de bombas de efluxo pode levar ao alto grau de resistência a esses antimicrobianos (Nakajima *et al.*, 2002).

1.4.3 - Mecanismo ativo de efluxo de antimicrobianos

O sistema de efluxo confere resistência a vários antimicrobianos, tornando assim, um significativo determinante de multirresistência intrínseca e adquirida. Existem cinco grandes famílias de sistemas de efluxo descritos: a) família de grandes facilitadores (*major facilitator family* ou MFS), b) família da resistência nodulada (*resistance-nodulation-division family* ou RND), c) família de pequena multirresistência (*small multidrug resistance family* ou SMR), d) transportadores de adenosina trifosfato (*ATP-cassete transporters* ou ABC) e família extrusão de compostos tóxicos e multidrogas (*multidrug and toxic compound extrusion family* ou MATE) (Poole *et al.*, 2004).

O sistema de efluxo é organizado por três componentes: um transportador (RND, MFS, ABC, SMR ou MATE) presente na membrana citoplasmática; por uma proteína de fusão com membrana periplasmática (MFP), presente no espaço periplasmático e por um canal extrusor (OMF) presente na membrana externa (Poole *et al.*, 2001).

Em *Pseudomonas aeruginosa* são descritos os sistemas de efluxo da família RND como: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e, MexXY-OprM (Livermore *et al.*, 2002). O sistema MexXY-OprM desempenha um papel muito importante na resistência intrínseca da *P. aeruginosa* a aminoglicosídeos, tetraciclina e eritromicina (Masuda *et al.*, 2000; Aires *et al.*, 1999).

Entre os sistemas descritos, o MexAB-OprM é o maior sistema constitutivamente expresso, que contribui para a extrusão de uma grande variedade de β -lactâmicos (Li, Poole & Nikaido, 2003; Srikumar *et al.*, 1999), fluorquinolonas (Le Thomas *et al.*, 2001), tetraciclina e cloranfenicol (Srikumar *et al.*, 1999). A mutação tipo *naB* ocorre no gene cromossomal *mexR*, que regula este sistema, resultando em um aumento na MIC de penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol; contudo, não interfere na MIC do imipenem (Srikumar *et al.*, 2000). Porém o meropenem é reconhecido e eliminado por este sistema, muito provavelmente por apresentar uma cadeia lateral hidrofóbica na posição 2' (Köhler *et al.*, 1999; Livermore *et al.*, 2001).

O sistema MexEF-OprN não contribui diretamente para a extrusão de β -lactâmicos e é regulado pelo gene *nfxC*, que por sua vez co-regula a expressão da porina OprD, a sua diminuição resulta na resistência à imipenem, fluorquinolona e menor diminuição na sensibilidade ao meropenem (Livermore *et al.*, 2002). Caso a mutação ocorra no gene *nfxB*, que regulam o sistema MexCD-OprJ, os microrganismos tornam-se mais sensíveis ao imipenem, ao biapenem (Shiba *et al.*, 1995); porém, tornam-se resistentes às cefalosporinas de quarta geração, cefepima e ceftipirima (Gotoh *et al.*, 1998; Poole *et al.*, 1996).

1.4.4 - Produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos

1.4.4.1 – Produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos

Existem três classes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: acetiltransferases (AAC), adeniltransferases (ANT) e fosfotransferases (APH). Estas enzimas modificadoras podem atuar em diferentes posições acetilando ou fosforilando grupos amina ou hidroxil dos aminoglicosídeos (Gilbert *et al.*, 2000). As enzimas mais freqüentemente encontradas em *P. aeruginosa* são ANT2''-I, que confere resistência à gentamicina, à tobramicina, à dibekacina e à kanamicina; e a enzima AAC6'-II, que confere resistência à tobramicina, à gentamicina e à netilmicina (Giamarellou *et al.*, 2001).

1.4.4.2 - Produção de β -lactamases

As β -lactamases são um grupo de enzimas capazes de inativar antimicrobianos β -lactâmicos, por hidrolisarem a ligação amida do anel β -lactâmicos, causando, assim, a destruição irreversível do antimicrobiano (Livermore *et al.*, 1995). A atividade enzimática é

variável de acordo com o tipo, a quantidade de β -lactamase produzida e os diversos substratos β -lactâmicos existentes (Medeiros *et al.*, 1997).

As β -lactamases constituem um grupo heterogêneo de enzimas produzidas por inúmeras espécies bacterianas, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias Gram-positivas, as β -lactamases são secretadas para o meio extracelular, dessa forma são menos ativas que as β -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Nesses microrganismos, as β -lactamases estão presentes no espaço periplásmico, podendo assim alcançar maiores concentrações e agirem de uma maneira mais eficaz sobre os antimicrobianos β -lactâmicos (Livermore *et al.*, 1993).

A codificação para a produção das β -lactamases está situada no DNA cromossômico, ou no DNA extracromossômico (plasmídeos e “transposons”) bacteriano (Livermore *et al.*, 1991; Livermore *et al.*, 1993).

Um grande número de β -lactamases codificadas por genes plasmidiais já foram descritas em bactérias Gram-negativas (Medeiros *et al.*, 1984; Bush *et al.*, 1989a). Essas β -lactamases podem ser transferidas horizontalmente entre as diferentes espécies bacterianas, ao contrário que ocorre com as β -lactamases cromossômicas que são transmitidas verticalmente.

A primeira classificação fenotípica destas enzimas foi proposta, em 1973, por Richmond & Sykes, que dividiram as β -lactamases em cinco grandes grupos (I, II, III, IV e V), baseando-se no perfil enzimático.

Em 1980, Ambler propôs a classificação molecular das β -lactamases, de acordo com a seqüência de aminoácidos, descrevendo quatro principais classes moleculares. A classificação de Bush (1989) foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias com a estrutura molecular da enzima.

Atualmente a classificação mais utilizada combina características estruturais e funcionais das β -lactamases, sendo uma versão mais atualizada da classificação anterior proposta por Bush em 1989 (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995). A Tabela 1 apresenta de

modo simplificado a correlação entre a classificação molecular de Ambler (1980) e a de Bush, Jacoby & Medeiros (1995).

Tabela 1. Características funcionais e molecular grupos de β -lactamases.

Grupo Funcional	Sub-grupos	Classe molecular	Características funcionais
1		C	Enzimas freqüentemente cromossomais em BGN ^a , mas podem ser codificados por plasmídios. Conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens (exceto quando combinado com alteração porinas). Não são inibidas pelo ácido clavulânico
2		A e D	Grande maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas
	2b	A	β -lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1
	2be	A	ESBL ^b conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos
	2br	A	β -lactamases derivadas de TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases (IRT)
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); fracamente inibidas pelo ácido clavulânico
	2e	A	Cefalosporinase inibidas por ácido clavulânico
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico
4		ND ^c	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos

- a. BGN, bacilos Gram-negativos;
b. ESBL, β -lactamases de espectro ampliado;
c. N.D., não determinada (Adaptado do artigo de Bush, Jacoby & Medeiros, 1995).

As β -lactamases do grupo 1 de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) ou da classe molecular C de Ambler (1980), são conhecidas como β -lactamases AmpC. Este grupo de enzimas é produzido por várias bactérias como *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Providencia* spp. e *Enterobacter cloacae* (Livermore *et al.*, 1991).

Estas são enzimas codificadas, geralmente, por genes cromossomais, induzíveis, e hidrolizam todos os β -lactâmicos exceto os carbapenens. Normalmente, são produzidas em pequenas quantidades, porém, na presença de β -lactâmicos, principalmente cefoxitina e imipenem, a produção desta enzima pode aumentar de 100 a 1000 vezes (Lodge *et al.*, 1991). Estas enzimas são inibidas competitivamente pela cloxacilina; entretanto, não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Existem vários compostos capazes de inibir as β -lactamase AmpC como os penems monobactâmicos e o Syn2190 (Babini, 2000). Este composto apresenta o núcleo 1,5 dihidroxi-4piridon no carbono 3 do anel monobactâmico sendo capaz de inibir exclusivamente β -lactamases AmpC (Babini *et al.*, 2000 ; Danes *et al.*, 2002).

A expressão da β -lactamase AmpC em *P. aeruginosa* é similar aos mecanismos regulatórios encontrados em enterobactérias (Langae *et al.*, 2000; Bagge *et al.*, 2002). Em amostras de *P. aeruginosa* a produção de β -lactamases AmpC é codificada por um gene estrutural *ampC*. Estas são de origem cromossômica, podendo ser induzíveis ou constitutivas. A indução desta enzima ocorre na presença de β -lactâmicos, tendo assim, sua produção aumentada e quando o antimicrobiano é retirado, estas enzimas voltam a ser sintetizadas em menor quantidade. Os β -lactâmicos, cefoxitina e imipenem, são potentes indutores das β -lactamases AmpC, entretanto, o imipenem, apesar de ser potente indutor, é um pobre substrato para estas enzimas, permanecendo estável à sua hidrólise. O antimicrobiano ceftazidima é um fraco indutor e, apesar de ser hidrolisado por estas enzimas podem permanecer ativo quando a produção das β -lactamases é pequena, ou seja a bactéria é sensível a este agente porque a quantidade de enzima produzida não é suficiente para hidrolisar a quantidade total de antimicrobiano que penetra na célula bacteriana (Livermore *et al.*, 1995; Medeiros *et al.*, 1997). Em uma população de *P.*

aeruginosa a frequência de mutações que leva à hiperprodução de β -lactamases AmpC, ou seja à desrepressão do gene AmpC é de 10^{-7} a 10^{-9} / UFC (Livermore *et al.*, 1995).

O mecanismo para hiperprodução de β -lactamases AmpC envolve a mutação ou deleções que ocorrem no gene *ampD*. A hiperexpressão resulta em alto nível de produção de β -lactamases do tipo AmpC e ocorre independente da concentração do antimicrobiano, sendo assim, considerada constitutiva (Medeiros *et al.*, 1997; Helfand & Bonomo *et al.*, 2003) Existem poucos mutantes desreprimidos que apresentam mutações em *ampR*, a maioria das mutações estão presentes no gene *ampD* (Langae *et al.*, 2000, Bagge *et al.*, 2002).

No grupo 2 da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) estão as β -lactamases mediadas por plasmídios e que, geralmente, são inibidas pelos inibidores de β -lactamase como o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam. Elas estão divididas segundo a classificação molecular de Ambler (1980) em duas classes A e D.

As β -lactamases da classe molecular A de Ambler (1980) e pertencentes ao grupo 2 de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) são conhecidas como β -lactamases de espectro ampliado (“extended spectrum β -lactamases” - ESBL). Elas conferem resistência à ampicilina, à carbenicilina, à ticarcilina e às cefalosporinas, no entanto, geralmente mantêm a sensibilidade às cefamicinas, aos carbapenens e aos monobactâmicos. São, geralmente, produzidas por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas podem ser produzidas por qualquer bactéria Gram-negativa. As ESBLs encontram-se disseminadas por todo o mundo e a maioria delas são estruturalmente relacionadas às β -lactamases do tipo TEM-1, TEM-2, SHV-1 e PSE-1 (Shannon *et al.*, 1990). Na América Latina, as β -lactamases de espectro ampliado derivadas do gene *ctx-m* também são freqüentemente encontradas (Winokur *et al.*, 2001).

A β -lactamase PER-1 foi inicialmente descrita em amostras de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima isoladas na Turquia. O gene que codifica esta enzima pode estar localizado no cromossomo ou em plasmídeos (Vahaboglu *et al.*, 1997). Recentemente, foi reportado a presença de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de PER-1 em um surto nosocomial em seis hospitais na Itália (Pagani *et al.*, 2004). É

também relatada a presença desta enzima em amostras de *Acinetobacter* spp. (Vahaboglu *et al.*, 1997), *Alcaligenes faecalis* (Pereira *et al.*, 2000) e *Proteus mirabilis* (Pagani *et al.*, 2002). O gene *bla*_{PER-2}, que codifica a enzima PER-2, apresenta 86,4% de homologia com o gene *bla*_{PER-1}, que codifica a enzima PER-1, este gene encontra-se em um plasmídeo, sendo assim, de fácil transferência para membros da família *Enterobacteriaceae*. A produção desta enzima tem sido reportada em amostras de *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *P. mirabilis* isoladas de pacientes hospitalizados na Argentina (Bauernfeind *et al.*, 1996).

Ainda dentro da classe molecular A, a enzima pertencente ao grupo 2f, GES-1, foi inicialmente descrita em 1998 em amostras de *K. pneumoniae* (Poirel *et al.*, 2000). A produção desta enzima foi reportada em amostras *K. pneumoniae* isolada de hospitais na Guiana Francesa (Poirel *et al.*, 2000) e em Portugal (Duarte *et al.*, 2003). Esta enzima também foi relatada em amostras de *P. aeruginosa* e, mais recentemente, isolada de uma amostra de *P. aeruginosa* no Brasil (Castanheira *et al.*, 2004). A enzima GES-2 foi isolada, em 2000, na África do Sul em amostras de *P. aeruginosa*, e apresenta fraca atividade hidrolítica contra os carbapenems. A análise cinética de enzima mostrou que esta apresenta atividade catalítica contra imipenem 100 vezes maior que a GES-1. No entanto, a atividade da GES-2 permanece 1000 vezes menor do que outras enzimas pertencentes a classe A, capazes de hidrolisar os carbapenems como, da SME-1 e NMC-A, enzimas identificadas em amostras de *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*, respectivamente (Poirel *et al.*, 2001).

Uma outra enzima da classe A, a VEB-1, primeiramente reportada em amostras de *E. coli* isoladas no Vietnã (Poirel *et al.*, 1999) foram reportadas em *P. aeruginosa* isoladas na Tailândia (Naas *et al.*, 1999) e Kuwait (Poirel *et al.*, 2001). Foi também identificada em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas na França (Poirel *et al.*, 2003) e, mais recentemente, em amostras de *P. aeruginosa* isoladas na Índia (Aubert *et al.*, 2004). Os genes que codificam esta enzima apresentam-se localizados em um integron de classe 1 (Aubert *et al.*, 2004).

As oxacilinasases da classe D de Ambler (1980), pertencentes ao grupo 2d de Bush (1995), incluem a OXA-11, OXA -14, OXA -16, OXA -17, OXA -18, OXA -19, OXA

- 23, OXA - 24, OXA - 25, OXA - 26, OXA - 27, OXA - 28 e OXA - 40. E como as ESBLs produzidas pela *K. pneumoniae* das classes TEM e SHV, as enzimas do tipo OXA, apresentam resistência às cefalosporinas, monobactâmicos e penicilinas, mas apresentam a oxacilina como substrato preferencial. Estas enzimas também se caracterizam por serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (Danel *et al.*, 1999). Algumas enzimas da família OXA, OXA-23 a OXA-27, possuem a capacidade de hidrolisar fracamente os carbapenens. Geralmente estas enzimas são produzidas por amostras de *Acinetobacter* spp., mas não foram descritas em *P. aeruginosa*. As OXA - 24, OXA - 25, OXA - 26 e OXA - 40 são homologas entre si, e a OXA-40 apresenta uma alta atividade hidrolítica contra o imipenem (Heritier *et al.*, 2003). O gene *bla*_{OXA-45}, foi isolado em amostras de *P. aeruginosa* e apresenta 65,9% de homologia com o gene *bla*_{OXA-18}. A enzima OXA-45 apresenta atividade hidrolítica contra aztreonam e oxacilina (Toleman *et al.*, 2003). Recentemente, a OXA-50, isolada também em uma amostra de *P. aeruginosa* mostrou-se ser expressa constitutivamente (Girlich *et al.*, 2004) e apresentar baixa afinidade ao imipenem, comparável à mesma afinidade apresentada pelas enzimas OXA-27 (Shab *et al.*, 2001) e OXA-24 (Bou *et al.*, 2000). Mais recentemente, OXA-58 foi isolada na França em *A. baumannii* (Poirel *et al.*, 2005).

Na classe molecular B ou Grupo 3, estão presentes e as metalo- β -lactamases que são um grupo de enzimas que possuem a capacidade de hidrolizar todos os β -lactâmicos, exceto monobactâmicos, e não são inibidas pelo ácido clavulânico (Bush *et al.*, 1998). Inicialmente codificadas por genes cromossômicos em várias bactérias, incluindo *Bacillus cereus* (Sabath *et al.*, 1966), *Stenotrophomonas maltophilia* (Saino *et al.*, 1982), *Aeromonas* spp. (Shannon *et al.*, 1986), *Chryseobacterium* spp. (Bellais *et al.*, 2000). Este grupo apresenta-se dividido em três subgrupos funcionais que: 3a, 3b e 3c (Bush *et al.*, 1998).

O subgrupo 3a apresenta enzimas que hidrolisam penicilinas tão ou mais rápido que o imipenem. As cefalosporinas também são hidrolisadas por estas enzimas, porém mais lentamente que o imipenem. As principais representantes deste subgrupo são as enzimas produzidas por *Bacillus cereus*. No segundo subgrupo 3b estão incluídas as enzimas de *Aeromonas* spp., as verdadeiras carbapenemases. Essas enzimas apresentam alta especificidade pelos carbapenens e não são detectadas com o uso de

nitrocefin. Já o subgrupo 3c foi proposto apenas para incluir a metalo- β -lactamase produzida por *Legionella gormanii*. Esta enzima apresenta grande capacidade de hidrolisar cefalosporinas e apresenta propriedades bioquímicas distintas das outras enzimas do grupo 3 (Bush *et al.*, 1998).

Uma característica importante que distingue o subgrupo 3b do subgrupo 3a é o efeito da adição do zinco (Zn^{++}) no sítio ativo da enzima. Todas as metalo- β -lactamases são enzimas que apresentam como cofator o íon Zn^{++} , sendo a atividade catalítica da enzima aumentada na presença deste cátion. Ao contrário do observado para as enzimas do subgrupo 3a, três enzimas do subgrupo 3b (ASA-1, AsbM1 e ACP) são inibidas por baixas concentrações de Zn^{++} (Bush *et al.*, 1998).

As enzimas da classe B somente são inibidas pelo EDTA e pelos compostos derivados do ácido tiolático, como por exemplo, o ácido 2-mercaptopropiônico. Elas não são inibidas por inibidores de β -lactamases, disponíveis clinicamente como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Bush *et al.*, 2001).

A primeira M β L, IMP-1, cuja produção era mediada por um gene situado em um plasmídeo, foi reportado em uma amostra de *Serratia marcescens*, isolada em um hospital de Osaka, em 1991 (Osano *et al.*, 1994). No mesmo ano, Watanabe e colaboradores reportaram uma cepa de *P. aeruginosa* isolada em 1988, no Japão, que produzia uma M β L transferível e mediada por plasmídeo. Segundo Livermore & Woodford (2000), provavelmente, tratava-se da enzima IMP-1, a qual foi formalmente isolada e seqüenciada também no Japão, em 1991. A Tabela 2 apresenta as metalo- β -lactamases descritas até o momento pertencentes às famílias IMP, VIM, SPM e GIM.

Como outras metalo- β -lactamases (M β L), a IMP-1 apresenta um perfil de substratos preferenciais bastante amplo, incluindo cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) e carbapenens (imipenem, meropenem, panipenem). O aztreonam apresenta estabilidade à hidrólise pelas enzimas IMP-1; entretanto, os microrganismos que produzem essa enzima são freqüentemente resistentes ao aztreonam por apresentarem outros mecanismos de resistência (Osano *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1995). Esta enzima é zinco-dependente, sensível ao EDTA e não é inibida pelos inibidores de β -lactamases (Haruta *et al.*, 2000). O gene

*bla*_{IMP-1} freqüentemente ocorre em um cassete inserido em um integron da classe 1 (Laraki *et al.*, 1999). Além de incluir a resistência a todos os β -lactâmicos, os integrons que carregam o gene *bla*_{IMP-1} também carregam outros genes que codificam a resistência cruzada aos aminoglicosídeos (Arakawa *et al.*, 1995). Apesar da IMP-1 ser bastante freqüente em amostras isoladas no Japão, tem sido recentemente identificada em

no site [http:// www.lahey.org](http://www.lahey.org) e acesso no “*genebank*” AB074437, foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* no Japão; a IMP-12 foi isolada em uma amostra de *P. putida* na Itália (Docquier *et al.*, 2003); a IMP-13 isolada, em 2001, em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada também na Itália (Toleman *et al.*, 2003). Recentemente, uma nova M β L, IMP-16, foi isolada, no Brasil, em uma amostra de *P. aeruginosa* proveniente do Hospital de Base de Brasília (Mendes *et al.*, 2004). Ainda não foram descritas as M β L IMP-14 e 15. Mais recentemente, uma nova M β L, IMP-20, foi isolada no Japão em uma amostra de *P. aeruginosa* (Shibata, 2005, no prelo).

Tanto os genes da família IMP como da família VIM foram encontrados em genes cassetes móveis inseridos em integrons da classe 1. Os integrons da classe 1 são as vias mais comuns, pela quais os genes cassetes de resistência mobilizam-se de uma bactéria para a outra (Livermore *et al.*, 2000).

Uma outra família de β -lactamase da classe B, foi identificada inicialmente em uma amostra de *P. aeruginosa* na Itália em 1997, com menos de 30% de homologia com as enzimas da família IMP, esta enzima foi designada como VIM-1 e deu origem à família VIM (Lauretti *et al.*, 1999). A M β L VIM-2, codificada pelo gene *bla*_{VIM-2}, foi identificada por Poirel *et al.* (2000), em uma amostra de *P. aeruginosa* sensível à polimixina e aztreonam, isolada em hemocultura de uma paciente internada, em 1996, no Instituto Paoli-Calmettes em Marselha, França. O gene *bla*_{VIM-2} apresenta 90% de homologia com o gene *bla*_{VIM-1}.

A enzima VIM-3, presente em gene cromossomal, foi reportada em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em Taiwan. A seqüência de aminoácidos da enzima VIM-3 difere da seqüência de VIM-2 pela mudança de somente dois aminoácidos (Yan *et al.*, 2001). Recentemente, a enzima VIM-4 foi isolada em uma amostra de *P. aeruginosa* na Grécia, apresentando uma mutação que resultou na substituição da serina pela arginina na posição 175 em comparação à seqüência de aminoácidos da enzima VIM-1 (Pournaras *et al.*, 2002).

Ainda não publicadas, mas já descritas no site [http:// www.lahey.org](http://www.lahey.org) foram reportadas novas enzimas da família VIM: VIM-5 com acesso no “*gene bank*” AY144612, isolada de *K. pneumoniae*, na Turquia e VIM-6 acesso no “*gene bank*” AY165025, isolada

de *P. putida*, em Singapura. A enzima VIM-7 foi isolada de uma amostra de *P. aeruginosa* nos Estados Unidos da América como parte do programa de vigilância de resistência CANCER (Toleman *et al.*, 2004). O gene *bla*_{VIM-7} encontrava-se em um plasmídeo podendo ser facilmente transferível para outras espécies de enterobactérias e *Pseudomonas* (Toleman *et al.*, 2004).

Mais recentemente, foi identificado o gene *bla*_{VIM-8} em amostras de *P. aeruginosa* isoladas na Colômbia, apresentando homologia de 90,2% com o gene *bla*_{VIM-1} (Crespo *et al.*, 2004). As MβLs VIM-9 e VIM-10 foram isoladas em amostras de *P. aeruginosa* no Reino Unido e quando comparada a VIM-1, apresentavam 90,2% e 90,6% de homologia, respectivamente (Woodford, 2004, no prelo). Uma outra nova MβL, VIM-11, foi reportada na Argentina e na Itália, o gene *bla*_{VIM-11} apresenta 90,2% de homologia com o gene *bla*_{VIM-1} (Pasteran *et al.*, 2004; Mazzoriol, 2004, no prelo).

Em 2001, uma metalo β-lactamase foi identificada no Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP) do Complexo Hospitalar do Hospital São Paulo, São Paulo, que mostrava uma homologia de 35,5% com a IMP-1 (Toleman *et al.*, 2002). A nova MβL denominada, SPM-1, São Paulo metallo-β-lactamase, identificada em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada inicialmente na urina e depois na hemocultura de uma criança de quatro anos, portadora de leucemia. A SPM-1 hidrolisa todos os β-lactâmicos com exceção do aztreonam, e é inibida pelo EDTA.

Mais recentemente foi identificada uma nova MβL, GIM-1, em amostras de *P. aeruginosa* isoladas na Alemanha. O gene *bla*_{GIM-1} apresenta 43,1% de homologia com o gene *bla*_{IMP-1}, 28,8% com gene *bla*_{VIM-1} e apenas 28,0% com o gene *bla*_{SPM-1}. Mostrou uma atividade hidrolítica 10 vezes maior para o imipenem em comparação ao meropenem. (Castanheira *et al.*, 2004).

Tabela 2. Metalo- β -lactamases pertencentes às famílias IMP, VIM, SPM e GIM.

Enzima	Espécie Bacteriana	Origem
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i>	Japão
	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Itália
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japão
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong
	<i>Citrobacter youngae</i>	China
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japão
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Canadá
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan
IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	China
IMP-10	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japão
IMP-11 ^a	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
IMP-12	<i>P. aeruginosa</i>	Turquia
IMP-13	<i>P. aeruginosa</i>	Itália
IMP-14	Não publicado	
IMP-15	Não publicado	
IMP-16	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil
IMP-20	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Itália
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Itália
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Itália
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	França
		Grécia
		Itália
		Coréia
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Coréia
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Coréia
	<i>Serratia marcescens</i>	Coréia
<i>Pseudomonas putida</i>	Coréia	

	<i>Acinetobacter genomosp. 3</i>	Itália
	<i>Pseudomonas putida</i>	Taiwan
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwan
VIM-3	<i>P. aeruginosa</i>	Taiwan
VIM-4	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Turquia
VIM-6	<i>P. putida</i>	Cingapura
VIM-7	<i>P. aeruginosa</i>	Estados Unidos
VIM-8	<i>P. aeruginosa</i>	Colômbia
VIM-9	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido
VIM-10	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido
VIM-11	<i>P. aeruginosa</i>	Argentina
SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil
GIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Alemanha

Adaptado do artigo de Nordmann & Poirel (2002).

NP, não publicado

a. Espécie bacteriana na qual a enzima foi isolada pela primeira vez. A descrição desta enzima encontra-se no site <http://www.lahey.org>

1.5 – Tipagem Molecular

A tipagem molecular utiliza técnicas de biologia molecular para evidenciar uma possível relação genética entre os isolados clínicos de uma mesma espécie.

O acompanhamento e a avaliação do comportamento de determinadas cepas dentro de uma população ao longo do tempo podem determinar a evolução de cepas bacterianas de importância clínica e auxiliar na implementação de estratégias para controlar o aparecimento de novas infecções (Pfaller *et al.*, 2001; Gales *et al.*, 2001b). A

caracterização de cepas bacterianas usando técnicas de tipagem molecular pode auxiliar na avaliação de surtos hospitalares causados por microrganismos; como, também, na detecção de disseminação local, regional e global de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos (Struelens *et al.*, 1993a; Sader *et al.*, 1995; Pfaller *et al.*, 2001).

A técnica de eletroforese em campo elétrico variado (“Pulsed-Field Gel Eletroforesis”- PFGE) se caracteriza por ser um sistema de eletroforese que utiliza múltiplos eletrodos dispostos de forma hexagonal, por exemplo, gerando um campo elétrico homogêneo e uma alternância na direção da corrente elétrica que gera um perfil migratório em linha reta (Chu *et al.*, 1986) e permite, assim, a separação de moléculas de DNA de até duas megabases, que foram previamente digeridos por enzimas de restrições. Embora existam no mínimo sete sistemas distintos empregando a técnica da eletroforese pulsada para a separação do DNA, o sistema CHEF é o mais popular, sendo utilizado com sucesso em estudos epidemiológicos e para traçar surtos hospitalares (Sader *et al.*, 1993; Livesley *et al.*, 1998; D'Agata *et al.*, 2000).

A técnica de ribotipagem foi descrita por Grimont & Grimont (1986) e tem como princípio avaliar o polimorfismo do DNA bacteriano na região onde está localizado o operon *rrn*, composto pelos genes 16S e 23S, que codificam o RNA ribossomal (rRNA) das bactérias. Estes genes são altamente conservados nas espécies bacterianas e permitem assim, que esta técnica seja aplicada com sucesso em vários estudos para diferenciar cepas bacterianas. Inicialmente, a ribotipagem foi descrita para ser utilizada com finalidades taxonômicas. Estudos posteriores demonstraram a utilidade desta técnica para fins epidemiológicos e desde então, a ribotipagem se tornou uma das ferramentas mais conhecidas nos estudos de epidemiologia molecular (Stull *et al.*, 1988).

Vários estudos utilizando técnicas de tipagem molecular são realizados, sendo que muitos destes trabalhos ajudam a esclarecer a dinâmica das infecções, principalmente em bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, que representam um grande problema nas infecções hospitalares (Pfaller *et al.*, 2001). Surtos ocasionados por *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos são freqüentemente reportados em unidades de queimados, unidade de neurocirurgia, unidades de terapia intensiva,

unidades oncológicas e entre pacientes com fibrose cística (Sader *et al.*, 1993; Barth & Pitt, 1998; Speijer *et al.*, 1999; Arruda *et al.*, 1999; Pellegrino *et al.*, 2002).

2 . OBJETIVOS

2.1 Avaliar o perfil de sensibilidade a diversos agentes antimicrobianos das 206 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenens isoladas em distintos hospitais brasileiros, pela técnica disco-difusão;

2.2 Avaliar a freqüência da produção de M β L entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens isoladas em distintos hospitais brasileiros;

2.3 Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L pela técnica de microdiluição em caldo;

2.4 Avaliar a presença dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{IPM-1} entre as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L isoladas de distintos hospitais brasileiros;

2.5 Avaliar a presença de variantes alélicas do gene *bla*_{SPM-1} entre as amostras de *P. aeruginosa* produtoras da M β L do tipo SPM-1;

2.6 Avaliar a similaridade genética entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens produtoras de SPM-1 isoladas de distintos hospitais brasileiros.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostras Bacterianas

Foi solicitado para cada um dos 25 centros médicos participantes do projeto multicêntrico de vigilância de resistência bacteriana a antimicrobiano intitulado: "Caracterização molecular de bactérias multirresistentes e avaliação do modo de disseminação da resistência bacteriana a antimicrobianos", número: 2001/033497 financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, que encaminhassem todas as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenens isoladas entre janeiro de 2001 a junho de 2003.

Os centros médicos participantes do estudo foram:

1. Santa Casa de Montes Claros, Montes Claros, MG;
2. Hospital do Servidor Público Estadual, São Paulo, SP;
3. Hospital Aliança, Salvador, BA;
4. Hospital Geral de Carapicuíba Sanatorinhos, Carapicuíba, SP;
5. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR;
6. Hospital de Base de Brasília, Brasília, DF;
8. Hospital e Maternidade Brasil, Santo André, SP;
9. Laboratório Louis Pasteur, Fortaleza, CE;
10. Hospital Messejana, Fortaleza, CE;
11. Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, MG;
13. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS;
14. Fundação Municipal de Ensino Superior de Marília, Marília, SP;
15. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR;
18. Laboratório Cedro, São Luis, MA;
19. Laboratório Santa Luzia, Florianópolis, SC;

20. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR;
21. Hospital das Clínicas , Goiânia, GO;
22. Hospital Sírio Libanês, São Paulo, SP;
23. Hospital Dante Pazzanese, São Paulo, SP;
24. Hospital Estadual de Diadema, Diadema, SP
25. Laboratório Protocolor, Rio de Janeiro, RJ;
26. Centro Administrativo São Sebastião (CASS), Rio de Janeiro, RJ;
27. Hospital São Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP;
77. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG;
88. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB;

Durante este período, foram encaminhadas ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) 206 amostras clínicas de *P. aeruginosa* resistentes á carbapenens. No LEMC, as amostras foram armazenadas em caldo TSB – “Tryptone Soya Broth” (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) com 15% de glicerol e estocadas em freezer a - 20°C até a realização dos testes laboratoriais.

As amostras foram devidamente identificadas por cada centro médico participante do estudo empregando-se métodos utilizados rotineiramente por cada instituição. A confirmação da identificação bacteriana foi realizada no LEMC utilizando-se testes bioquímicos convencionais e o sistema para identificação de bacilos Gram-negativos BBL “Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID” (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA).

3.2 - Avaliação da Sensibilidade *In Vitro* aos Antimicrobianos

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelas técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo de acordo com a padronização do “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS 2003a,b) e as interpretações realizadas nas publicações do NCCLS (2004). Para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade foram utilizadas as amostras da “American Type Culture Collection” (ATCC), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.2.1 - Teste de disco-difusão

Esta técnica foi realizada com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e confirmar o fenótipo de resistência, ou seja, a resistência a imipenem e/ou meropenem. Com auxílio de uma alça bacteriológica, cinco colônias bacterianas foram suspensas em 5 ml de caldo Müeller-Hinton (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra), para obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após a homogeneização da amostra, foi introduzido um swab estéril dentro do tubo, e, em seguida, este foi comprimido contra a parede do tubo para a remoção do excesso de líquido. Com auxílio do swab, a inoculação da amostra foi realizada em forma de estrias na superfície da placa de Müeller-Hinton ágar (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) em três direções, girando a placa em ângulo de 60° antes da mudança de sentido na inoculação. Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas foram deixadas em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos para absorver o excesso de umidade na superfície do ágar.

Os discos foram retirados do freezer uma hora antes de sua aplicação e deixados à temperatura ambiente. A aplicação foi realizada com auxílio de uma pinça estéril, pressionando-se os discos suavemente contra a superfície do ágar. As distâncias de 30 mm (centro a centro) entre os discos e de 15 mm da margem da placa foram mantidas, a fim de impedir a superposição dos halos de inibição. Os discos de antimicrobianos (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) utilizados foram: aztreonam (30µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), piperacilina (30µg), piperacilina/tazobactam (30µg/10µg), amicacina (5µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg) e polimixina B (300U).

As placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas em ar ambiente. Após este período, foi realizada a leitura dos halos de inibição com auxílio do paquímetro, os quais foram interpretados de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo NCCLS para bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose (NCCLS, 2004). A interpretação do halo da polimixina B foi baseado no trabalho publicado por Gales e colaboradores (2001).

3.2.2 - Microdiluição em caldo

As amostras confirmadas como produtoras do gene *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1} pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) foram também avaliadas pela metodologia de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do NCCLS (2003b), utilizando-se placas de microdiluição liofilizadas (“Trek Diagnostic Systems”, West Sussex, Inglaterra). As placas foram mantidas em ar ambiente até sua utilização. Definiu-se como concentração inibitória mínima (MIC) a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. As MIC₅₀ e MIC₉₀ foram definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, respectivamente. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes, empregando-se os limites de sensibilidade preconizados pelo NCCLS (2004), para avaliação da sensibilidade à colistina, foram utilizados os limites estabelecidos por Gales e colaboradores (2001).

Os agentes antimicrobianos testados e as respectivas diluições (µg/ml) foram: amicacina (8-64), ampicilina/sulbactam (4/2-64/32), aztreonam (1-32), ceftazidima (1-32), cefepima (1-32), ciprofloxacina (0.06-4), gatifloxacina (0.06-8), gentamicina (2-16), imipenem (0.25-32), meropenem (0.25-32), piperacilina/tazobactam (8/4-256/4) e colistina (0,5-8). Para cada amostra de *P. aeruginosa* uma suspensão bacteriana foi preparada em 5 ml de caldo de Müller-Hinton (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e a turbidez ajustada a 0,5 da escala de McFarland utilizando o turbidímetro digital (Baxter®, Sacramento, EUA). Cinquenta microlitros desta suspensão foi transferido para um tubo contendo 10 ml de caldo de Müller-Hinton (“Trek Diagnostic Systems”, West Sussex, Inglaterra), no qual foram ajustadas as concentrações de cálcio e magnésio, utilizando-se uma solução estoque de CaCl₂ e MgCl₂. Após a homogeneização, 100 µl desta suspensão bacteriana foi inoculado nas placas de microdiluição utilizando-se a pipeta multicanal, a fim de se obter um inóculo final de 5×10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) UFC/ml. A seguir, as placas foram incubadas a 35°C, por 18 a 24 horas em ar ambiente. Após esse período, determinou-se, através da inspeção visual das placas a MIC para cada um dos antimicrobianos testados.

3.3 Detecção das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -bactamase

3.3.1.1. Testes fenotípicos

3.3.1.1.1. Disco-aproximação

As amostras de *P. aeruginosa* confirmadas como resistentes aos carbapenens foram submetidas ao teste de triagem para avaliação fenotípica da produção de M β L de acordo com o teste de Arakawa modificado (2000). Foram testadas diferentes distâncias (1 - 3 cm) entre os discos comerciais contendo antimicrobianos, ceftazidima (30 μ g) e imipenem (30 μ g) (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra), e os discos estéreis de papel de contendo inibidores de M β L, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). Foi adicionado sobre cada disco estéril, 5 μ l de uma solução de EDTA a 100mM ou 3 μ l do produto puro de 2-MPA, com densidade de 1,2 g/ml. Foi, então, determinada a melhor distância para detecção das amostras positivas utilizando-se amostras controles produtoras de diferentes de M β L: *Acinetobacter baumannii* 17-4 e *P. aeruginosa* 319 produtoras da M β L IMP-1 (gentilmente cedidas pelo Dr. Arakawa) e a *P. aeruginosa* n^o 1088, produtora de SPM-1. Como controle negativo, foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

A melhor distância padronizada para detecção da produção de M β L, entre os discos comerciais de ceftazidima e imipenem e o disco adicionado de EDTA foi de 1 cm, enquanto 2,5 cm foi a melhor distância para o disco contendo 2-MPA.

3.3.1.1.2. Etest[®]

A confirmação fenotípica da produção de M β L pela amostra bacteriana foi realizada utilizando-se a fita de Etest[®] M β L. Estas fitas, de um lado são impregnadas com

imipenem (4-256 µg/ml) e, do lado oposto, com imipenem (1-64 µg/ml) associado a EDTA (320 µg/ml).

Uma suspensão bacteriana ajustada a 0,5 da escala de McFarland foi uniformemente semeada na placa de ágar Müller-Hinton (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) e após 15 minutos, as fitas de Etest[®] MβL foram dispensadas sobre a placa. As placas foram incubadas a 35°C, em aerobiose, por um período de 18 a 24 horas. Amostras cujas MICs da associação imipenem/EDTA foram pelo menos 3 diluições logarítmicas inferiores às MICs de imipenem foram confirmadas fenotipicamente como produtoras de MβL (Walsh et al., 2002). Como controles positivos foram utilizadas as cepas, de *A. baumannii* 17-4 e *P. aeruginosa* 319 produtoras da MβL IMP-1. Como controle negativo, foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.3.1.1.3 Avaliação da Hidrólise de Carbapenens

As amostras de *P. aeruginosa* identificadas fenotipicamente como produtoras de MβL pelo método de disco-aproximação e Etest, e cuja pesquisa para os genes que codificam MβL, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1} pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR), foram negativas, foram, então, encaminhadas para a avaliação da taxa de hidrólise ao meropenem pelo extrato bruto de β-lactamases de acordo com a metodologia descrita por Da Silva *et al.*(1999).

Para extração do extrato bruto de β-lactamase, dez colônias bacterianas foram inoculadas em 10 ml de caldo TSB – “Tryptone Soya Broth” (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 5000g por 15 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado.

Em seguida, o precipitado foi ressuspensso em 1ml da solução tampão (Tris-HCl a 1mM e ZnSO₄ 1 mM). Após esta etapa, as amostras foram lisadas por sonicação (4 pulsos de 30 segundos cada) em sonicador (XL2000 “Ultrasonic Cell Disruptor-Fisher Scientific International” Inc. EUA). Durante o processo de sonicação as amostras foram mantidas em gelo. Em seguida, as células lisadas foram transferidas para tubos tipo

ependorf e centrifugadas a 5000g por 3 minutos a 4°C para a remoção dos debrís celulares. O sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para um novo tubo eppendorf, e mantido a 4°C até o momento do teste.

Para avaliar a taxa de hidrólise foi utilizado um ensaio enzimático, o qual avalia a absorbância da amostra *versus* o tempo, no espectrofotômetro “Termo Spectronic” (Fisher Scientific Company, EUA). Além do extrato bruto, foi também utilizado uma solução de meropenem 1 mM, cuja absorbância variava entre 1300 a 1400 dA/min. A absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda 299 nm por 2 minutos.

Uma cubeta de quartzo contendo 1000 µl da solução de antibiótico foi utilizada para calibrar o aparelho. A seguir, foi adicionado em outra cubeta, a solução de antibiótico, 50 a 100 µl do extrato cru de β-lactamase e a leitura foi iniciada. A presença da atividade enzimática foi observada medindo-se a absorbância inicial e final (RATE) a 299 nm.

3.3.1.2. Testes genotípicos

3.3.1.2.1. Pesquisa de genes relacionados à produção de MβL pela técnica da reação de polimerase em cadeia

As amostras de *P. aeruginosa* detectadas fenotipicamente como produtoras de MβL foram investigadas quanto à presença dos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1} que codificam as MβL utilizando-se a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR).

Para extração do DNA bacteriano as amostras foram subcultivadas em ágar MacConkey e três a cinco colônias de cada amostra foram transferidas para um tubo cônico de microcentrífuga contendo 200 µl de água destilada estéril. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 100°C por 15 minutos. Após este tempo, os debrís celulares foram precipitados por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Dez microlitros do sobrenadante foi utilizado para a reação de PCR.

Em fluxo laminar, foi preparada uma solução mãe (“master mix”) contendo: água milliQ; $MgCl_2$ (concentração final na reação = 1,5mM); tampão 10X PCR (contendo tris-HCl 20mM e e KCl 500 mM) à concentração final de 1x; deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) cuja concentração final por reação foi de 200 μ M cada um deles; enzima Taq DNA polimerase (5 U/ μ l) que foi diluída para uma concentração final de 2,5 U e

*bla*_{VIM-1} originaria um produto com aproximadamente 920 pares de base. Como controles positivos e negativos foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa*, 75-3666 produtora de M β L VIM-1, gentilmente cedida pela Dra. Lalitagauri Deshpande, e a *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

A seqüência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados na amplificação do gene *bla*_{VIM-2} foi: 5' ATGTTCAAACCTTTTGAGTAGTAAG 3' ("sense") e 5' CTAACAACGACTGAGCG 3' ("anti-sense") (Poirel *et al.*,2000; Poirel *et al.*,2001). As condições de ciclagem foram as mesmas utilizadas para a amplificação do gene *bla*_{VIM-1}. A reação de amplificação do gene *bla*_{VIM-2} originaria um produto com aproximadamente 865 pares de base. Como controles positivos e negativos foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa*, 81-11963 produtora de M β L VIM-2, gentilmente cedida pela Dra. Lalitagauri Deshpande e a amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

Na amplificação do gene *bla*_{SPM-1} a seqüência de nucleotídeos do *primer* "sense" foi 5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3' e "anti-sense" 5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3' (Toleman *et al.*,2002). As condições de termociclagem foram as seguintes: cinco minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 40° C (anelamento), um minuto a 68°C (extensão) e cinco minutos de incubação final a 68°C. A reação de amplificação do gene *bla*_{SPM-1} originou um produto com aproximadamente 650 pares de base. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* 1088 produtora de SPM-1, e, como controle negativo, a amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Dez microlitros dos produtos de cada reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, EUA) a 100 V por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (89 nM Tris-Borato e 2mM EDTA pH 8,0). Foi utilizado como marcador do peso molecular 100 pb DNA "ladder" 1 μ g/ μ l ("Invitrogen Life Technologies", Rockville, EUA). O DNA amplificado foi revelado com acréscimo de brometo de etídio (0,5 μ g/ml) no gel. Foi assim, visualizado e fotografado contra luz

3.3.1.2.2. Clivagem dos produtos de PCR

Após a realização das reações de PCR, os amplicons da PCR para o gene *bla*_{SPM-1} foram submetidos à clivagem com as seguintes enzimas de restrição: TaqI e Sau3AI. Em tubo de microcentrífuga, foi adicionado 5 µl de DNA, 1 µl de cada enzima de restrição, 2 µl do tampão 10X concentrado e adequado para as enzimas utilizadas, e água deionizada q.s.p. para um volume final de 20 µl. A mistura foi deixada a 37°C por pelo menos 4 horas. O bloqueio da reação foi feito a 65°C. Os produtos clivados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1% a 100V por 40 minutos. Só foram submetidas à reação de seqüenciamento, para identificação do gene produtor de MβL, as amostras que apresentaram diferentes padrões de clivagem.

3.3.1.2.3. Reação de seqüenciamento

Devido ao alto custo da reação de seqüenciamento foram seqüenciados apenas dois dos amplicons de aproximadamente 650 pb de 2 amostras de *P.aeruginosa* utilizando-se iniciadores *bla*_{SPM-1}. Os amplicons de PCR foram purificados utilizando-se o kit “Concert Rapid PCR Purification System” (LifeTechnologies, Valencia, USA), antes de serem submetido às reações de seqüenciamento conforme as instruções do fabricante.

A reação de seqüenciamento foi preparada em dois tubos de microcentrífuga, utilizando-se de 2 a 10 µl de DNA. Em cada tubo contendo a quantidade de DNA adequada para a reação de seqüenciamento, foi adicionado 2 µl dos iniciadores (“sense” em um tubo e “anti-sense” em outro), 2 µl do tampão de seqüenciamento e 8 µl do kit de seqüenciamento “Big Dye terminator” Versão II que contém os di-deoxinucleotídeos (d-

ciclos de 96° por 10 segundos, 50° por 30 segundos e 60° por 4 minutos. Após o término da reação, o produto foi precipitado para eliminação dos d-dNTPs marcados não incorporados à reação. Após a precipitação e lavagem com etanol, o produto foi ressuspenso em polímero TSR e colocado no aparelho ABI PRISM 310 - Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Califórnia, EUA) para leitura. Após a leitura o resultado foi analisado, editado e submetido ao programa Lasergene (DNASTAR, Madison, Wisconsin) para comparação com os genes similares já descritos na literatura.

3.4 - Avaliação da similaridade genética das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenens

Foram selecionadas para avaliação da similaridade genética através das técnicas de ribotipagem automatizada as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenens confirmadas pela técnica de PCR como produtoras do gene *bla*_{SPM-1} e *bla*_{IMP-1}. Foram incluídas no máximo 15 amostras por centro médico. Para comparação, uma amostra de *P. aeruginosa* resistente a carbapenem, mas não produtora de M β L, isolada de cada um dos centros médicos, que apresentaram amostras produtoras de SPM-1, foi submetida aos testes de tipagem molecular. Foram encaminhadas para a técnica de "Pulsed-Field Gel Eletroforesis" (PFGE) as amostras de *P. aeruginosa* que foram classificadas sob o mesmo ribogrupo pela técnica de ribotipagem automatizada.

3.4.1. Ribotipagem automatizada

As amostras de *P. aeruginosa* foram semeadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 24 horas. Com o auxílio de um bastão plástico fornecido pelo fabricante o crescimento bacteriano foi transferido para um tubo contendo 200 μ l de solução tampão ("Sample Buffer" - Qualicon, Wilmington, DE, USA). A suspensão composta pelas células bacterianas e 200 μ l de solução tampão foi homogeneizada com auxílio de um agitador e 30 μ l desta suspensão foi transferida para um tubo cônico apropriado para introdução das amostras no aparelho.

Na etapa seguinte, o tratamento térmico das amostras foi realizado, inativando as nucleases presentes e preparando as células para a lise. Para a realização deste tratamento, ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados segundo o programa da unidade de tratamento térmico ("Heat Treatment Station"). Após o tratamento térmico, 5 µl dos reagentes de lise A e B (Qualicon, Wilmington, DE, USA) foram adicionados à cada amostra para iniciar a ruptura da membrana das células bacterianas. Em seguida, as amostras foram inseridas no aparelho RiboPrinter[®] (Qualicon, Wilmington, DE, USA) e processadas.

No aparelho, as seguintes etapas foram realizadas: (1) preparo do DNA, onde foi realizada a extração do DNA com sua posterior fragmentação com a enzima de restrição PvuII (2) separação e transferência dos fragmentos de DNA, caracterizada por uma corrida em gel de eletroforese, onde houve a separação dos fragmentos por gradiente de peso molecular, e transferência destes fragmentos para uma membrana de nitrocelulose, utilizando a técnica de "Southern blotting" modificado; (3) processamento da membrana, onde os fragmentos do DNA foram expostos a um tratamento químico-enzimático com uma sonda de DNA, derivada do RNA ribossomal de uma *E. coli* e um marcador quimioluminescente, revelando assim, os fragmentos hibridizados; (4) detecção, as imagens das membranas foram capturadas por uma máquina fotográfica, inseridas no sistema e transferidas eletronicamente para o computador acoplado ao aparelho. No computador, a imagem de cada gel foi tratada e comparada com o banco de dados para a caracterização das cepas. Cinco marcadores de peso molecular foram distribuídos no gel, permitindo que cada coluna, representando os dados da amostra, fosse padronizada de acordo com um marcador padrão, baseado na posição e intensidade das bandas (Hollis *et al.*, 1999).

Coefficientes de similaridade foram calculados pelo programa de computação acoplado ao aparelho, baseando-se na posição e no peso relativo das bandas. Todos os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados como pertencentes ao mesmo ribogruppo. Aqueles que apresentaram coeficientes de similaridade menor que 0,92 foram considerados distintos (Bruce *et al.*, 1996).

3.4.2. Eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE)

As amostras de *P. aeruginosa* agrupadas em um mesmo ribogruppo pela técnica de ribotipagem automatizada foram tipadas também pela técnica da eletroforese pulsada ("Pulsed-Field Gel Electrophoresis" - PFGE) (Pfaller *et al.*, 1992).

Aproximadamente 10 colônias de cada amostra bacteriana foram inoculadas em 10 ml de TSB (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos. Em seguida, o centrifugado (células) foi diluído em 1 ml de solução salina e transferido para um tubo de microcentrifuga de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado. Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da solução salina em µl foi equivalente ao peso do centrifugado em µg. Um volume de 5 µl desta solução foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 300 µl da solução tampão TEN (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada a 340 µl de agarose ("low melt" - FMC, Rockland, EUA) para a formação de pequenos blocos de géis contendo o DNA cromossômico ("plugs"). Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em solução EC (Tris 6mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01 M ; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) a 37°C e a seguir incubados a 50°C, em 2ml de solução ES (EDTA 0,4M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20mg/ml, Sigma - P4914) numa proporção de 1:1 (2 mg de proteinase K para 2 ml de ES), por um período de 12 horas. Após este período de incubação os blocos foram lavados quatro vezes com solução CHEF-TE (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M) e armazenados nessa solução até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

O DNA bacteriano das amostras de *P. aeruginosa* estudadas foram digeridos com a enzima de restrição SpeI (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, USA - 10U por amostra), por 12 a 18 horas à temperatura de 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) e o padrão de variação da corrente elétrica ("switch time") foi de 5 a 90 segundos. A eletroforese foi

realizada por um período de 24 horas, em solução 0,5x TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M) à uma temperatura de 13°C e utilizando uma corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). O gel foi revelado com brometo de etídio (0,08 µL/ml) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta (Quantity one 4.4.0, Bio-Rad - Califórnia, EUA).

Os perfis moleculares foram analisados visualmente, seguindo o critério de Pfaller e colaboradores (1992). Foram consideradas idênticas, derivadas de uma mesma cepa ou pertencentes a um mesmo clone, todas as amostras que apresentaram perfil migratório das bandas idêntico. As amostras que apresentaram perfil migratório com diferença de até três bandas foram consideradas semelhantes e subtipos pertencentes a um mesmo clone. As amostras que apresentaram quatro ou mais bandas discordantes foram consideradas distintas.

4 – RESULTADOS

4.1 – Amostras Bacterianas

Foram encaminhadas ao LEMC 206 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, entre janeiro de 2001 a junho de 2003. Todas as amostras obedeceram ao critério de inclusão de resistência aos carbapenems, ou seja, imipenem e/ou meropenem, ou a pelo menos a um deles. A distribuição das 206 amostras clínicas de *P. aeruginosa* está apresentada na Tabela 3 e pode ser simplificada da segunda forma: cateter venoso (15,55%), escarro (3,00%), ferida cirúrgica (4,40%), hemocultura (10,

Tabela 3. Distribuição das 206 amostras de *P. aeruginosa* coletadas dos 25 centros brasileiros entre janeiro de 2001 e junho de 2003 de acordo com o sítio corporal.

Centro	Cidade	Estado	Cateter venoso	Escarro	Ferida cirúrgica	Hemocultura	Líquidos	LCR ^a	Pele	Sec. ^a traqueal	secreções	TGI ^a	TRI ^a	Urina	Não Especificado	Total por Centro
1	Montes Claros	MG								1						1
2	São Paulo	SP	2		4			1			1	1		1		10
3	Salvador	BA	1					1	1				1			4
4	Carapicuíba	SP				2		1					1			4
5	Londrina	PR	3					3		3		1	5			15
6	Brasília	DF	2	1				2	3			2	4			15
8	Santo André	SP			1			2			8		4			15
9	Fortaleza	CE	2						2			2	2			8
10	Fortaleza	CE							1							1
11	Belo Horizonte	MG	1		2								3			6
13	Porto Alegre	RS		3									1	4		8
14	Marília	SP	3		4			2	1	1		1	1			14
15	Maringá	PR	1					1		1			3			6
18	São Luis	MA	4						6	1			2			13
19	Florianópolis	SC	3		1	1			1				3			9
20	Curitiba	PR										1	2			3
21	Goiânia	GO		1					1						1	3
22	São Paulo	SP	4	1				1	2	1	1		2	1		13
23	São Paulo	SP						4		2			1			7
24	Diadema	SP					1						1	1		3
25	Rio de Janeiro	RJ	1									2	1			4
26	Rio de Janeiro	RJ												4		4
27	São Paulo	SP				15										15
77	Belo Horizonte	MG	5		1	1	1	2	3				1	1		15
88	João Pessoa	PB			1			1	2			3		3		10
Total por Sítio Corporal			32	6	9	22	3	1	21	23	10	10	13	38	18	206

a. TGI, trato gastrointestinal; LCR, líquido cefalorraquidiano; Sec, secreção; TRI, trato respiratório inferior.

4.2 – Avaliação da sensibilidade in vitro a antimicrobianos pelo método de disco-difusão

A porcentagem de amostras de *P. aeruginosa* sensíveis, intermediárias e resistentes aos diferentes antimicrobianos de acordo com a técnica de disco-difusão pode ser observada na Tabela 4.

De maneira geral, altas taxas de resistência aos antimicrobianos foram observadas, já que as amostras de *P. aeruginosa* enviadas pelos centros médicos ao LEMC eram resistentes a ambos carbapenens, ou a pelo menos um deles. Das 206 amostras avaliadas pelo método de disco-difusão 95,8% e 81,4% foram resistentes a imipenem e a meropenem, respectivamente. A polimixina B foi o único antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de todas as amostras estudadas apresentando uma taxa de sensibilidade de 100%. O segundo antimicrobiano que apresentou a maior taxa de sensibilidade foi o aztreonam (48,4%), seguido pelos antimicrobianos piperacilina e piperacilina/tazobactam que apresentaram a mesma sensibilidade (38,5%). Entre as cefalosporinas avaliadas, a cefepima apresentou maior porcentagem de sensibilidade que a ceftazidima (26,2% versus 23,9%). As taxas de sensibilidade para os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina foram 18,7% e 11,3%, respectivamente. A ciprofloxacina apresentou uma das menores taxas de sensibilidade (11,5%).

Tabela 4. Perfil de sensibilidade in vitro a antimicrobianos das 206 amostras de *P. aeruginosa* pela técnica de disco-difusão.

Antimicrobianos	% Sensibilidade^a	% Resistência^a
Aztreonam	48,4	24,7
Ceftazidima	23,9	66,0
Cefepima	26,2	61,9
Imipenem	2,9	95,8
Meropenem	9,8	81,4
Piperacilina	38,5	61,5
Piperacilina/Tazobactam	38,5	61,5
Amicacina	18,7	79,9
Gentamicina	11,3	85,8
Ciprofloxacina	11,5	87,4
Polimixina B ^b	100,0	0,0

a. Porcentagens de sensibilidade e resistência calculadas de acordo com os limites estabelecidos pelo NCCLS (2004) com exceção da polimixina B (Gales, Reis & Jones, 2001).

b. Os limites de resistência e sensibilidade utilizados para a polimixina B foram $\leq 10\text{mm}$ e $\geq 14\text{mm}$, respectivamente (Gales, Reis & Jones, 2001).

4.3 – Avaliação das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L pela metodologia da microdiluição em caldo

As amostras classificadas como resistentes a imipenem pelo teste de disco-difusão e que apresentaram o produto de amplificação para os genes que codificam a produção de metalo- β -lactamase (M β L) foram também avaliadas pela metodologia da

microdiluição em caldo, totalizando 85 amostras (41,3%) testadas pelas duas metodologias. Ainda com relação ao imipenem, houve concordância de 100% entre a técnica de disco-difusão e microdiluição em caldo na classificação das amostras quanto à categoria de sensibilidade.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados referentes à potência antimicrobiana e porcentagem de sensibilidade dos agentes antimicrobianos testados contra as 85 amostras de *P. aeruginosa*. Entre os antimicrobianos avaliados pela técnica de microdiluição em caldo, a polimixina E foi o antimicrobiano mais potente (MIC_{50} , $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$), capaz de inibir o crescimento de 100% das amostras de *P. aeruginosa*. O segundo antimicrobiano mais potente foi o aztreonam (MIC_{50} , 8 $\mu\text{g/ml}$) apresentando uma taxa de sensibilidade de 57,8%. Apesar de apresentar fraca atividade o antimicrobiano piperacilina/tazobactam (MIC_{50} , 128 $\mu\text{g/ml}$) foi capaz de inibir 24,1% das amostras de *P. aeruginosa*. Apesar da amicacina apresentar fraca atividade (MIC_{50} , > 32 $\mu\text{g/ml}$), este antimicrobiano apresentou a terceira maior taxa de sensibilidade, que mesmo assim chegou somente a 7,2%. As cefalosporinas, ceftazidima e cefepima exibiram fraca atividade (MIC_{50} , > 32 $\mu\text{g/ml}$) e todas as amostras apresentaram 100% de resistência. As quinolonas apresentaram fraca atividade (ciprofloxacina MIC_{50} , > 4 $\mu\text{g/ml}$; gatifloxacina MIC_{50} , > 8 $\mu\text{g/ml}$), e ambas inibiram somente 1,2% das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L. Todas as amostras exibiram 100% de resistência aos carbapenems, imipenem e meropenem.

Tabela 5. Potência antimicrobiana e porcentagem de sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados contra as 85 amostras clínicas de *P. aeruginosa* produtoras de M β L.

Antimicrobianos	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		%Sensibilidade ^b	%Resistência ^b
	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀ ^a		
Piperacilina/tazobactam	128	>256	24,1	75,9
Ceftazidima	>32	>32	0,0	100,0
Cefepima	>32	>32	0,0	100,0
Aztreonam	8	32	57,8	42,2
Imipenem	>32	>32	0,0	100,0
Meropenem	>32	>32	0,0	100,0
Amicacina	>64	>64	7,2	92,8
Gentamicina	>16	>16	3,6	96,4
Ciprofloxacina	>4	>4	1,2	98,8
Gatifloxacina	>8	>8	1,2	98,8
Polimixina E ^c	$\leq 0,5$	2	100,0	0,0

a. A MIC foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, a MIC₅₀ e MIC₉₀ foram definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

b. As porcentagens de sensibilidade e resistência foram calculadas de acordo com os limites de sensibilidade estabelecidos pelo NCCLS, com exceção da polimixina E (NCCLS, 2004).

c. O limite de resistência utilizado para a polimixina E foi $\geq 4\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gales, Reis & Jones, 2001).

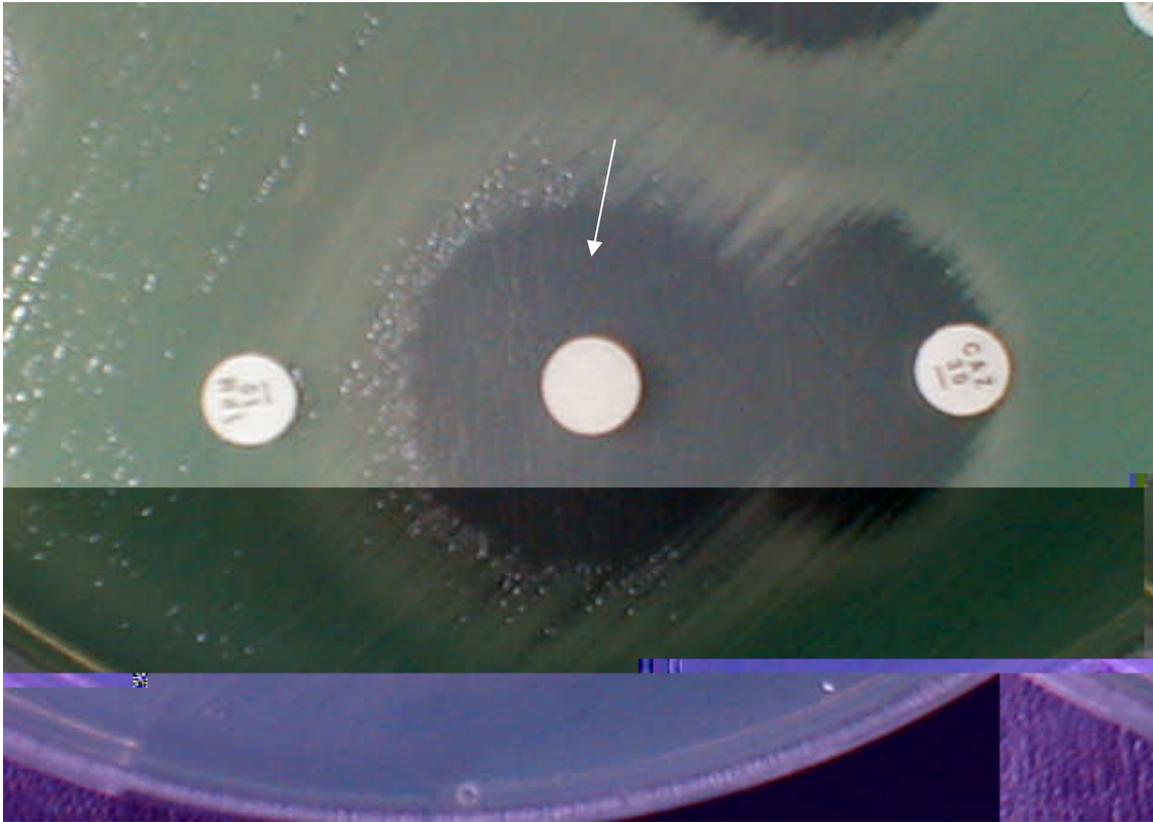


Figura 1. Amostra de *P. aeruginosa* apresentando teste fenotípico positivo para a produção de metalo- β -lactamase. A seta indica o disco de papel de filtro estéril contendo 3 μ l de uma solução pura de ácido 2-mercaptopropiônico a 1,2 g/ml.

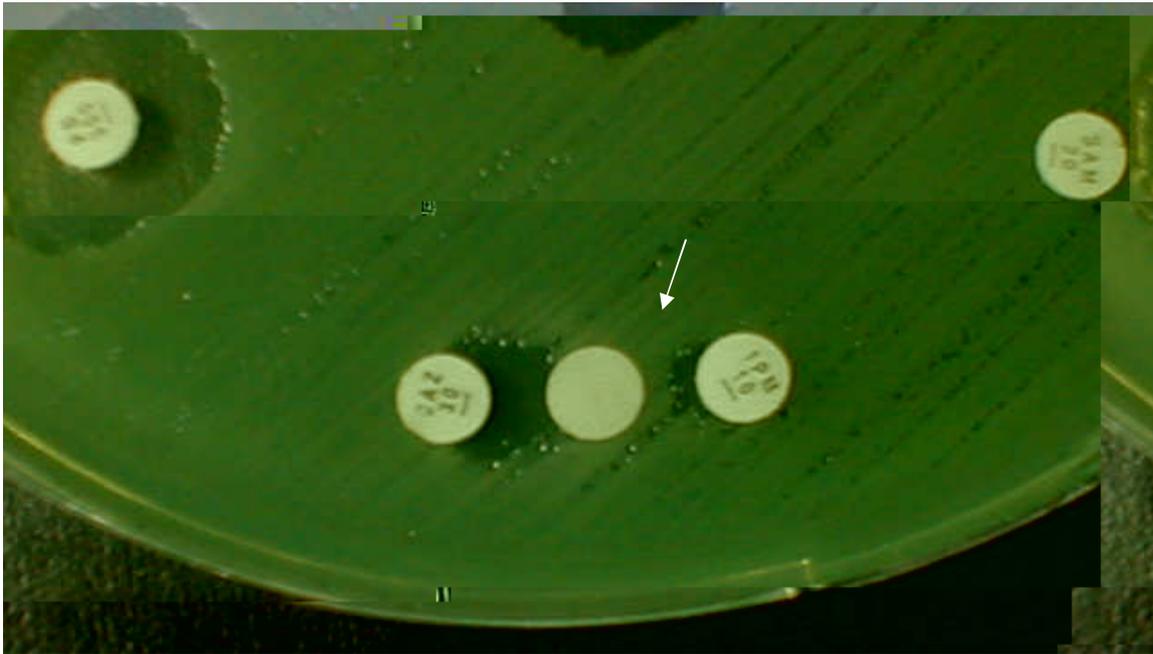


Figura 2. Amostra de *P. aeruginosa* apresentando teste fenotípico positivo para a produção de metalo- β -lactamase. A seta indica o disco de papel de filtro estéril contendo 5 μ l de uma solução de EDTA a 100mM.



Figura 3. Etest M β L positivo para amostra de *P. aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase. Notar o decréscimo > 3 diluições na MIC do imipenem associado ao EDTA em comparação a MIC de imipenem sozinho.

4.4.2 – Avaliação da Hidrólise de Carbapenems

As treze amostras fenotipicamente classificadas como produtoras de metalo- β -lactamases somente pelo inibidor EDTA foram submetidas a confirmação da capacidade de hidrolisar o meropenem, por ensaio espectrofotométrico, pois não houve a detecção dos genes que codificam M β L pela técnica de PCR. As treze amostras não foram capazes de hidrolisar o meropenem.

4.4.3 - Detecção dos genes que codificam as metalo- β -lactamases

Dentre as 98 (47,6%) amostras de *P. aeruginosa* inicialmente classificadas fenotipicamente como produtoras de M β L, a presença do gene *bla*_{SPM-1} foi confirmada em 82 (83,7%) isolados, na Figura 4 podemos observar o produto de amplificação de aproximadamente 650 pb produzido por amostras de *P. aeruginosa* produtoras de *bla*_{SPM-1}. Três amostras (16,3%) apresentaram produto de amplificação de PCR para o gene *bla*_{IMP-1}. As treze amostras fenotipicamente classificadas como produtoras de M β L pelo inibidor EDTA e com fenótipo negativo para o inibidor ácido 2- mercaptopropiônico não apresentaram produto de amplificação de PCR para nenhum dos genes pesquisados.

As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L do tipo SPM-1 foram encontradas em quinze centros médicos, localizados em nove estados brasileiros, estes estão ilustrados na Figura 4 .

Os centros que apresentaram o isolamento das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L do tipo SPM-1 foram os seguintes: centro 2 (Hospital do Servidor Público Estadual – São Paulo, SP); centro 3 (Hospital Aliança – Salvador, BA), centro 5 (Universidade Estadual de Londrina – Londrina, PR); centro 6 (Hospital de Base de Brasília – Brasília, DF); centro 8 (Hospital e Maternidade Brasil – Santo André, SP); centro 9 (Laboratório Louis Pauster – Fortaleza, CE); centro 11 (Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, MG); centro18 (Laboratório Cedro – São Luis, MA); centro 20 (Universidade

Estadual do Paraná – Curitiba, PR); centro 22 (Hospital Sírio Libanês – São Paulo, SP); centro 23 (Hospital Dante Pazzanese - São Paulo, SP); centro 26 (Centro Administrativo São Sebastião, CASS, Rio de Janeiro, RJ); centro 27 (Hospital São Paulo – UNIFESP - São Paulo, SP); centro 77 (Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG); centro 88 (Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, PB). As três amostras com produtos de amplificação de PCR para o gene *bla*_{IMP-1} foram detectadas em dois centros, uma amostra (P2814) estava presente no Centro 6 (Hospital de Base de Brasília, DF) e duas amostras (P3486, P3489) foram encontradas no centro 88 (Universidade Federal da Paraíba, PB).

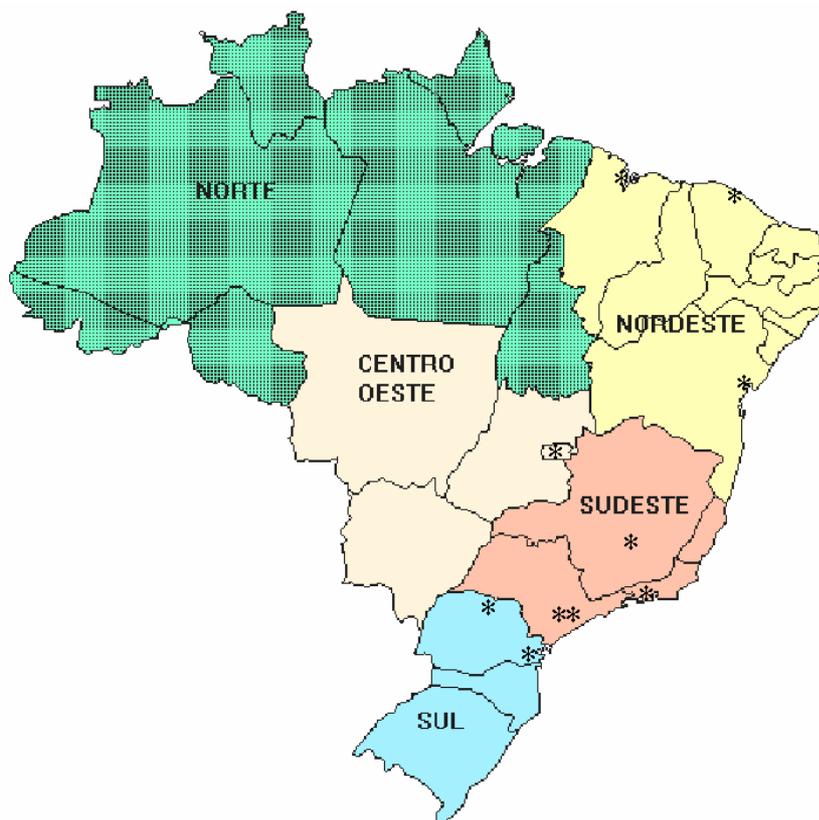


Figura 4. Localização dos centros médicos que enviaram amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1.

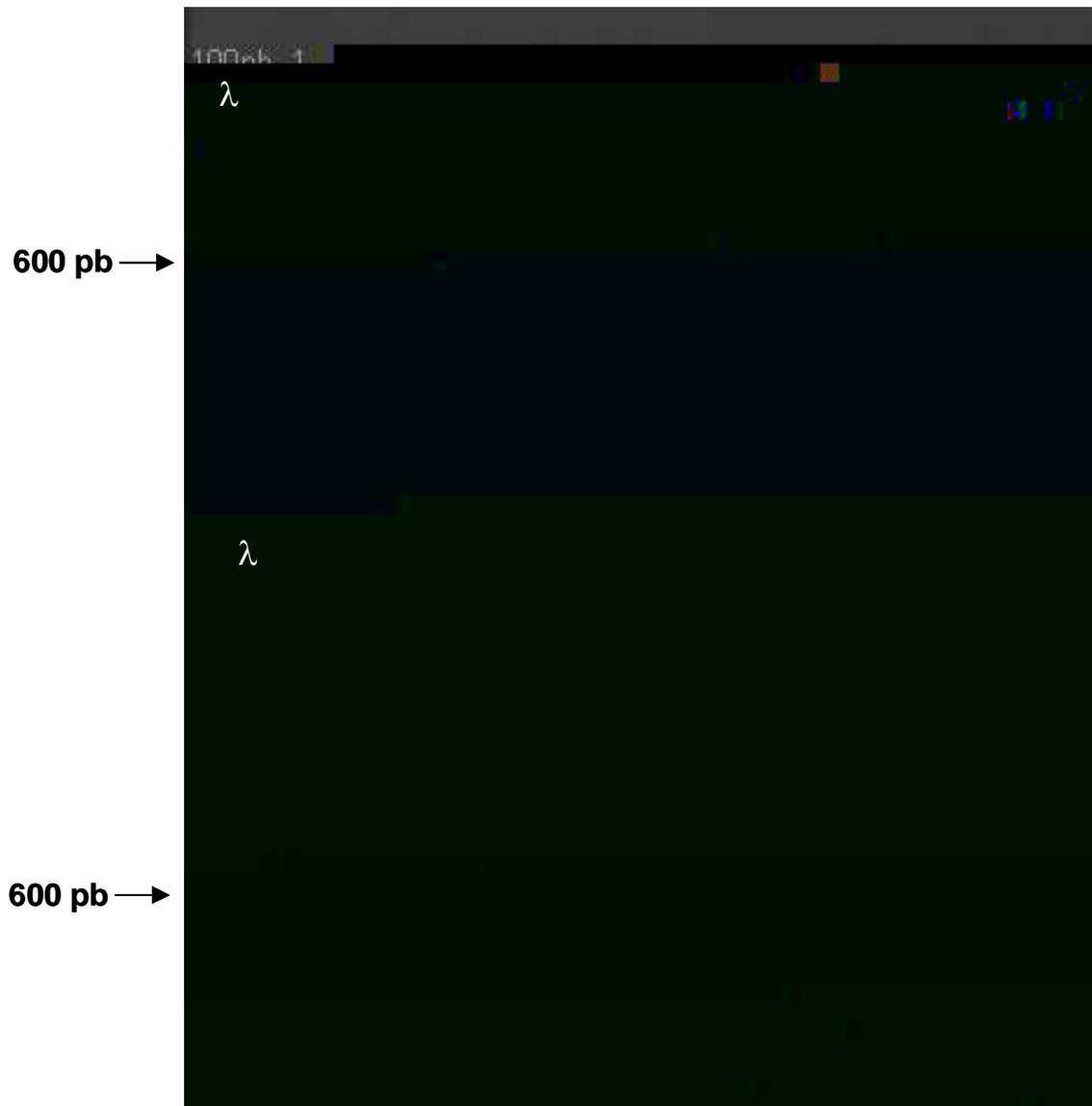


Figura 5: DNA “ λ ladder” clivado 100 pb; linha 1, amostra de *Pseudomonas aeruginosa* 1088 controle positivo *bla*_{SPM-1}; linha 2, amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853 controle negativo; linha 3, amostra 2975; linha 4, amostra 2477; linha 5, amostra 2611; linha 6, amostra 2525; linha 7, amostra 2807; linha 8, amostra 3095; linha 9, amostra 2431; linha 10, amostra 3102; linha 11, amostra 2966; linha 12, amostra 2613; linha 13, amostra 3141; linha 14, amostra 2818; linha 15, amostra 2951; linha 16, amostra 3747; linha 17, amostra 4618; linha 18, amostra 3298; linha 19, amostra 3488; linha 20, amostra 926 e linha 21, amostra 1638. As amostras das linhas 5, 8, 10 e 11 foram fenotipicamente detectadas como produtoras de M β L, mas não foram confirmadas pela taxa de hidrólise do meropenem.

4.5 - Clivagem e seqüenciamento dos amplicons obtidos com primers *bla*_{SPM-1}

Os amplicons, com aproximadamente 650 pb, obtidos pela reação de PCR com a utilização do *primer bla*_{SPM-1} foram clivados por duas enzimas de restrição Taq α I e Sau3AI. O amplicon do gene *bla*_{SPM-1} foi clivado em dois fragmentos com aproximadamente 420 pb e o outro com aproximadamente 230 pb. E todos os amplicons foram igualmente clivados. A enzima *Sau3AI* clivou os produtos de amplificação em dois fragmentos, um de aproximadamente 350 pb e outro de aproximadamente 300 pb, e também foram idênticos em todos os amplicons clivados.

Após a clivagem com as enzimas de restrição foram selecionados dois dos produtos amplificados pela reação de PCR com os primers *bla*_{SPM-1}, das amostras produtoras de M β L, 2431 e 2975. Estes dois produtos foram escolhidos aleatoriamente e assim purificados para serem submetidos ao seqüenciamento. O produto seqüenciado foi submetido ao programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para determinação da homologia entre o produto seqüenciado e outras seqüências de genes já descritas na literatura. A similaridade genética foi de 100% com os genes produtores de M β L da família SPM. Após uma análise de similaridade mais detalhada entre estes genes, utilizando-se o programa MegAlign do DNASTar - CLUSTAL V foi confirmado que a seqüência do gene amplificado era 100% homóloga à seqüência do gene que codifica a M β L SPM-1 - acesso ao gene bank AJ492820.

4.6 - Tipagem Molecular

Os padrões de bandas gerados pela técnica de ribotipagem automatizada (RiboPrinter[®] Microbial Characterization System, Qualicon, Wilmington, EUA) possibilitou a análise da similaridade genética entre as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Os diferentes perfis foram divididos em ribotipos ou ribogrupos designados pelo número da corrida, seguido do número correspondente a linha em que a amostra foi identificada pela primeira vez.

Foram ribotipadas as 98 amostras de *P. aeruginosa* com sensibilidade reduzida aos carbapenens, 82 amostras confirmadas como produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, 3 amostras

como produtoras do gene *bla*_{IMP-1} e 13 não produtoras de M β L isoladas de cada centro médico, que apresentavam amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L. Os centros médicos 3, 20 e 77 apresentaram somente amostras de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*_{SPM-1} e por isso não tiveram amostras não produtoras de M β L tipadas. A análise dos padrões gerados pela ribotipagem das 98 amostras de *P. aeruginosa* tipadas permitiu a identificação de 42 ribogrupos distintos.

Os dados do centro médico, cidade, estado, sítio corpóreo, teste fenotípico, presença do gene *bla*_{SPM-1}, ribogrupo e perfil de PFGE das amostras com sensibilidade reduzida ao carbapenens avaliadas no estudo podem ser observados na Tabela 6.

Quatro ribogrupos, 69-5, 72-1, 72-3, 88-2 foram encontrados em mais de uma amostra.

O ribogrupo 69-5 foi identificado em duas amostras de *P. aeruginosa* provenientes dos centros médicos localizados em Belo Horizonte e São Luiz. Porém, após a tipagem molecular destas amostras pela técnica de PFGE, foi observado que elas pertenciam a genótipos distintos.

Já o ribogrupo 72-1 foi encontrado em duas amostras produtoras de M β L isoladas em João Pessoa e um amostra não produtora de M β L isolada em Fortaleza. De acordo com os resultados de PFGE, estas amostras foram consideradas pertencentes ao mesmo genótipo.

Amostras isoladas em São Paulo e Rio de Janeiro produtoras de SPM-1 foram classificadas sob ribogrupo 88-2. Pela técnica de PFGE, estas amostras foram classificadas como pertencentes ao mesmo genótipo.

Cinquenta e três amostras de *P. aeruginosa*, 52 delas produtoras de SPM-1 e uma não produtora de M β L, possuíam o ribogrupo 72-3. Estas amostras foram provenientes de 13 centros médicos, localizados em 11 cidades de 9 estados brasileiros. De acordo com a técnica de PFGE, estas amostras pertencem a um único padrão de PFGE denominado padrão C. Quatro subtipos do padrão C foram encontrados. O padrão C em 39 amostras, C₁ em 13 amostras, C₂, C₃ e C₄ em 1 amostra, respectivamente.

A análise do DNA cromossômico bacteriano gerado pela ribotipagem automatizada demonstrou uma grande diversidade genômica entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems produtoras de M β L. A produção de SPM-1 foi detectada em 30 ribotipos distintos entre as 82 amostras de *P. aeruginosa*. Enquanto, as três amostras de IMP-1 pertencem a dois ribogrupos distintos 72-1 e 88-5.

Tabela 6. Variabilidade genética das 85 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MβL isoladas correlacionados ao local e sítio corpóreo de isolamento.

Amostra	Centro Médico	Cidade	Estado	Sítio Corpóreo	Teste fenotípico	Gene <i>bla</i> _{SPM-1}	Ribotipo	Padrão PFGE
3298	77	Belo Horizonte	MG	Urina	positivo	positivo	105-8	14.0123(n)-14.0123(n)
3301	77	Belo Horizonte	MG	Pele	positivo	positivo	105-3	
3302	77	Belo Horizonte	MG	C. venoso	positivo	positivo	105-4	
3309	77	Belo Horizonte	MG	Sangue	positivo	positivo	105-5	
3310	77	Belo Horizonte	MG	S. traqueal	positivo	positivo	105-6-5	JTJ /R10
3311	77	Belo Horizonte	MG	C. venoso	positivo	positivo	105-7	
3305	77	Belo Horizonte	MG	Pele	positivo	positivo	106-2	
3307	77	Belo Horizonte	MG	C. venoso	positivo	positivo	106-4-5	JTJ /R10
3496	88	João Pessoa	PB	TRI ^a	negativo	negativo	122-5	
3223	2	São Paulo	SP	TGI ^a	negativo	negativo	127-8	
3141	18	São Luis	MA	C. venoso	positivo	positivo	129-4	
3748	23	São Paulo	SP	Secreção	positivo	positivo	129-8	
3337	22	São Paulo	SP	Urina	negativo	negativo	133-1	
4619	26	Rio de Janeiro	RJ	NE ^a	negativo	negativo	159-7	
2669	11	Belo Horizonte	MG	Urina	negativo	negativo	69-5	A
3135	18	São Luis	MA	C. Venoso	negativo	negativo	69-5	B
2842	23	São Paulo	SP	Secreção	negativo	negativo	70-4	
2800	6	Brasília	DF	Pele	negativo	negativo	71-2	
2478	3	Salvador	BA	Pele	positivo	positivo	71-5	
2607	9	Fortaleza	CE	TRI ^a	negativo	negativo	72-1	
3486	88							

2608	9	Fortaleza	CE	Urina	positivo	positivo	72-3	C
2756	9	Fortaleza	CE	Urina	positivo	positivo	72-3	C
2807	6	Brasília	DF	S. traqueal	positivo	positivo	72-3	C
2818	20	Curitiba	PR	TRI ^a	positivo	positivo	72-3	C ₁
2819	20	Curitiba	PR	Urina	positivo	positivo	72-3	C
2820	20	Curitiba	PR	Urina	positivo	positivo	72-3	C
1110	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
1088	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
1111	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
1228	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
1129	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
1212	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
2951	22	São Paulo	SP	Pele	positivo	positivo	72-3	C ₁
2671	5	Londrina	PR	TGI ^a	positivo	positivo	72-3	C
2675	5	Londrina	PR	C. venoso	positivo	positivo	72-3	C
2746	5	Londrina	PR	C. venoso	positivo	positivo	72-3	C ₂
2747	5	Londrina	PR	Urina	positivo	positivo	72-3	C
3966	11	Belo Horizonte	MG	F. cirúrgica	positivo	positivo	72-3	C ₁
3967	11	Belo Horizonte	MG	Urina	positivo	positivo	72-3	C
4618	26	Rio de Janeiro	RJ	NE ^a	positivo	positivo	72-3	C ₃
3142	18	São Luis	MA	Urina	positivo	positivo	72-3	C ₄
3964	11	Belo Horizonte	MG	Urina	positivo	positivo	72-3	C
3965	11	Belo Horizonte	MG	F. cirúrgica	positivo	positivo	72-3	C
2975	2	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C
2673	5	Londrina	PR	Secreção	positivo	positivo	72-3	C
2745	5	Londrina	PR	Secreção	positivo	positivo	72-3	C
2529	5	Londrina	PR	Secreção	negativo	negativo	72-3	C
2605	8	Santo André	SP	Sangue	positivo	positivo	72-3	C ₁
2672	8	Santo André	SP	Secreção	positivo	positivo	72-3	C ₁
3488	88	João Pessoa	PB	F. cirúrgica	positivo	positivo	72-3	C
3490	88	João Pessoa	PB	Pele	positivo	positivo	72-3	C
3491	88	João Pessoa	PB	NE ^a	positivo	positivo	72-3	C
3493	88	João Pessoa	PB	S. traqueal	positivo	positivo	72-3	C
3494	88	João Pessoa	PB	NE ^a	positivo	positivo	72-3	C
3495	88	João Pessoa	PB	TRI ^a	positivo	positivo	72-3	C
3335	22	São Paulo	SP	TGI ^a	positivo	positivo	72-3	C ₁
2525	5	Londrina	PR	Secreção	positivo	positivo	77-1	
2527	5	Londrina	PR	Urina	positivo	positivo	77-2	
2433	8	Santo André	SP	TGI ^a	negativo	negativo	77-4	
2533	8	Santo André	SP	TGI ^a	positivo	positivo	77-5	
2535	8	Santo André	SP	TGI ^a	positivo	positivo	77-7	
2536	8	Santo André	SP	TGI ^a	positivo	positivo	77-8	
2526	5	Londrina	PR	C. venoso	positivo	positivo	78-4	
2640	3	Salvador	BA	C. venoso	positivo	positivo	79-8	
2613	9	Fortaleza	CE	C.venoso	positivo	positivo	82-2	
2610	9	Fortaleza	CE	C. venoso	positivo	positivo	82-5	
1104	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	87-1	

1280	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	87-4	
2839	2	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	88-1	
4620	26	Rio de Janeiro	RJ	NE ^a	positivo	positivo	88-2	D
3747	23	São Paulo	SP	Secreção	positivo	positivo	88-2 ^c	
2814	6	Brasília	DF	TRI ^p	positivo	negativo	88-5	
1621	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	89-5	
1638	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	89-6	
1221	27	São Paulo	SP	Sangue	negativo	negativo	90-7	
929	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	92-1	
956	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	92-4	
971	27	São Paulo	SP	Sangue	positivo	positivo	92-5	
3304	77	Belo Horizonte	MG	S. traqueal	positivo	positivo	97-7	

a. TGI, trato gastrointestinal; LCR, líquido cefalorraquidiano; LBA, lavado brônquico alveolar; TRI, trato respiratório inferior; S., secreção; C., cateter; F., ferida; NE, não especificado.

b. amostra produtora de metalo- β -lactamase do tipo IMP-1.

c. amostra não viável para realização de PFGE.

5 – DISCUSSÃO

As infecções causadas por microrganismos Gram-negativos multirresistentes, particularmente aquelas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* tem aumentado em todo o mundo. Segundo os dados fornecidos pelo *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System*, entre 1992 a 2002, *P. aeruginosa* atualmente é considerada um dos principais responsáveis pelas infecções hospitalares devido à sua frequência e à sua elevada resistência antimicrobiana. Um estudo de vigilância conduzido entre 1997 a 2000 nos Estados Unidos mostrou que 16% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* eram resistentes a pelo menos 3 drogas anti-*Pseudomonas* (amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e piperacilina) e, que 1% destas amostras eram resistentes a todos estes antimicrobianos (Livermore *et al.*, 2002).

Dados do Programa SENTRY, de Vigilância de Resistência Bacteriana, coletados no período entre 1997 e 2001, na América Latina, mostraram que a resistência aos carbapenens dobrou durante o período de estudo e que a maior redução na taxa de sensibilidade foi observada para o meropenem (83% versus 64,4%) (Andrade *et al.*, 2003).

Altas taxas de resistência aos agentes antimicrobianos avaliados, no presente estudo, foram detectadas entre as 206 amostras de *P. aeruginosa* previamente categorizadas como resistentes aos carbapenens isoladas dos 26 centros médicos participantes do projeto multicêntrico de vigilância de resistência a antimicrobianos. Provavelmente, as altas taxas de resistência a antimicrobianos encontrada entre as amostras avaliadas possa ser atribuída em parte ao critério de seleção das amostras, resistência a imipenem e/ou meropenem.

No presente estudo, todas as 206 amostras de *P. aeruginosa* foram sensíveis a polimixina B, pela técnica de disco-difusão e o mesmo resultado de percentual de sensibilidade, 100%, foi obtido pelo antimicrobiano polimixina E, pela técnica de MIC, nas 98 amostras de *P. aeruginosa* com fenótipo positivo para M β L. Levin e colaboradores

(1999), reportam o uso intravenoso da polimixina E no tratamento de infecções causadas por amostras multirresistentes de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.. Segundo este trabalho, 35 (58,0%) de 60 pacientes foram tratados com sucesso, no entanto a falência terapêutica chegou a 75,0% quando a colisitina foi utilizada para o tratamento de pneumonias (Levin *et al.*, 1999). No entanto, são descritos o aparecimento de amostras clínicas de *P. aeruginosa* com diminuição da sensibilidade à polimixina (Groisman, Kayser & Soncini 1997). Li e colaboradores relatam a diminuição na atividade como também na potência antimicrobiana da polimixina E em amostras de *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 2005).

Os antimicrobianos avaliados no presente estudo demonstraram baixa atividade *in vitro*, contra as amostras de *P. aeruginosa* estudadas. O aztreonam apresentou um percentual de sensibilidade de 48,4% nas 206 amostras de *P. aeruginosa*, já nas 85 amostras de *P. aeruginosa* com fenótipo positivo para M β L o percentual de sensibilidade foi de 57,8%. Inúmeros estudos relatam que as amostras produtoras de M β L geralmente apresentam baixas MICs para o antimicrobiano aztreonam (Lauretti *et al.*, 1999; Osano *et al.*, 1994; Poirel *et al.*, 2000; Riccio *et al.*, 2000; Toleman *et al.*, 2002). A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em *P. aeruginosa* pode ser devido à hiperprodução da β -lactamase cromossômica do tipo AmpC. A hiperprodução desta enzima pode levar à resistência às penicilinas e às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, no entanto, os carbapenens são estáveis frente à hidrólise por parte dessa β -lactamase (Vila & Marco, 2002). A resistência aos carbapenens não é apenas pela produção de β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenens, mas também por outros mecanismos como: diminuição da permeabilidade de membrana externa, modificações nas PBPs e efluxo ativo (Livermore *et al.*, 1996; 2001; 2002; Rasmussen & Bush, 1997; Bush *et al.*, 1998; Nordmann & Poirel, 2002). Portanto, mecanismos adicionais de resistência como alteração das proteínas da membrana externa e efluxo devem estar presentes nas amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens não produtoras de M β L.

Um estudo conduzido nos Estados Unidos avaliando mais de 2000 isolados de *P. aeruginosa* mostrou que as taxas de sensibilidade encontradas para a ceftazidima e a cefepima foram superiores às observadas neste estudo (Ramphal *et al.*, 2000).

A introdução das fluoroquinolonas na prática clínica foi associada ao surgimento de resistência entre certas bactérias, as quais eram inerentemente menos sensíveis a esta classe como, por exemplo, a *P. aeruginosa*. Mesmo com o advento das novas fluorquinolonas, nenhuma nova molécula apresenta melhor atividade contra amostras de *P. aeruginosa* que a ciprofloxacina. No presente estudo, somente 11,5%, das 206 amostras de *P. aeruginosa* foram sensíveis a esta droga e apenas 1,2% das 85 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L, foram sensíveis. Entre os mecanismos de resistência as fluoroquinolonas estão a extrusão por bombas de efluxo e mutações nas topoisomerasas II e IV (Hooper *et al.*, 2000).

A correlação entre o uso de imipenem e o desenvolvimento de resistência durante o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* tem sido reportada em vários estudos (Quinn *et al.*, 1986; Troillet *et al.*, 1997; Carmelli *et al.*, 1999). Além do desenvolvimento de resistência ao imipenem, estes estudos mostram também a associação entre o consumo de imipenem e o desenvolvimento de resistência à ceftazidima, à ciprofloxacina e à piperacilina/tazobactam durante o tratamento (Carmelli *et al.*, 1999).

Atualmente, relatos cada vez mais freqüentes da presença de amostras produtoras de M β L em diferentes regiões do mundo foram reportados, incluindo o Brasil (Gales *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2004; Sader *et al.*, 2005). Com isso houve a necessidade do desenvolvimento de um teste que fosse simples e de baixo custo para a triagem de amostras produtoras de M β L (Arakawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003).

Arakawa e colaboradores (2000) propuseram um simples teste de disco aproximação utilizando como inibidores o EDTA e o 2-MPA e como substratos os discos comerciais de imipenem e ceftazidima com excelentes resultados (Arakawa *et al.*, 2000). A maioria destes testes utiliza os inibidores de M β L derivados de ésteres de thiol como ácido mercaptoacético, ácido mercaptocarboxílico, ácido 2-mercaptopropiônico e ácido mercaptoetanol, *p*-clorometilbenzoato, metais pesados como Hg (II), Fe (II), Fe (III) Cu (II), ácido etilenodiaminotretaacético e ácido succínico (Arakawa *et al.*, 2000; Goto *et al.*, 1997; Greenlee *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 1999; Marumo *et al.*, 1995; Mollard *et al.*, 2001; Senda *et al.*, 1996b). Deste modo, testes baseados na inibição da atividade das

M β L por compostos derivados do ácido tiolático, apesar de bastante tóxicos, são adequados para a triagem dessas amostras (Arakawa *et al.*, 2000).

Relatos cada vez mais freqüentes de amostras produtoras de metalo- β -lactamases, fora do Japão, local onde a primeira M β L foi reportada em 1991, citam a utilização de inibidores dessas enzimas em testes laboratoriais (Arakawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003).

No presente estudo foram selecionados dois inibidores de M β L, o ácido 2-mercaptopropiônico e EDTA, para serem utilizados no teste de disco aproximação com os antimicrobianos (substratos) ceftazidima e imipenem (Arakawa *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2002).

Semelhante aos resultados apresentados por Arakawa e colaboradores (2000), no presente estudo, o inibidor de M β L ácido 2-mercaptopropiônico apresentou melhor atividade que o EDTA na detecção das M β L. Este estudo mostrou que 98 amostras (47,6%) das 206 estudadas produziram M β L. Das 98 amostras fenotipicamente produtoras de M β L, 85 apresentaram amplificação para os genes que codificam a produção de metalo- β -lactamases pesquisados (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VM-2} e *bla*_{SPM-1}). Dentre as amostras produtoras de M β L detectadas pelo 2-MPA, 96,5% foram do tipo SPM, 3,5% do tipo IMP. No entanto, treze amostras fenotipicamente classificadas como produtoras de M β L pelo inibidor EDTA e com fenótipo negativo para o inibidor ácido 2-mercaptopropiônico não apresentaram amplificação para nenhum dos genes pesquisados. Os experimentos de PCR foram repetidos e os resultados dessas amostras foram reprodutíveis, dessa maneira, não se pode descartar a possibilidade dessas amostras produzirem um novo tipo de enzima. Estas treze amostras de *P. aeruginosa* foram submetidas a avaliação da taxa de hidrólise ao meropenem por ensaio espectrofotométrico e não foram capazes de hidrolisar este β -lactâmico após incubação dos seus extratos brutos de β -lactamase. Todas as amostras fenotipicamente classificadas como produtoras de M β L pelo teste de aproximação de discos utilizando os inibidores EDTA e 2-MPA foram também classificadas como produtoras pelo Etest M β L (Walsh *et al.*, 2000). Sabe-se que altas

provavelmente estas treze amostras tiveram o seu crescimento inibido pelo EDTA, o que levou à falsa identificação de fenótipo de M β L. A concentração final do EDTA utilizada na fita de Etest M β L é de 320 μ g/ml enquanto que a concentração final no disco de papel de filtro estéril utilizado no teste de disco aproximação foi de 186 μ g. Provavelmente a concentração de 320 μ g/ml utilizada na fita de Etest M β L seja uma concentração limite entre uma maior sensibilidade na detecção de M β L versus a inibição do crescimento bacteriano ocasionada pelo EDTA.

Segundo Arakawa e colaboradores (2000), o antimicrobiano ceftazidima mostrou ser o substrato ideal para a detecção de amostras produtoras de M β L IMP-1, uma vez que, geralmente amostras produtoras dessas enzimas demonstram alto nível de resistência à ceftazidima (MIC, >64 μ g/mL). No entanto, este mesmo estudo mostrou que qualquer disco de β -lactâmico de amplo espectro pode ser utilizado neste teste (Arakawa *et al.*, 2000).

Apesar da existência do teste fenotípico para a detecção de amostras produtoras de M β L ainda não existe nenhuma padronização de um teste de “screening” para M β L pelo NCCLS.

A utilização de primers para a amplificação dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM}, pela técnica da reação em cadeia da polimerase, é bastante útil para a detecção dos genes responsáveis pela codificação das M β L conhecidas até o momento. Contudo, por ser uma técnica laboriosa e de alto custo, o seu emprego na rotina de um laboratório de microbiologia é mais difícil (Gibb *et al.*, 2002). Além disso, alguns alelos dos genes que codificam a produção dessas enzimas são suficientemente divergentes para serem detectados com a utilização de primers convencionais implicando na necessidade de repetição do teste com outros primers (Arakawa *et al.*, 2000).

As 85 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L foram resistentes aos carbapenens como era esperado já que os carbapenens são substratos para as M β L (Arakawa *et al.*, 2000).

Três amostras (3,1%) apresentaram produto de amplificação de PCR para o gene *bla*_{IMP-1}. As M β L do tipo IMP, foram primeiramente reportadas no Japão, em isolados de *P.*

aeruginosa e *S. marcescens* e recentemente têm sido reportadas em isolados europeus (Cornaglia *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 2000; Senda *et al.*, 1996a). Variantes da enzima IMP-1 (IMP-2 a IMP-12) têm sido caracterizadas e apresentam entre si homologia de 85,0% a 99,0%. O número de substituições de aminoácidos das enzimas IMP-2, IMP-4, IMP-3 e IMP-6 comparadas a enzima IMP-1 são respectivamente, 36, 10, 2 e 1 (Iyobe *et al.*, 2002). No Brasil, isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamases do tipo IMP-16 foram, recentemente, reportados em Brasília (Mendes *et al.*, 2004). A enzima tipo IMP-1 foi reportada em amostras de *P. fluorescens* e *Acinetobacter baumannii* em São Paulo (Sader *et al.*, 2005; Gales *et al.*, 2003). Microrganismos produtores de metalo- β -lactamase IMP-1, podem apresentar vários níveis de resistência a imipenem (MICs entre 4 e $>128\mu\text{g/mL}$) incluindo baixos níveis de resistência *in vitro* a carbapenems (Arakawa *et al.*, 2000; Toleman *et al.*, 2002; Yum *et al.*, 2002). Uma única substituição de aminoácidos pode resultar na alteração do perfil de substratos enzimáticos preferenciais. A substituição da serina na posição 196 (metalo- β -lactamase IMP-1) pela glicina (metalo- β -lactamases IMP-3 e IMP-6) resulta em um baixo nível de atividade por parte das penicilinas e uma hidrólise mais eficaz do meropenem que do imipenem (Iyobe *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2001).

As M β L do tipo VIM (VIM-1 a VIM-4) foram descritas primeiramente na Europa (Itália, França e Grécia), e mais recentemente na Coreia e Estados Unidos (Nordmann & Poirel, 2002; Toleman *et al.*, 2004). No presente estudo, nenhuma amostra apresentou produto de amplificação de PCR para os genes *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}. As M β L do tipo VIM hidrolisam cefalosporinas e o cassete do gene *bla*_{VIM-2} pode fazer parte de um integron da classe 1, o qual também carrega resistência aos aminoglicosídeos (Poirel *et al.*, 2001).

Oitenta e duas amostras (96,5%) apresentaram produto de amplificação de PCR para o gene *bla*_{SMP-1}. Este gene foi descrito recentemente em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada no complexo do Hospital São Paulo (Murphy *et al.*, 2003; Toleman *et al.*, 2002).

O Programa SENTRY tem detectado e caracterizado várias novas M β L em bacilos Gram negativos não fermentadores multirresistentes. Sader avaliou a frequência da produção de M β L em 1186 amostras de *P. aeruginosa* e 5 amostras moa

isoladas de centros médicos da América Latina. O centro que apresentou maior porcentagem (70%) de amostras com fenótipo positivo para produção de M β L foi o centro médico de São Paulo (Sader *et al.*, 2005). A frequência e diversidade de M β L detectadas em *P. aeruginosa* isoladas na América Latina incluem a primeira enzima descrita pelo programa SENTRY, SPM -1 (Toleman *et al.*, 2002) isoladas em amostras de *P. aeruginosa* coletadas de São Paulo e Brasília, e a enzima IMP-16 isolada em Brasília. Outra M β L detectada na América Latina incluí a enzima VIM-2, isolada em amostras de *P. aeruginosa* presentes em Caracas, Venezuela, e, em amostras de *P. fluorescens* em Santiago, Chile (Sader *et al.*, 2005). Além das enzimas VIM-8 e VIM-11 isolada em *P. aeruginosa* isoladas na Colômbia e na Argentina, respectivamente (Crespo *et al.*, 2004; Pasteran *et al.*, 2005).

Em concordância ao relatado por Sader, duas das quatro enzimas M β L reportadas foram encontradas no presente estudo. A frequência e diversidade de M β L detectadas em *P. aeruginosa* isoladas dos 26 centros médicos participantes inclui a primeira enzima SPM-1, codificada pelo gene *bla*_{SPM-1} (Murphy *et al.*, 2003; Toleman *et al.*, 2002). A enzima SPM-1 foi encontrada em 15 centros médicos participantes, estes centros estão localizados em nove estados e em onze cidades brasileiras: São Paulo (SP), Salvador (BA), Londrina (PR), Santo André (SP), Fortaleza (CE), Belo Horizonte (MG), São Luis (MA), Curitiba (PR), Rio de Janeiro (RJ), João Pessoa (PB), Brasília (DF). Outra enzima encontrada, no presente estudo em amostras de *P. aeruginosa* foi a enzima IMP-1, codificada pelo gene *bla*_{IMP-1}. A enzima IMP-1 foi encontrada em três amostras de *P. aeruginosa* isoladas de dois centros médicos, um localizado em Brasília (DF) e o outro em João Pessoa (PB). Este é o primeiro estudo brasileiro que reporta a disseminação de *P. aeruginosa* com a presença do gene *bla*_{SPM-1} presente em instituições distintas geograficamente e que estes isolados correspondem a uma grande proporção (39,8%) de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems. Outros estudos reportam a presença de alelos que codificam M β L, também disseminados por regiões geográficas distintas (Toleman *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004).

Além disso, foram reportados a disseminação de genes que codificam a produção de M β L para enterobactérias. O gene *bla*_{VIM-2} foi reportado em uma amostra de *Citrobacter*

freundii e o gene *bla*_{IMP-8} em uma amostra de *Enterobacter cloacae*, ambos isolados em uma hospital universitário em Taiwan (Yan *et al.*, 2002). O gene *bla*_{VIM-2} também foi reportado em uma amostra de *Serratia marcescens* isolada na Coréia (Yum *et al.*, 2002). O gene *bla*_{VIM-5} foi detectado em uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* isolada na Turquia (Midilli *et al.*, 2003). O gene *bla*_{VIM-1} foi identificado em uma amostra de *Escherichia coli* isolada na Grécia (Miriagou *et al.*, 2003). No Brasil, foram identificadas amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenens com a presença do gene *bla*_{IMP-1} isoladas do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e do Hospital Servidos Público Estadual (Lincopan *et al.*, 2005). Para os bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose, como *Acinetobacter* sp. e *P. aeruginosa*, e os bacilos *K. pneumoniae* e *E. coli*, que apresentam resistência aos carbapenens ainda tem como opção terapêutica o antimicrobiano polimixina, já para os bacilos *S. marcescens* e *C. freundii* resistentes aos carbapenens e que apresentam resistência intrínseca à polimixina existe então, uma possível falta de opção terapêutica para o tratamento. A disseminação de genes que codificam a produção de M β L tornou-se um problema grave, pois ainda não existem medidas de controles efetivas para mecanismos de resistência mediados por plasmídios e transposons.

A primeira suspeita da produção de M β L presentes em amostras brasileiras foi publicado por Pellegrino e colaboradores (2002) em amostras de *P. aeruginosa* coletadas no Rio de Janeiro. Entretanto, este relato foi confirmado alguns meses após com a descoberta da primeira M β L isolada e caracterizada em uma amostra brasileira de *P. aeruginosa*, a M β L SPM, isolada em São Paulo e, por isso, a denominação SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (Toleman *et al.*, 2002). A amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM foi isolada em uma amostra de sangue (hemocultura) de uma criança hospitalizada no Instituto de Oncologia Pediátrica.

A detecção de amostras produtoras de M β L no Brasil, disseminadas por regiões geográficas distintas, alerta para o aparecimento e disseminação deste mecanismo de resistência em nosso âmbito hospitalar (Gales *et al.*, 2003). A emergência de clones resistentes depende da quantidade e do tipo de antimicrobiano utilizado em uma área geográfica específica, do tipo de paciente que é assistido pelo serviço, do contexto social

em que os pacientes vivem e também da qualidade da infraestrutura hospitalar (Deshpande *et al.*, 2004). Desta forma, medidas para prevenir a disseminação das M β L nos hospitais incluem não somente medidas de isolamento e precauções universais, como também uma efetiva política de uso racional de antimicrobianos. As medidas de controle de infecção hospitalar podem ser implementadas efetivamente evitando assim a disseminação das cepas produtoras de M β L entre pacientes. Entretanto, a aquisição destes plasmídios por cepas de Gram-negativos colonizando o próprio paciente infectado ou colonizado por *P. aeruginosa* produtora de M β L estabelece um grande desafio ao médico assistente, como também a equipe do serviço de controle de infecção hospitalar, pois não se conhecem medidas efetivas no controle de bactérias resistentes a antimicrobianos que apresentam mecanismos de resistências, os quais são mediados por plasmídios. Foi sugerido para os mecanismos de resistência mediados por transposons, as medidas de precauções de contato devem ser empregadas com rigorosa adesão também aos germes produtores de M β L.

A determinação precisa da prevalência e diversidade das enzimas M β L entre amostras clínicas de microrganismos Gram-negativos clinicamente e os fatores de risco para a aquisição destes patógenos são importantes para o controle da disseminação deste mecanismo de resistência aos carbapenens. Outro importante aspecto a ser avaliado é o papel dos antimicrobianos β -lactâmicos na seleção de bactérias produtoras de M β L. Além disso, a origem dos genes que codificam a produção de enzimas capazes de hidrolisar carbapenens ainda é desconhecida. É muito provável que as enterobactérias não representem o reservatório natural dessas enzimas (Nordmann & Poirel, 2002). A determinação dos prováveis reservatórios, os quais podem ter origem ambiental, provavelmente contribuirá para a prevenção do aparecimento e da disseminação destes genes e de novos genes que codificam essas enzimas. A luta pelo controle da resistência é um problema mundial, e mais estudos que objetivem o conhecimento dos mecanismos de resistência e o entendimento de como as amostras resistentes disseminam-se, são necessários para que medidas efetivas de controle possam ser empregadas.

A clivagem com as enzimas de restrição, TaqI e Sau3AI, como não clivou na região que emite o sinal para codificação do peptídeo e, por isso, pode não ter detectado

alelos variantes do gene *bla*_{SPM-1}, já que somente duas amostras foram seqüenciadas, devido ao alto custo a reação de sequenciamento.

A análise de similaridade genética pela ribotipagem demonstrou uma grande variedade genômica entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, sendo observados 35 ribotipos entre as 82 amostras de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*_{SPM-1}. Apesar da grande diversidade genômica entre as amostras estudadas, há a predominância de clones tanto em amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1} (72-3, 87-2, 88-2, 103-1, 104-6 e 105-1) quanto em amostras não produtoras do gene *bla*_{SPM-1} (69-5). Porém a diversidade genética entre as amostras de *P. aeruginosa* não produtoras de MβL foi maior em relação às amostras de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*_{SPM-1}.

Entre as amostras com o mesmo genótipo, o ribotipo 72-3 foi encontrado em um número maior amostras e centros, foram 18 amostras isoladas de 7 centros diferentes. Este ribogruppo está disseminado entre cidades e estados diferentes, sendo assim, presente nos estados de São Paulo nas cidades de São Paulo e Santo André; no do Paraná nas cidades de Curitiba, Londrina; no estado da Bahia, Salvador; no Distrito Federal; e no estado do Ceará, Fortaleza.

O segundo ribotipo mais prevalente, 88-2, foi isolado em 17 amostras de *P. aeruginosa* encontrados em oito centros médicos, presentes em cinco estados brasileiros, como: São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraíba. O terceiro ribogruppo, 87-2, foi encontrado em 11 amostras de *P. aeruginosa* que estão presentes em seis centros médicos, localizados em cinco estados brasileiros, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Paraná e Maranhão. Estes resultados sugerem a disseminação clonal de *P. aeruginosa* que produzem MβL entre diferentes regiões geográficas, Kimura e colaboradores também observaram a disseminação de clones de *P. aeruginosa* produtoras de MβL, entre diferentes hospitais japoneses, localizados a uma distancia de 400 a 800 Km (Kimura *et al.*, 2005). A disseminação de clones de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenems também foi observada pelo programa MYSTIC (Gales *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004).

As amostras com os mesmos ribotipos apresentando ou não os genes que codificam a produção de metalo- β -lactamases reforça a idéia dos genes pesquisados estarem presentes no DNA extracromossômico bacteriano, em plasmídios, transposons e integrons, e que estes sejam os responsáveis pela disseminação desse mecanismo de resistência entre as diversas amostras bacterianas (Nordmann & Poirel, 2002).

Um estudo realizado por Hollis e colaboradores comparou a ribotipagem automatizada com o PFGE, do total de 411 isolados clínicos, 12 isolados foram amostras de *P. aeruginosa*. Observaram que o número de ribogrupos identificados pela técnica de ribotipagem automatizada foi igual ao número de padrões de PFGE encontrados nestas 12 amostras de *P. aeruginosa* (Hollis *et al.*, 1999). No presente estudo observou-se que as 56 amostras de *P. aeruginosa* apresentando 7 ribogrupos distintos apresentaram apenas 4 padrões de PFGE. Estes resultados mostram que a ribotipagem automatizada apresentou excelente desempenho para as amostras de *P. aeruginosa* em comparação ao PFGE.

Para que o controle da resistência bacteriana seja eficaz é necessário a atuação de vários setores, sendo assim, as medidas que envolvem o controle da disseminação horizontal (paciente-paciente) de bactérias resistentes seria o ponto principal e para complementar seria adequado a implementação de uma política de uso racional de antimicrobianos (Coignard *et al.*, 2000). Porém, para que essas medidas sejam implementadas de forma apropriada torna-se necessário o conhecimento dos mecanismos de resistência envolvidos e como estes responderão a pressão seletiva exercida por diferentes classes de antimicrobianos, ou mesmo por diferentes drogas de uma mesma classe. Como existe um grande número de variáveis envolvidas é importante que as medidas de controle sejam baseadas em estudos locais. Desta forma, os laboratórios precisam estar preparados para detectar os diferentes tipos de resistência. Para isso, é necessário que os testes diagnósticos sejam realizados de maneira adequada para detecção dos mecanismos de resistência mais frequentes no âmbito hospitalar. O conhecimento de como os diferentes tipos de resistência se disseminam é necessário para que as medidas de controle possam ser implementadas (Pfaller *et al.*, 2001).

6. CONCLUSÕES

1. Entre as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems foram observadas altas taxas de resistência a diferentes classes de antimicrobianos testados.

2. As polimixinas B e E foram os únicos antimicrobianos a inibir o crescimento de 100,0% das amostras de *P. aeruginosa*.

3. A produção de M β L foi demonstrada em 98 (47,6%) das 206 amostras. O gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em 82 amostras (83,7%) e o gene *bla*_{IPM-1} em 3 amostras (16,3%). A enzima VIM não foi detectada nas amostras avaliadas.

4. As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L do tipo SPM-1 foram encontradas em quinze centros médicos, localizados em nove estados brasileiros.

5. Os resultados de tipagem molecular mostram uma grande diversidade clonal entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenems. O ribogrupo mais prevalente, 72-3, foi encontrado em 18 amostras isoladas de 7 centros diferentes, localizados em cinco estados brasileiros.

6. A ribotipagem automatizada apresentou excelente desempenho para as amostras de *P. aeruginosa* em comparação ao PFGE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, J.R.; Kohler, T.; Nikaido, H.; Plesiat, P. - Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:2624-2628, 1999.

Arruda, E.A.; Marinho, I.S.; Boulos, M.; Sinto, S.I.; Caiaffa, H.H.; Mendes, C.M.; Oplustil, C.P.; Sader, H.; Levy, C.E.; Levin, A.S. - Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol.*;20(9):620-3,1999.

Ambler, R.P. - The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 289:321-331, 1980.

Andrade, S.S.; Jones, R.N.; Gales, A.C.; Sader, H.S. - Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in latin american medical centres: 5 year report of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother.*;52(1):140-1. Epub 29. No Abstract Available, 2003.

Anzai, Y.; Kim, H.; Park, J.Y.; Wakabayashi, H.; Oyaizu, H. - Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*;50 Pt 4:1563-89, 2000.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N.; Ohta, M. - A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:1612-1615, 1995.

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.*, 38:40-43, 2000.

Aubert, D.; Girlich, D.; Naas, T.; Nagarajan, S.; Nordmann, P. - Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum beta-lactamase bla_{VEB} gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrob Agents Chemother.*;48(9):3284-90, 2004.

Babini, G.S. & Livermore, D.M. - Effect of conalbumin on the activity of Syn 2190, a 1,5 dihydroxy-4-pyridon monobactam inhibitor of AmpC beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45:105-109, 2000.

Bagge, N.; Ciofu, O.; Hentzer, M.; Campbell, J.I.; Givskov, M.; Hoiby, N. - Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:3406-3411, 2002.

Barth, A.L.; Pitt, T.L.- Microbial Pathogens Associated With Cystic Fibrosis: Special Focus on *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Infect Dis.*;2(2):43-61, 1998.

Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Mangold, P.; Amann, S.; Akalin, E.; Ang O; Bal C; Casellas J. - Characterization of beta-lactamase gene bla_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.*;40(3):616-20, 1996.

Bellais, S.; Poirel, L.; Naas, T.; Girlich, D.; Nordmann, P. - Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A beta-lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium* (*Flavobacterium meningosepticum*). *Antimicrob Agents Chemother.*;44(1):1-9, 2000.

Bellido, F.; Veuthey, C.; Blaser, J.; Bauernfeind, A.; Pechere, J.C. - Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J. Antimicrob. Chemother.*, 125:57-68, 1999.

Bou, G. - Mart inverted question markinez-Beltr inverted question markan. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother; 44:428-432, 2000.

Burns, J.L.; Saiman, L.; Whittier, S.; Krzewinski, J.; Liu, Z.; Larone, D.; Marshall, S.A.; Jones, R.N. - Comparison of two commercial systems (Vitek and MicroScan-WalkAway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Diagn Microbiol Infect Dis., 39:257-260, 2001.

Bush, K. - Characterization of beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother., 33:259-263, 1989

Bush, K. - Metallo-beta-lactamases: a class apart. Clin. Infect. Dis., 27 (Suppl 1):S48-53, 1998.

Bush, K. - New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis., 32:1085-1089, 2001.

Bush, K.; Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. - A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother., 39:1211-1233, 1995.

Carmeli, Y.; Troillet, N.; Eliopoulos, G.M.; Samore, M.H. - Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob. Agents Chemother., 43:1379-1382, 1999.

Castanheira, M.; Toleman, M.A.; Jones, R.N.; Schmidt, F.J.; Walsh, T.R. - Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla_{gim-1}*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. ; 48(12):4654-6, 2004.

Castanheira, M.; Mendes, R.E.; Walsh, T.R.; Gales, A.C.; Jones, R.N. - Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.*;48(6):2344-5. No Abstract Available, 2004.

Chen, H.Y.; Yuan, M. & Livermore, D.M. - Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.*, 43:300-309, 1995.

Chu, G.; Vollrath, D.; Davis, R.W. - Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 19;234(4783):1582-5, 1986.

Chu, Y.W.; Afzal-Shah, M.; Houang, E.T.; Palepou, M.I.; Lyon, D.J.; Woodford, N.; Livermore, D.M. - IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:710-714, 2001.

Coignard, B.; Siegel, J.D.; Weinstein, R.A.; Sohn, A.H.; Sinkowitz-Cochran, R.L.; Jarvis, W.R. - Reality check: how should we control antimicrobial use? Current practices and controversies. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 21:792-795, 2000

Cornaglia, G.; Riccio, M.L.; Mazzariol, A.; Lauretti, L.; Fontana, R.; Rossolini, G.M. - Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. *Lancet*, 353:899-900, 1999.

Crespo, M.P.; Woodford, N.; Sinclair, A.; Kaufmann, M.E.; Turton, J.; Glover, J.; Velez, J.D.; Castaneda, C.R.; Recalde, M.; Livermore, D.M. - 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.* 42 (11), 5094-5101, 2004.

D'Agata, E.M.; Thayer, V.; Schaffner, W. - An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol.*;21(9):588-91, 2000.

Danel, F.; Hall, L.M.; Duke, B.; Gur, D.; Livermore, D.M. - OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;43:1362-6,1999.

Danes, C.; Navia, M.M.; Ruiz, J.; Marco, F.; Jurado, A.; Jimenez de Anta, M.T., Vila, J. - Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50:261-264, 2002.

Da Silva, G.J.; Leitão, G.J.; Peixe, L. - Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol.*;37(6):2109-10. No abstract available., 1999

Da Silva, G.J.; Correia, M.; Vital, C.; Ribeiro, G.; Sousa, J.C.; Leitão, R.; Peixe, L.; Duarte, A. - 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.*, 215:33-39, 2002.

Deshpande, L.M.; Fritsche, T.R.; Jones, R.N. - Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: a global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.*; 49(4):231-6, 2004.

Docquier, J.D.; Riccio, M.L.; Mugnaioli, C.; Luzzaro, F.; Endimiani, A.; Toniolo, A.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M. - IMP-12, a New Plasmid-Encoded Metallo-beta-Lactamase from a *Pseudomonas putida* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:1522-1528, 2003.

Duarte, A.; Boavida, F.; Grosso, F.; Correia, M.; Lito, L.M.; Cristino, J.M.; Salgado, M.J. - Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in

year of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). *J. Antimicrob. Chemother.*, 45:295-303, 2000.

Gales, A.C.; Jones, R.N.; 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.*, 32 Suppl 2:S146-155, 2001b.

Gales, A.C.; Reis, A.O.; Jones, R.N. - Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J. Clin. Microbiol.*, 39:183-190, 2001.

Gales, A.C.; Sader, H.S.; Bortolotto, V.; Hashimoto, A.; Pignatari, A.C. – Persistence of a ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain in an intensive care unit for five years. [abstract L-15] *In: Program and abstracts of the 98th American Society for Microbiology General Meeting, Atlanta, EUA, 1998.*

Gales, A.C.; Sader, H.S.; Dainesi, S.M.; Mímica, I. I.; Sampaio, J.; Zoccoli, C.; Oplustil, C.; Mendes, C. -Comparative in vitro Activity of Meropenem Versus Other Extended-Spectrum Antimicrobial Agents Against 2,085 Clinical Isolates Tested in 13 Brazilian Centers. *Braz. J. Infect. Dis.*, 1:294-305, 1997.

Gales, A.C.; Tognim, M.C.; Reis, A.O.; Jones, R.N.; Sader, H.S. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 45:77-79, 2003.

Gales, A.C.; Menezes, L.C.; Silbert, S.; Sader, H.S. - Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.*;52:699-702, 2003.

Giamarellou, H.& Antoniadou, A. - Antipseudomonal antibiotics. *Med. Clin. North. Am.*, 85:19-42, 2001.

Gibb, A.P.; Tribuddharat, C.; Moore, R.A.; Louie, T.J.; Krulicki, W.; Livermore, D.M.; Palepou, M.F.; Woodford, N. - Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:255-258, 2002.

Gillardi, G.L. – Medical Microbiology. In: Sabath. L.D. (ed) – *Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes, and their treatment*. Vienna, Hans Huber Publishers, p. 25-30, 1980.

Gillardi, G.L. – *Pseudomonas* and related genera. In: Ballows, A. (ed) – *The Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington DC, American Society for Microbiology ,. p.429-441, 1991.

Godfrey, A.J.; Bryan, L.E. & Rabin, H.R. -Beta-Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19:705-711, 1981.

Goto, M.; Takahashi, T.; Yamashita, F.; Koreeda, A.; Mori, H.; Ohta, M.; Arakawa, Y. - Inhibition of the metallo-beta-lactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds. *Biol. Pharm. Bull.*, 20:1136-1140, 1997.

Gotoh, N.; Nunomura, K. & Nishino, T. - Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *J. Antimicrob. Chemother.*,25:513-523, 1990.

Gotoh, N.; Tsujimoto, H.; Tsuda, M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, Nakahashi M, Nishino T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in

DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 42:1938-1943, 1998.

Gould, I.M.; Wise, R. - *Pseudomonas aeruginosa*: clinical manifestation and management. *Lancet*; 2:1224-27,1985.

Greenlee, M.L.; Laub, J.B.; Balkovec, J.M.; Hammond, M.L.; Hammond, G.G.; Pompliano, D.L.; Epstein-Toney, J.H. - Synthesis and SAR of thioester and thiol inhibitors of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9:2549-2554, 1999.

Groisman, E.A.; Kayser, J.; Soncini, F.C. - Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J. Bacteriol.*, 79:7040-7045, 1997.

Hammond, G.G.; Huber, J.L.; Greenlee, M.L.; Laub, J.B.; Young, K.; Silver, L.L.; Balkovec, J.M.; Pryor, K.D.; Wu, J.K.; Leiting, B.; Pompliano, D.L.; Toney, J.H. - Inhibition of IMP-1 metallo-beta-lactamase and sensitization of IMP-1-producing bacteria by thioester derivatives(dagger). *FEMS Microbiol. Lett.*,179:289-296, 1999.

Hancock, R.E.& Bellido, F. - Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.*, 29 (Suppl A):1-6, 1992.

Haruta, S.; Yamaguchi, H.; Yamamoto, E.T.; Eriguchi, Y.; Nukaga, M.; O'Hara, K.; Sawai, T. - Functional analysis of the active site of a metallo-beta-lactamase proliferating in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2304-2309, 2000.

Helfand, M.S.; Bonomo, R.A. - Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord.*;3(1):9-23. Review,2003.

Hellinger, W.C.; Brewer, N.S. - Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc.*;74(4):420-34. Review, 1999.

Heritier, C.; Poirel, L.; Aubert, D.; Nordmann, P. - Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:268-273, 2003.

Hirakata, Y.; Izumikawa, K.; Yamaguchi, T.; Takemura, H.; Tanaka, H.; Yoshida, R.; Matsuda, J.; Nakano, M.; Tomono, K.; Maesaki, S.; Kaku, M.; Yamada, Y.;

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- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*; 37:26-32, 2003.

Hollis, R.J.; Bruce, J.L.; Fritschel, S.J.; Pfaller, M.A. - Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 34:263-268; 1999.

Hooper, D.C. - Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 31 (Suppl 2):S24-28, 2000.

Hooper, D.C. - Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 7:337-341; 2001.

Ito, H.; Arakawa, Y.; Ohsuka, S.; Wacharotayankun, R.; Kato, N.; Ohta, M. - Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:824-829, 1995.

Iyobe, S.; Kusadokoro, H.; Takahashi, A.; Yomoda, S.; Okubo, T.; Nakamura, A.; O'Hara, K. - Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*,46:2014-2016, 2002.

Jones, R.N.; Deshpande, L.M.; Bell, J.M.; Turnidge, J.D.; Kohno, S.; Hirakata, Y.; Ono, Y.; Miyazawa, Y.; Kawakama, S.; Inoue, M.; Hirata, Y.; Toleman, M.A. - 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.*; 49(4):289-94, 2004.

Jones, R.N.; Deshpande, L.; Fritsche, T.R.; Sader, H.S. - Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. And *Pseudomonas aeruginosa* In The MYSTIC Programme (Usa, 1999-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.*; 49(3):211-6,2004.

Kamihira, S.; Kohno, S. - Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob. Agents Chemother.*,42:2006-2011, 1998.

Kerstens, I.; Huys, G.; Van, D.H.; Vancanneyt, M.; Kersters, K.; Verstraete, W. - Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *J Appl Bacteriol.*;80(3):266-76,1996.

Kimura, S.; Alba, J.; Shiroto, K.; Sano, R.; Niki, Y.; Maesaki, S.; Akizawa, K.; Kaku, M.; Watanuki, Y.; Ishii, Y.; Yamaguchi, K. - Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol.*, 43(1):458-61, 2005.

Köhler, T.; Michea-Hamzehpour, M.; Epp, S.F.; Pechere, J.C. - Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:424-427, 1999.

Lahey Hitcock Clinic (on line). EUA, Abril 2003. Disponibilidade e acesso: Internet <http://www.lahey.hitchcock.org/pages/lhc/studies/web.ht>

Langae, T.Y.; Gagnon, L.; Huletsky, A. - Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:583-589, 2000.

Laraki, N.; Franceschini, N.; Rossolini, G.M.; Santucci, P.; Meunier, C.; de Pauw, E.; Amicosante, G.; Frere, J.M.; Galleni, M. - Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:902-906, 1999.

Lauretti, L.; Riccio, M.L.; Mazzariol, A., Cornaglia, G.; Amicosante, G.; Fontana, R.; Rossolini, G.M. - Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:1584-1590, 1999.

Lee, K; Lim, J.B.; Yum, J.H.; Yong, D.; Chong, Y.; Kim, J.M.; Livermore, D.M. - *ba*_(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:1053-1058, 2002.

Lee, K.; Lim, Y.S.; Yong, D.; Yum, J.H.; Chong, Y. - Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*; 41:4623-4629, 2003.

Lee, K.; Chong, Y.; Shin, H.B.; Kim, Y.A.; Yong, D.; Yum, J.H. - Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect; 7:88-91, 2001.

Lee, S.C.; Fung, C.P.; Liu, P.Y.; Wang, T.C.; See, L.C.; Lee, N.; Chen, S.C.; Shieh, W.B. - Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: riskfactors and outcome. Infect .Control Hosp. Epidemiol. 20:205-207, 1999.

Le Thomas, I.; Couetdic, G.; Clermont, O.; Brahimi, N.; Plesiat, P.; Bingen, E. - In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. J Antimicrob Chemother.;48(4):553-5, 2001.

Levin, A.S.; Barone, A.A.; Penco, J.; Santos, M.V.; Marinho, I.S.; Arruda, E.A.; Manrique, E.I.; Costa, S.F. - Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin. Infect. Dis., 28:1008-1111, 1999.

Li, J.; Nation, R.I.; Milne, R.W; Turnidge, J.D.; Coulthard, K. - Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents.;25(1):11-25, 2005.

Livesley, M.A.; Tebbs, S.E.; Moss, H.A.; Faroqui, M.H.; Lambert, P.A.; Elliott, T.S. - Use of pulsed field gel electrophoresis to determine the source of microbial contamination of central venous catheters. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.;17(2):108-12, 1998.

Li, X.Z.; Livermore, D.M.& Nikaido, H. - Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob. Agents Chemother., 38:1732-1741, 1994.

Li, X.Z.; Nikaido, H.& Poole, K. - Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother.,39:1948-1953, 1995.

Li, X.Z.; Poole, K. & Nikaido, H. -Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:27-33, 2003.

Lincopan, N.; McCulloch, J.A.; Reinert, C.; Cassettari, V.C.; Gales, A.C.; Mamizuka, E.M. - First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol.*; 43(1):516-9, 2005.

Linden, P.K., Kusne, S., Coley, K., Fontes, P., Kramer, D.J., Paterson, D. - Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*;37:154-60, 2003.

Livermore, D.M. - Cellular location of β -lactamases in relation to antibiotic resistance. In: Symposium: New horizons in β -lactamases. 6th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Sevilha,. p.21; 1993.

Livermore, D.M. - Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8:557-584, 1995.

Livermore, D.M. - Acquired carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 39:673-676, 1997.

Livermore, D.M. - Are all beta-lactams created equal? *Scand. J. Infect. Dis.*;101:33-43, 1996.

Livermore, D.M. – Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 78:7-16, 1991.

Livermore, D.M. - Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin. Infect. Dis., 34:634-640, 2002.

Livermore, D.M.; Winstanley, T.G.; Shannon, K.P. - Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy;48(S1):87-102, 2001.

Livermore, D.M. - Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J. Antimicrob. Chemother., 47:247-250, 2001.

Livermore, D.M. & Woodford, N. - Carbapenemases: a problem in waiting? Curr. Opin. Microbiol., 3:489-495, 2000.

Lodge, J.M. & Piddock, L.J. -The control of class I beta-lactamase expression in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother., 28:167-172, 1991.

Marumo, K.; Takeda, A.; Nakamura, Y.; Nakaya, K. - Purification and characterization of metallo-beta-lactamase from *Serratia marcescens*. Microbiol. Immunol., 39:27-33, 1995.

Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimoto, H.; Nishino, T. - Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother., 44:3322-3327,2000.

Mazzariol, A.; Mammina, C.; Nastasi, A. and Cornaglia, G. - New VIM-type metallo-beta-lactamase isolated in Italy, in press.

Medeiros, A.A. - Beta-lactamases. Br Med Bull; 40:18-27, 1984.

Medeiros, A.A. - Beta-Lactamases: quality and resistance. Clin Microbiol Infect.;3 Suppl 4:S2-S9, 1997.

Mendes, R.E.; Toleman, M.A.; Ribeiro, J.; Sader, H.S.; Jones, R.N.; Walsh, T. R. - Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-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.; 48(12):4693-702, 2004.

Mendes, R.E.; Castanheira, M.; Garcia, P.; Guzman, M.; Toleman, M.A.; Walsh, T.R.; Jones, R.N.; Sentry Antimicrobial Surveillance Program. - First isolation of *bla*_(VIM-2) in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother.;48(4):1433-4, No Abstract Available, 2004.

Miriagou, V.; Tzelepi, E.; Gianneli, D.; Tzouvelekis, L.S. - *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. Antimicrob Agents Chemother.;47(1):395-7, 2003.

Mollard, C.; Moali, C.; Papamicael, C.; Damblon, C.; Vessilier, S.; Amicosante, G.; Schofield, C.J.; Galleni, M.; Frere, J.M.; Roberts, G.C. - Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc beta-lactamases: kinetic and spectroscopic studies. J. Biol. Chem., 276:45015-45023, 2001.

Moolenaar, R.L.; Crutcher, J.M.; San Joaquin, V.H.; Sewell, L.V.; Hutwagner, L.C.; Carson, L.A. - A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? Infect Control Hosp Epidemiol; 21:80-5, 2000.

Morrison, A.J. Jr.; Wenzel, R.P. - Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis.;6 Suppl 3:S627-42. Review, 1984.

Murphy, T.A.; Simm, A.M.; Toleman, M.A.; Jones, R.N.; Walsh, T.R.- Biochemical Characterization of the Acquired Metallo-beta-Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:582-587, 2003.

Nakajima, A.; Sugimoto, Y.; Yoneyama, H.; Nakae, T. - High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol.*, 46:391-395, 2002.

Naas T; Poirel L; Karim A; Nordmann P.- Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 15;176(2):411-9, 1999.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eight informational supplement M100-S13. Wayne, PA, 2003a

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Approved standard M2-A8: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Eighth edition. Wayne, PA, 2003b

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eight informational supplement M100-S14. Wayne, PA, 2004.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Approved standard M7-A6: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Sixth edition. Wayne, PA, 2004

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report: data summary from October 1986-April 1998, issued May, 1996. *Am. J. Infect. Control.*, 24:380-388, 1996.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J Infect Control*;30:458-75, 2002.

Neu, H.C. The role of *Pseudomonas aeruginosa* in infections. *J Antimicrob Chemother*;11:1-13, 1983.

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

Nordmann, P. & Poirel, L. - Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.*, 8:321-331, 2002.

Nordmann, P.; Poirel, L. - Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002 Jun;3(2):117-27. Review.

O'Hara, K.; Haruta, S.; Sawai, T.; Tsunoda, M.; Iyobe, S. - Novel metallo beta-lactamase mediated by a *Shigella flexneri* plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.*, 162:201-206, 1998.

Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F.; Kato, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 38:71-78, 1994.

Pagani, L.; Mantengoli, E.; Migliavacca, R.; Nucleo, E.; Pollini, S; Spalla, M.; Daturi, R.; Romero, E.; Rossolini, G.M. - Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.*;42(6):2523-9, 2004.

Pagani, L.; Migliavacca, R.; Pallecchi, L.; Matti, C.; Giacobone, E.; Amicosante, G.; Romero, E.; Rossolini, G.M. - Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol.;40(4):1549-52, 2002.

Palleroni, N.J. - Family I *Pseudomonadaceae*. In: Krieg, N.R.; Holt, J.T. (eds) – Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 141-219, 1984.

Pasteran, F.; Faccone, D.; Petroni, A.; Rapoport, M.; Galas, M.; Vazquez, M.; Procopio, A. - Novel variant *bla*_(VIM-11) of the metallo-beta-lactamase *bla*_(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. Antimicrob Agents Chemother.;49(1):474-5. No abstract available, 2005.

Pellegrino, F.L.; Teixeira, L.M.; Carvalho, Md. Mda. G.; Aranha Nouer, S.; Pinto De Oliveira, M.; Mello Sampaio, J.L.; D'Avila Freitas, A.; Ferreira, A.L.; Amorim, Ed. Ede. L.; Riley, L.W.; Moreira, B.M. - Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J. Clin. Microbiol., 40:2420-2424, 2002.

Pereira, M.; Perilli, M.; Mantengoli E.; Luzzaro, F.; Toniolo, A.; Rossolini, G.M.; Amicosante, G. - PER-1 extended-spectrum beta-lactamase production in an *Alcaligenes faecalis* clinical isolate resistant to expanded-spectrum cephalosporins and monobactams from a hospital in Northern Italy. Microb Drug Resist. Spring;6(1):85-90, 2000.

Pittet, D. - Nosocomial bloodstream infections. In: WENZEL, R.P. – Prevention and control of nosocomial infections. 2^a ed. Maryland, Williams & Wilkins;cap.23, p.512-55, 1993.

Pfaller, M.A.; Acar, J.; Jones, R.N.; Verhoef, J.; Turnidge, J.; Sader, H.S. -. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. Clin Infect. Dis., 32(Suppl 2):S104-113, 2001.

Pfaller, M.A. - Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis.*;7(2):312-8. Review, 2001.

Poirel, L.; Le Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; Nordmann, P. - Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*;44(3):622-32, 2000.

Poirel, L.; Weldhagen, G.F.; De Champs, C.; Nordmann, P. - GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.*;45(9):2598-603, 2001.

Poirel, L.; Naas, T.; Guibert, M.; Chaibi, E.B.; Labia, R.; Nordmann, P.- Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by a *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.*;43(3):573-81, 1999.

Poirel, L. & Nordmann, P. - Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3:117-127, 2002

Poirel, L.; Naas, T.; Nicolas, D.; Collet, L.; Bellais, S.; Cavallo, J.D.; Nordmann, P. - Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:891-897, 2000.

Poirel, L.; Rotimi, V.O.; Mokaddas, E.M., Karim, A.; Nordmann, P. - VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.*, 7:468-470, 2001.

Poirel, L.; Naas, T.; Nicolas, D.; Collet, L.; Bellais, S.; Cavallo, J.D. - Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*; 44:891-897, 2000.

Poirel, L.; 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*. 49(1):202-8, 2005.

Pollack, M. – *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (eds)- *Principles and Practices of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone, p. 2310-2335, 2000.

Poole, K.; Gotoh, N.; Tsujimoto, H.; Zhao, Q.; Wada, A.; Yamasaki, T.; Neshat, S.; Yamagishi, J.; Li, X.Z.; Nishino, T. - Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*;21:713-724, 1996.

Poole, K. - Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.*;10(1):12-26. Review, 2004.

Poole, K.; Srikumar, R. - Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem.*;1(1):59-71. Review, 2001.

Poole, K. - Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.*;4(5):500-8, 2001.

Pournaras, S.; Tsakris, A.; Maniati, M.; Tzouveleakis, L.S.; Maniatis, A.N. - Novel Variant (bla(VIM-4)) of the Metallo-beta-Lactamase Gene bla(VIM-1) in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:4026-4028, 2002.

Quinn, J.P.; Dudek, E.J.; DiVincenzo, C.A.; Lucks, D.A.; Lerner, S.A. - Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.*, 154:289-294, 1986.

Ramphal, R.; Hoban, D.J.; Pfaller, M.A.; Jones, R.N. - Comparison of the activity of two broad-spectrum cephalosporins tested against 2,299 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at 38 North American medical centers participating in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1998. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 36:125-129, 2000.

Rasmussen, B.A. & Bush K. - Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:223-232, 1997

Rasmussen, B.A.; Bush, K.; Keeney, D.; Yang, Y.; Hare, R.; O'Gara, C.; Medeiros, A.A. - Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:2080-2086, 1996.

Rello, J.; Jubert, P. - Evaluation of outcome for intubated patients with pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*;23:973-78, 1996.

Riccio, M.L.; Franceschini, N.; Boschi, L.; Caravelli, B.; Cornaglia, G.; Fontana, R.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M. - Characterization of the metallo-beta-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.*,44:1229-1235, 2000.

Riccio, M.L.; Pallecchi, L.; Docquier, J.D.; Cresti, S.; Catania, M.R.; Pagani, L.; Lagatolla, C.; Cornaglia, G.; Fontana, R.; Rossolini, G.M. - Clonal relatedness and conserved

integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo- β -lactamase from different Italian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.*;49(1):104-10, 2005.

Richmond, R.H & Sykes, R.B. – The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 9:31-38, 1973.

Sabath, L.D.; Abraham, E.P. - Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J*; 98:11C-13C, 1966.

Sader, H.S.; Hollis, R.J.; Pfaller, M.A. -The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med*; 15:407-431, 1995.

Sader, H.S.; Sampaio, J.L.; Zoccoli, C.; Jones, R.N. - Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Three Brazilian Medical Centers. *Braz. J. Infect. Dis.*, 3:63-79, 1999.

Sader, H.S.;Pignatari, A.C.; Leme, I.L.; Burattini, M.N.; Tancredi, R.; Hollis, R.J.; Jones, R.N. - Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 17:13-18, 1993.

Sader, H.S.; Ferreira, A.T.; Tosin, I.; Gales, A.C.; Keim, L.S.; Carbadillo, J.M. et al. Piperacillin/Tazobactam: Evaluation of Its In vitro Activity against Bacteria Isolated in Two Brazilian Hospitals and an Overview of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential. *Braz J Infect Dis*; 2:241-255, 1998.

Sader, H.S; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. - Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from

three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz. J. Infect. Dis.*, 5:200-214, 2001.

Sader, H.S.; Castanheira, M.; Mendes, R.E.; Toleman, M.; Walsh, T.; Jones, R.N. - Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents.*; 25(1):57-61, 2005.

Sader, H.S.; Reis, A.O.; Silbert, S.; Gales, A.C. - IMPs, VIMs and SPMs: The diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect.*;11(1):73-6, 2005.

Saino, Y.; Kobayashi, F.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. - Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.*;22(4):564-70, 1982.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N.; Ohta, M. - PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla*IMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J. Clin. Microbiol.*, 34:2909-2913, 1996a.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ichiyama, S.; Shimokata, K.; Kato N.; Ohta, M. - Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:349-53, 1996b.

Shah, M. A.; Woodford, N.; Livermore, D.M.- Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacte rbaumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.*;45(2):583-8, 2001.

Shannon, K.P.; King, A.; Phillips, I; Nicolas, M.H.; Philippon, A. - Importation of organisms producing broad-spectrum SHV-group β -lactamases into the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemoter.*, 25:343-351; 1990.

Shannon, K.; King, A.; Phillips, I. - Beta-lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *J Antimicrob Chemother.*;17(1):45-50, 1986.

Shiba, T.; Ishiguro, K.; Takemoto, N.; Koibuchi, H.; Sugimoto, K. - Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the nfxB gene. *J. Bacteriol.*, 177:5872-5877, 1995.

Shibata, N.; Arakawa, Y - A new IMP-20 variant metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Japan, in press.

Speijer, H.; Savelkoul, P.H.; Bonten, M.J.; Stobberingh, E.E.; Tjhe, J.H. - Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemi city in an intensive care unit. *J Clin Microbiol.*;37(11):3654-61, 1999.

Spratt, B.G. & Cromie, K.D. - Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.*, 10:699-711, 1988.

Srikumar, R.; Paul, C.J.; Poole, K. - Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182:1410-1414, 2000.

Srikumar, R.; Tsang, E.; Poole, K. - Contribution of the MexAB-OprM multidrug efflux system to the beta-lactam resistance of penicillin-binding protein and beta-lactamase-derepressed mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.*;44(4):537-40, 1999.

Struelens, M.J.; Carlier, E.; Maes, N.; Serruys, E.; Quint, W.G.; Van Belkum, A. - Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. J Hosp Infect.;25(1):15-32, 1993.

Stull, T.L.; LiPuma, J.J.; Edlind, T.D. – A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis.;157(2):280-6, 1988.

Tenover, F.C. - Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. Clin Infect Dis. 15;33 Suppl 3:S108-15. Review, 2001.

Toleman, M.A.; Rolston, K.; Jones, R.N.; Walsh TR. - *bla*VIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.*;48(1):329-32, 2004.

Troillet ,N.; Samore, M.H. & Carmeli Y. - Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis.*, 25:1094-1098, 1997.

Vahaboglu, H.; Ozturk, R.; Aygun, G.; Coskuncan, F.; Yaman, A.; Kaygusuz, A. - Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.*; 41:2265-2269, 1997.

Vila, J. & Marco F. - Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilliantibiogram. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*,20:304-310, 2002.

Walsh, T.R.; Bolmstrom, A.; Qwarnstrom, A.; Gales, A. -Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol.*, 40:2755-2759, 2002.

Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. - Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35:147-151, 1991.

Widmer, A.F.; Wenzel R.P.; Trilla, A.; Bale, J.M.; Jones, R.N.; Doebbeling, B.N. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker. *Clin Infect Dis*; 16:372:6, 1993.

Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J.M.; Legakis, N. - Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization

of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis., 15;32 Suppl 2:S94-103, 2001

Wise, R.; Andrews, J.M.; Cross, C.; Piddock, L.J. - The antimicrobial activity of cefpirome, a new cephalosporin. J Antimicrob Chemother.;15(4):449-56, 1985.

Woodford, N.; Salso,S.; Tysall,L.; Coelho,J.; Kretchikov,V.; Sinclair,A.; Kaufmann,M.; Schuster,H.; Duckworth,G. and Livermore,D.- Emergence of *Pseudomonas* sp. with VIM-type carbapenemases in the United Kingdom, in press.

Yan, J.J.; Hsueh, P.R.; Ko, W.C.; Luh, K.T.; Tsai, S.H.; Wu, H.M.; Wu, J.J. - 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., 45:2224-2228, 2001.

Yan, J.J.; Ko, W.C. & Wu, J.J. - 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.,45:2368-2371, 2001.

Yan, J.J.; Ko, W.C.; Chuang, C.L.; Wu, J.J. - Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. J Antimicrob Chemother.;50(4):503-11, 2002.

Yang, Y.J.; Wu, P.J.; Livermore, D.M. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob Agents Chemother., 34:755-758, 1990.

Yang, Y.; Rasmussen, B.A. & Bush, K. - Biochemical characterization of the metallo-beta-lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis* TAL3636. Antimicrob. Agents Chemother., 36:1155-1157, 1992.

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.*, 45:1343-1348, 2001.

Yoneyama, H.; Yamano, Y.; Nakae T. - Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 4;213(1):88-95, 1995.

Yum, J.H.; Yi, K.; Lee, H.; Yong, D.; Lee, K.; Kim, J.M.; Rossolini, G.M.; Chong, Y. - Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla(VIM-2) gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49:837-840, 2002.

Yum, J.H.; Yong, D.; Lee, K.; Kim, H.S.; Chong, Y. - A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;42(3):217-9, 2002.

ABSTRACT

Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* are often difficult to treat because of its virulence and antimicrobial resistance. Carbapenems are usually active against multi-resistant *P. aeruginosa*, but resistance to these compounds has been increasing rapidly. High-level resistance to carbapenems is still uncommon in *P. aeruginosa* and is usually indicative of metallo- β -lactamases (M β L). The purpose of the study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profiles of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolated from Brazilian Hospitals, to detect the presence of genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} and to evaluate the genetic similarity of *P. aeruginosa* resistant to carbapenems. Were evaluated 206 *P. aeruginosa* resistant to carbapenems collected during 2001 – 2003 from 25 medical centers. Antimicrobial susceptibilities testing to selected agents were determined by disk diffusion to 206 strains. The susceptibility testing was using the reference “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS). Carbapenem-resistant isolates were screened for M β L production by disk approximation test using 2 enzyme inhibitors (EDTA and 2-mercaptopyruvic acid). The procedure was confirmed by Etest[®] (Etest[®] MBL strip) and also by PCR assays using the following primers *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}. The genetic similarity was performed in M β L producers strains and one negative-M β L strains for medical centers by automated ribotyping and PFGE. High resistance rates to majority of the antimicrobial agents were demonstrated. The polymyxins were the most active antimicrobial agents evaluated with 100,0% of susceptibility rate to all strains. The M β L production was detected in 98 (47,6%) of 206 strains. The *bla*_{SPM-1} gene was detected in 82 strains (83,7%) and *bla*_{IMP-1} gene in 3 strains (16,3%). Thirteen isolates did not show PCR amplification for none of the primers used. The analysis of genetic similarity showed a clonal diversity among the 98 carbapenem-resistant strains (46 ribogroups). **CONCLUSION:** This study indicates high prevalence of M β L producing in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and clonal dissemination of this microorganism to a wide geographic area of Brazil.

ANEXOS

FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS: