

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**IDENTIFICAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES EM
BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO
FERMENTADORES ISOLADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Claudia de Mello Bertoncheli

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**IDENTIFICAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES EM
BACIOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES
ISOLADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA
MARIA**

por

Claudia de Mello Bertoncheli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IDENTIFICAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES EM BACILOS
GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES ISOLADOS NO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

elaborada por
Claudia de Mello Bertoncheli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rosmari Hörner, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Agueda Palmira Castagna de Vargas, Dr^a. (UFSM)

Sandra Trevisan Beck, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 18 de Janeiro de 2008.

Dedico este trabalho aos meus pais, Dario e Ilza!
Obrigada por todo o amor, carinho, dedicação,
renúncia, sacrifício e por sempre acreditarem em mim,
mesmo quando eu não acreditava.
Amo muito vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de lutar pelos meus objetivos a cada dia concedido;

Em especial, aos meus pais, Dario e Ilza, pelo apoio, incentivo, dedicação, pela presença constante na minha formação acadêmica e que me ensinaram valores de lealdade, humildade, respeito e valorização do estudo, o único bem precioso que não se vende, se compra ou se empresta. Obrigada por esta conquista e de todas as outras, profissionais e pessoais.

À minha irmã Danise e ao meu cunhado Marcelo, pelo apoio e companheirismo nas horas difíceis e de descontração, e pelo meu maior presente: o meu sobrinho amado Angelo Elessar, que com um simples sorriso me mostra a alegria de viver e me dá forças para continuar lutando pelos meus objetivos. Elessar! A tia te ama muito.

Ao meu amor, Rafael, pelo incentivo, companheirismo, amor, paciência e compreensão em todos os momentos de ausência e renúncia para que este trabalho pudesse ser realizado. Mor! Te amo muito!

Aos meus sogros, João Pinto e Maria Sirlei, pelas palavras de apoio e incentivo, que não me fizeram desistir desta etapa de minha vida.

À minha orientadora Rosmari Hörner, pela oportunidade, carinho, amizade, compreensão e pelos ensinamentos passados a mim ao longo desses anos de convivência. Muito obrigada!!!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Mariane, Vanessa, Fabiane, Fernanda, Luiz e Gustavo pelos momentos de descontração e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LAC, em especial ao chefe do LAC, Eleúh, por todo o aprendizado e confiança depositada em mim que me fizeram crescer como profissional.

As bioquímicas e técnicas do setor de microbiologia do LAC que me ensinaram o verdadeiro amor pela microbiologia com paciência e entusiasmo, e que mesmo com a correria do dia a dia separaram as cepas para a realização deste trabalho.

Aos farmacêuticos, técnicos, professores e estagiários do DFI pelos ensinamentos a mim passados durante o curso de Farmácia Industrial e pelo material emprestado para a realização de uma parte deste trabalho.

A UFSM por ter possibilitado a realização dos meus cursos de graduação e a pós graduação, com um ensino público e gratuito de qualidade. A Capes, pela bolsa de estudos concedida, possibilitando a dedicação exclusiva a este trabalho;

Aos amigos e pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

*Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,
é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra!*

*Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha
e não nos deixa só porque deixa um pouco de si
e leva um pouco de nós.*

*Essa é a mais bela responsabilidade da vida
E a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES ISOLADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

AUTORA: CLAUDIA DE MELLO BERTONCHELI

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a ROSMARI HÖRNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de janeiro de 2008.

Nos últimos anos, o isolamento de bactérias produtoras de β -lactamases tem causado preocupação em todo o mundo, devido ao fato dessas enzimas hidrolisarem o anel β -lactâmico dos principais antimicrobianos utilizados na clínica. Este trabalho teve por objetivo avaliar a prevalência de metalo- β -lactamases (M β L) em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). O perfil de sensibilidade para todos os isolados foi avaliado pelo método de disco difusão padronizado pelo CLSI. Os discos de antimicrobianos utilizados foram distribuídos de forma que permitisse a identificação dos isolados produtores de AmpC e ESBL. Para a identificação dos produtores de M β L utilizou-se o teste de disco aproximação com os seguintes agentes quelantes: EDTA 0,1M, EDTA 0,5 M e ácido 2-mercaptopropiônico. Os isolados que não possuíam nenhum dos mecanismos de resistência pesquisados foram classificados como multirresistentes (MDR). A concentração inibitória mínima (CIM) para ceftazidima, imipenem e polimixina B foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo para todos os isolados, de acordo com o CLSI. Durante o período de janeiro a junho de 2006 foram obtidos 32 isolados de *P.aeruginosa* e 41 de *A. baumannii*, destes 17 (23,29%) foram produtores de β -lactamase do tipo AmpC, 11 (15,07%) foram produtores de M β L e 45 (61,64%) foram classificados como MDR. Todas as cepas produtoras de M β L foram de *Pseudomonas aeruginosa*. A sensibilidade dos isolados de acordo com a CIM para os antimicrobianos avaliados foram as seguintes: 90,28% para polimixina B, 36,11% imipenem e 18% ceftazidima. Observou-se uma alta prevalência de isolados MDR no HUSM, além de isolados produtores de β -lactamase do tipo AmpC e M β L, o que é extremamente preocupante devido limitar a terapia a poucos antimicrobianos. Esta situação torna-se ainda mais preocupante com a detecção de isolados resistentes a polimixina B, a qual é uma das últimas opções de tratamento para infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* MDR e produtores de M β L. A detecção desses microrganismos é de grande importância para as comissões de controle de infecção hospitalar com o objetivo de prevenir surtos, bem como orientar a equipe médica sobre a conduta terapêutica, uma vez que há poucos antimicrobianos efetivos clinicamente para esses patógenos e as perspectivas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos em um futuro próximo são mínimas.

Palavras-chaves: β -lactamases, metalo- β -lactamase, AmpC, multirresistência

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Course on Ciências pharmaceutical
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

IDENTIFICATION OF METALLO- β -LACTAMASES IN NONFERMENTATIVE GRAM NEGATIVES BACILLI ISOLATED IN UNIVERSITY HOSPITAL OF SANTA MARIA

AUTHORA: CLAUDIA DE MELLO BERTONCHELI

ADVISER: Prof^a Dr^a ROSMARI HÖRNER

Date and place of the defense: Santa Maria, January 18, 2008.

In recent years, the isolation of bacteria producing β -lactamases has caused concern around the world, due to the fact these enzymes hydrolysis the ring β -lactam antimicrobials used in the main clinic. This aim of this study was asses the prevalence metallo- β -lactamases (M β L) in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* obtained from patients admitted at the University Hospital of Santa Maria (HUSM). The profile of susceptibility for all isolates was evaluated by the disk diffusion method standardized by CLSI. The antimicrobial disks were distributed in a way that allows the identification of strains producers of AmpC and ESBL. For the identification of the producers of M β L the test of disk approximation with EDTA 0.1 M, EDTA 0,5M and acid 2-mercaptopropionic were performed. Isolates that did not have any of the mechanisms of resistance search were classified as multiresistant (MDR). The minimum inhibitory concentration (MIC) for ceftazidima, imipenem and polymyxin B was assessed by broth method microdilution for all isolated, according to CLSI. From January to June 2006, were obtained 32 isolates the *P.aeruginosa* and 41 the *A. baumannii*, the those 17 (23.29%) were β -lactamase AmpC-type producers, 11 (15.07%) were M β L producers, and 45 (61,64%) were classified as MDR. All strains producing M β L were *Pseudomonas aeruginosa*. The sensitivity of the isolates according to the CIM for antimicrobial evaluated were: 90,28% for polymyxin B, 36,11% for imipenem and 18% for ceftazidima. There was a high prevalence of MDR isolates and producers of β -lactamase-type AmpC and M β L in HUSM, this is extremely worrying once there is limiting therapy available. This situation becomes even more worrying with the find of isolates resistant the polymyxin B, witch is one of the last options of treatment for MDR isolates and producers of M β L. The detection of microorganisms is extremely important for the committees of infection hospital with the goal of preventing outbreaks, as well as guide the medical team on the conduct therapy, since there are few effective antimicrobial clinically for these pathogens and no prospects for development the new antimicrobial in the near future.

Keywords: β -lactamases, metallo- β -lactamase, AmpC, multiresistant

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Disposição dos discos de antimicrobianos no teste “screening”	37
FIGURA 2 - Representação esquemática das distâncias, substratos e agentes quelantes utilizados para a detecção fenotípica de amostras produtoras de MβL	39
FIGURA 3 - Amostras bacterianas apresentando teste de disco difusão sem a adição de agente quelante e o teste fenotípico negativo e positivo para a produção de MβL, respectivamente	39
FIGURA 4 – Amostras bacterianas com CIM maior que 512μl/ml e menor que 1μl/ml, para ceftazidima e imipenem	40
FIGURA 5 – Teste de disco difusão de um isolado de <i>P. aeruginosa</i> produtora de AmpC	44
FIGURA 6 - Teste de disco difusão de um isolado de <i>A. baumannii</i> classificado como MDR	44
FIGURA 7 - Teste de disco aproximação em um isolado de <i>P. aeruginosa</i> produtor de MβL	47
FIGURA 8 – Isolado de <i>A. baumannii</i> identificado como produtor de MβL pelo método do disco combinado.....	48
FIGURA 9 – Isolados de <i>A. baumannii</i> resistentes a Polimixina B pelo teste de microdiluição	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais variantes de M β L do tipo IMP	25
TABELA 2 - Principais variantes de M β L do tipo VIM	27
TABELA 3 – Distribuição das 73 amostras de bacilos Gram negativos não fermentadores multirresistentes obtidas a partir de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de janeiro a junho de 2006, de acordo com o material clínico e o setor de atendimento	42
TABELA 4 – Distribuição de 11 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtoras de metalo- β -lactamases (M β L), isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006, de acordo com o material clínico e com o setor de atendimento	43
TABELA 5 - Perfis de susceptibilidade de 73 isolados de bacilos Gram negativos não fermentadores obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006, de acordo com os testes de difusão em ágar	45
TABELA 6 - Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos dos 32 isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006	46
TABELA 7 - Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de 41 isolados de <i>A. baumannii</i> obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006	46
TABELA 8 – Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de 11 isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de Metalo- β -Lactamases	47

TABELA 9 – Perfis de sensibilidade obtidos através dos testes de microdiluição para Polimixina B, Imipenem e Ceftazidima para os 72 isolados de bacilos Gram negativos não fermentadores obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006	49
TABELA 10 – Principais fatores de risco para a aquisição de isolados multirresistentes em pacientes internados no HUSM	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC** – American Type Culture Collection
- AMC** – Amoxicilina ácido clavulânico
- AMI** - Amicacina
- AmpC** – β -lactamases cromossômicas induzíveis
- ATM** – Aztreonam
- BGN-NF**- Bacilo Gram-negativo Não Fermentador
- CAZ** – Cefatzidima
- CCS** – Centro de Ciências da Saúde
- CFL** – Cefalotina
- CFO** – Cefoxitina
- CIM** – Concentração Inibitória Mínima
- CIP** – Ciprofloxacino
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute
- CPM** – Cefepima
- CR** – Região comum
- CRO** – Ceftriaxona
- CTI** – Centro de Tratamento Intensivo
- CTT** - 2,3,5-trifeniltetrazólio
- CTX** – Cefotaxima
- DACT** – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- ESBL** – Beta lactamase de espectro ampliado
- ETP** – Ertapenem
- GEN** – Gentamicina

GIM – “Germany Imipenemase”

HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria

IMbL - Inibidor de metalo- β -lactamase

IMI – Imipenem

IMP – Imipenemase

LAC-HUSM - Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria

MbL - Metallo- β -lactamase

MDR – Multirresistente

MER – Meropenem

NCCLS – National Comitee for Clinical and Laboratory Satandards

PBP – Proteínas de ligação da penicilina

POL B – Polimixina B

PPT – Piperacilina/ tazobactam

SIM – “Seoul Imipenemase”

SFT – Sulfametazol/trimetroprim

SPM - São Paulo Metallo- β -lactamase

TCLE - Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento

TSB – Tryptic Soy Broth

VIM – Verona Imipenemase

2-MPA – Ácido 2-mercaptopropiônico

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 – Resistência bacteriana	17
2.2 – Classificação das b-lactamases	18
2.2.1 – Esquema de classificação de Ambler (1980)	18
2.2.2 – Esquema de classificação de Bush – Jacoby e Medeiros (1995)	19
2.3 - Metallo-β-lactamases	19
2.3.1 – Classificação	19
2.3.2 – Características	20
2.3.3 - Metallo- β -lactamases intrínsecas (cromossômicas)	20
2.3.4 - Metallo- β -lactamases móveis ou adquiridas	21
2.3.4.1 - Metallo- β -lactamases do tipo IMP	23
2.3.4.2 - Metallo- β -lactamases do tipo VIM	23
2.3.4.3- M β L do tipo SPM-1	24
2.3.4.4- M β L do tipo GIM-1	26
2.3.4.5- M β L do tipo SIM-1	26
2.3.5- Mecanismo de hidrólise das M β L	28
2.3.6- Inibidores de M β L	28
2.3.7- Detecção laboratorial das M β L	29
2.3.8- Tratamento	31
2.3.9- Epidemiologia no Brasil e no mundo	33

3 - MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 - Amostras bacterianas e caracterização fenotípica	35
3.1.1 - Identificação fenotípica	35
3.1.1.1- Identificação dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.	35
3.2 - Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos – teste de difusão em ágar	36
3.2.1- Identificação dos isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e das β -lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC)	36
3.2.2- Controle de qualidade dos discos de antimicrobianos	37
3.3 - Detecção da produção de metalo-b-lactamases (MbL)	38
3.3.1-Método de disco aproximação	38
3.3.2-Método do disco combinado IMI+EDTA para a detecção de MbL	38
3.4 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	40
3.5 - Perfil dos pacientes	40
4 - RESULTADOS	42
5 - DISCUSSÃO	51
6 - CONCLUSÕES	58
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8 – ANEXO	79

1 – INTRODUÇÃO

A emergência e disseminação de mecanismos de resistência aos antimicrobianos são problemas de grande importância atualmente, principalmente entre patógenos de relevância clínica como os bacilos-Gram negativos não fermentadores (BGN-NF) e algumas espécies da família *Enterobacteriaceae* (WALSH, 2005a; WALSH, 2005b). A produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos entre as bactérias Gram-negativas (LIVERMORE, 1995). Essas enzimas catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo que ele entre em contato com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana, impossibilitando assim a sua atividade antimicrobiana (BUSH, 1988; LIVERMORE, 1995; ROSSOLINI, 2005). A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos depende de vários fatores, como: quantidade e tipo da enzima produzida, capacidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão, velocidade de penetração do β -lactâmico na membrana externa da bactéria e a hiperexpressão das bombas de efluxo, as quais reduzem a concentração do antimicrobiano no interior das células (LIVERMORE, 1995; ROSSI, 2005).

A detecção de algumas β -lactamases em bactérias Gram negativas merece atenção, especialmente as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), as β -lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC) e as carbapenemases (LIVERMORE, 1995). Dentre essas enzimas que degradam os β -lactâmicos, as metalo- β -lactamases (M β L) são as mais temidas por seu amplo espectro de atividade contra todos os β -lactâmicos, exceto ao monobactâmico aztreonam, e também pela resistência que elas apresentam aos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (WALSH, 2005a, WALSH, 2005b).

A escolha do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) para implementação desse estudo se deve ao fato do alto índice de isolamento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. A detecção dessas cepas tem grande importância na determinação da melhor opção de tratamento para cada paciente, na menor pressão seletiva e no controle de infecção hospitalar. Desta maneira estaremos contribuindo para diminuir custos desnecessários ao hospital, pois com o isolamento dos pacientes portadores dessas cepas e o tratamento instituído corretamente, prevenirá o aparecimento de surtos e a disseminação de cepas produtoras de M β L.

O presente trabalho teve como objetivos principais:

- Identificar a produção de metalo- β -lactamases entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes isoladas a partir de diferentes espécimes clínicos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria;
- Verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*;
- Comparar os métodos de disco difusão e microdiluição para detecção de resistência a polimixina B, imipenem e ceftazidima;
- Avaliar o desempenho dos agentes quelantes EDTA 0,1M, EDTA 0,5M e ácido 2-mercaptopropiônico para a identificação de isolados produtores de M β L;
- Determinar o melhor substrato, ceftazidima ou imipenem, para a identificação de M β L;
- Avaliar os principais fatores de risco para a aquisição de microrganismos multirresistentes;
- Sugerir uma metodologia simples e de custo acessível que possa ser empregada na rotina do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM para detecção de cepas produtoras de M β L;

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência bacteriana

A introdução dos agentes antimicrobianos na prática clínica representou um dos grandes avanços na medicina para o tratamento dos mais diversos tipos de doenças infecciosas. No entanto, desde a introdução do primeiro antimicrobiano a resistência bacteriana a estes agentes vem sendo descrita e atualmente está emergindo em uma ampla variedade de patógenos tanto de origem nosocomial quanto comunitária (POWERS, 2004). A emergência e disseminação de inúmeros microrganismos resistentes resultam da combinação de múltiplos fatores como: mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genética na qual os genes de resistência são transferidos para novos microrganismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e disseminação de microrganismos resistentes; proliferação e disseminação de clones multiresistentes, a qual pode ocorrer em nível global (TENOVER, 2001).

A resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estão sendo expostas (LIVERMORE, 1995). Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriano é a produção de β -lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo, assim que ele entre em contato com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (BUSH, 1988; LIVERMORE, 1995; ROSSOLINI, 2001).

Os antimicrobianos β -lactâmicos representam a classe mais utilizada clinicamente devido à sua baixa toxicidade e a grande variedade de compostos disponíveis. Esta classe inclui: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MURRAY, 2004). Os β -lactâmicos atuam inibindo a última etapa da síntese do peptidoglicano por inibição da transpeptidase, para que essa ação ocorra os β -lactâmicos necessitam do anel β -lactâmico intacto. Os carbapenens constituem a terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes a penicilinas e cefalosporinas disponíveis, devido ao seu amplo espectro de atividade, sua elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2), estabilidade frente a muitas β -lactamases, incluindo as de espectro ampliado (ESBL) e as cromossômicas

(AmpC), e excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (GALES, 2002; JONES, 2005).

2.2 – Classificação das β -lactamases

A produção de β -lactamases é a principal forma de resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos entre as bactérias Gram-negativas. Elas são descritas como enzimas que hidrolisam amidas, amidinas ou outras pontes C-N, separando as amidas cíclicas do anel β -lactâmico (BUSH, 1995). A maioria das β -lactamases age via mecanismo éster de serina, no entanto, algumas necessitam de íons zinco para romper o anel β -lactâmico. Os genes que codificam a produção de β -lactamases podem estar localizados em cromossomos ou plasmídeos, sendo as enzimas conseqüentemente denominadas: cromossômicas ou plasmidiais (LIVERMORE, 1995).

A primeira β -lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain antes do uso da penicilina para o tratamento das infecções bacterianas (BUSH, 1989). Desde então, inúmeras β -lactamases foram identificadas e vários esquemas de classificação foram propostos para agrupar estas enzimas de acordo com suas características bioquímicas e pela análise da estrutura molecular (BUSH, 1989; LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001).

2.2.1 – Esquema de classificação de Ambler (1980)

AMBLER (1980) classificou as β -lactamases de acordo com sua estrutura primária em quatro classes, classes A a D, as quais estão classificadas dentro de dois grupos de acordo com diferenças em seus mecanismos catalíticos, isto é, serina- β -lactamase (classes A, C e D) e metalo- β -lactamase (classe B) (AMBLER, 1980; BUSH, 1995; ROSSOLINI, 2001). As classes A, C, e D possuem um resíduo de serina no local ativo da enzima, enquanto as enzimas de classe B possuem um resíduo de cisteína e utilizam íons zinco para romper o anel β -lactâmico (AMBLER, 1980; ROSSI, 2005).

As β -lactamases que hidrolisam carbapenens pertencem às classes A (penicilinasas), B (metalo- β -lactamase) e D (oxacilinasas), e possuem a propriedade de hidrolisar pelo menos parcialmente os carbapenens juntamente com outros β -lactâmicos (AMBLER, 1980; NORDMANN, 2002; POIREL, 2002; RASMUSSEN, 1997).

2.2.2 – Esquema de classificação de Bush – Jacoby e Medeiros (1995)

Este esquema baseia-se nas características funcionais e divide as β -lactamases em quatro grupos definidos de acordo com os seus substratos e sensibilidade aos inibidores ácido clavulânico e EDTA: i) Grupo 1: β -lactamases que não são inibidas pelo ácido clavulânico, pertencem a classe C de Ambler, denominadas AmpC; ii) Grupo 2: β -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico, pertencentes as classes A e D de Ambler, denominadas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e oxacilinas (OXA); iii) Grupo 3: são enzimas que possuem no seu sítio ativo íons zinco (Zn^{2+}) e não inibidas pelo ácido clavulânico sendo inibidas pelo EDTA, chamadas metalo- β -lactamases (M β L); iv) Grupo 4: possui enzimas que não são inibidas pelo ácido clavulânico mas não se encaixam nos outros grupos (BUSH, 1995).

2.3 - Metalo-b-lactamases

2.3.1 - Classificação

As M β L pertencem à classe molecular B de acordo com a classificação proposta por AMBLER (1980). De acordo com o esquema de classificação das β -lactamases proposto por BUSH em 1989, as M β L foram classificadas no grupo 3 com base nas suas propriedades bioquímicas, condição que foi reforçada em 1995 com a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH, 1995). Com o aumento da identificação de novas M β L, RASMUSSEM & BUSH (1997) propuseram a divisão do grupo 3, de acordo com o perfil de hidrólise para os carbapenens e outros β -lactâmicos, em 3 novos subgrupos: o subgrupo 3a que inclui as M β L com um amplo espectro de atividade, o subgrupo 3b que compreende as enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenens e no subgrupo 3c onde estão às enzimas que hidrolisam fracamente os carbapenens (RASMUSSEM, 1997; BUSH, 1998).

Com a obtenção da seqüência genética das M β L, GALLEN *et al.* (2001) propuseram um esquema de classificação numérico e subdividiram o grupo 3 em três subclasses: B1, B2, e B3. Este esquema foi atualizado por GARAU *et al.* (2004) após a elucidação da estrutura tridimensional de algumas M β L representantes de cada subclasse, no entanto, este esquema de classificação, segundo WALSH (2005a), não é adequado para acomodar todas as M β L.

2.3.2 – Características

As M β L são caracterizadas por hidrolisar todos os β -lactâmicos disponíveis comercialmente, com exceção do monobactâmico, aztreonam, necessitarem de íons zinco ou outros cátions divalentes como cofator para a sua atividade catalítica, não serem inibidas pelos inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente, sendo inibidas por agentes quelantes como EDTA (BUSH, 1995; BUSH, 1998; BUSH, 2001). Como todas as β -lactamases, as M β L podem ser codificadas cromossomicamente ou transmitidas através de elementos genéticos móveis (WALSH, 2005a).

A primeira M β L foi descrita em 1966 em um isolado de *Bacillus cereus*, sendo codificada cromossomicamente (SABATH, 1966; KUWABARA, 1967; HUSSAIN, 1985). Devido ao surgimento das M β L plasmídeos mediadas em patógenos de importante relevância clínica como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae*, em vários países, este mecanismo de resistência está se tornando um sério problema, pois limita as opções de tratamento para infecções causadas por estes patógenos, além disso, não há um inibidor de β -lactamase para uso clínico capaz de inibir eficientemente essas enzimas (BUSH, 2001; JONES, 2005; ROSSOLINI, 2005; WALSH, 2005a).

2.3.3 - Metallo- β -lactamases intrínsecas (cromossômicas)

As M β L podem ser produzidas intrinsecamente por alguns microrganismos encontrados no meio ambiente e por alguns patógenos oportunistas, que com exceção da *Stenotrophomonas maltophilia* e do *Bacillus anthracis*, raramente causam infecções sérias (PAYNE, 1994; CHEN, 2003; WALSH, 2005a). A primeira M β L codificada cromossomicamente foi de *Bacillus cereus* descrito em 1966, sendo recuperada de um único isolado (SABATH, 1966; KUWABARA, 1967; HUSSAIN, 1985). A segunda M β L foi descrita em 1982 em *Stenotrophomonas maltophilia* (SAINO, 1982; PAYNE, 1994; CROWDER, 1998; AVISON, 2001). Pouco tempo depois outras bactérias foram identificadas como produtoras M β L cromossômica, como: *Aeromonas* spp (IACONIS, 1990; WALSH, 1997), *Aeromonas hydrophila* (MASSIDA, 1991), *Aeromonas sobria* (WALSH, 1996), *Bacillus anthracis* (CHEN, 2003); *Caulobacter crescentus* (DOCQUIER, 2002; SIMM, 2001) *Chryseobacterium meningosepticum* (BELLAI, 2000a; WOODFORD, 2000; ROSSOLINI, 1998), *Chryseobacterium indologenes* (BELLAI, 2000b), *Chryseobacterium gleum*

(BELLAIS, 2002a), *Flavobacterium johnsoniae* (NAAS, 2003), *Janthinobacterium lividum* (DOCQUIER, 2004; ROSSOLINI, 2001) *Legionella gormanii* (FUJII, 1986; BOSCHI, 2000), *Myroides odoratus* (SATO, 1985; MAMMERI, 2002), *Myroides odoratimimus* (MAMMERI, 2002), *Serratia fonticola* (SAAVEDRA, 2003).

2.3.4 - Metallo- β -lactamases móveis ou adquiridas

As M β L adquiridas são codificadas por elementos genéticos móveis, os quais podem ser transferidos de um microrganismo para outro, facilitando assim a sua disseminação (WALSH, 2005b). Até o início dos anos 90, as M β L não possuíam muita importância clínica, pois eram produzidas cromossomicamente por alguns microrganismos de pouca relevância clínica os quais estavam, às vezes, associados à infecções oportunistas. A primeira M β L adquirida foi encontrada em *Bacteroides fragilis*, a qual foi primeiramente classificada como cromossômica, no entanto, após a caracterização do gene CfiA (ou CcrA) observou-se que esta era mediada por elementos genéticos móveis (YOTSUJI, 1983; CUCHURAL, 1986; BANDO, 1991; POIREL, 2002; WANG, 1998; YAMAZOE, 1999).

O primeiro relato de M β L adquirida em um patógeno de importância clínica foi em 1991, no Japão, em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem e a outros antimicrobianos anti-pseudomonas (WATANABE, 1991), desde então inúmeras M β L foram identificadas e atualmente são conhecidas cinco tipos: IMP (imipenemase) (WATANABE, 1991, OSANO, 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI, 1999), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (TOLEMAN, 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA, 2004) e SIM (Seoul imipenemase) (LEE, 2005a). Os genes que codificam M β L já foram observados em vários patógenos clinicamente importantes como os bacilos não fermentadores *P. aeruginosa* (SENDA, 1996a) e *Acinetobacter* spp (TAKAHASHI, 2000; YUM, 2002a), e em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* como: *Serratia marcescens* (ITO, 1995; OSANO, 1994), *E. coli* (MIRIAGOU, 2003), *Proteus mirabilis* (VOURLI, 2006), *Proteus vulgaris* (ARAKAWA, 2000), *Klebsiella pneumoniae* (IKONOMIDIS, 2005; YAN, 2001b), *Klebsiella oxytoca* (SHIBATA, 2003), *Morganella morganii* (SHIBATA, 2003), *Shigella flexneri* (IYOBE, 2000), *Enterobacter cloacae* (YAN, 2002), *Enterobacter aerogenes* (ARAKAWA, 1995), *Citrobacter freundii* (YAN, 2002) e *Citrobacter young* (HAWKEY, 2001).

Por muitos anos achou-se que as M β L estavam restritas ao Japão, onde o primeiro gene de resistência foi encontrado, no entanto, hoje as M β L são um problema mundial e já foram confirmadas em vários países como: Itália (LAURETTI, 1999), França (POIREL, 2000), Grécia (TSAKRIS, 2000), Alemanha (CASTANHEIRA, 2004), Portugal (CARDOSO, 2002), Espanha (PRATS, 2002), Inglaterra (TYSALL, 2002), Suécia (GISKE, 2003), Polônia (PATZER, 2004), Turquia (BAHAR, 2004), Hungria (LIBISCH, 2004), Croácia (SARDELIC, 2003), Malásia (HO, 2002), Taiwan (YAN, 2001a), Coreia (YUM, 2002a), Cingapura (KOH, 2004), Hong Kong (CHU, 2001), China (HAWKEY, 2001), Índia (HEMALATHA, 2005), Austrália (PELEG, 2004), Canadá (GIBB, 2002), Estados Unidos (TOLEMAN, 2004), Colômbia (CRESPO, 2004), Argentina (PASTERAN, 2005) e no Brasil (TOLEMAN, 2002).

Os genes que codificam as M β L dos tipos IMP, VIM, GIM-1 e SIM-1 foram encontrados em integrons de classe 1 (CASTANHEIRA, 2004; IYOBE, 2000; LAURETTI, 1999; LEE, 2005a; POIREL, 2000;), no entanto, M β L do tipo IMP também foi encontrada em integrons de classe 3 (ARAKAWA, 1995, WALSH 2005a). Integrons são elementos genéticos capazes de capturar genes que fazem parte de genes cassetes via uma recombinação sítio-específico entre dois sítios: o integron e o gene cassete (BENNETT, 1999). Os genes cassetes são pequenas moléculas de DNA que podem estar na forma livre, circular ou não replicada, que se deslocam de um sítio genético para outro, as quais fazem parte da grande molécula de DNA, tais como os plasmídeos ou o cromossomo bacteriano. Esses genes contêm geralmente um único gene junto com um sítio de recombinação denominado 59 elementos de base (BENNETT, 1999). Os integrons foram descobertos a partir da análise dos plasmídeos de resistência e dos transposons que transportavam vários genes de resistência, assim, um integron pode possuir resistência para mais de uma classe de antimicrobiano (BENNETT, 1999; WALSH, 2005b). O gene que codifica a M β L SPM-1 (TOLEMANN, 2002), a qual até o momento é restrita ao Brasil, está associado com dois tipos diferentes de elementos CR (regiões comum), o qual foi identificado como CR4 (POIREL, 2004). No entanto, conhece-se muito pouco sobre os elementos CR, principalmente como eles transportam os genes de resistência (WALSH, 2005b).

2.3.4.1 - Metalo- β -lactamases do tipo IMP

Três anos após WATANABE *et al.* (1991) descreverem a primeira M β L adquirida em *P. aeruginosa*, OSANO *et al.* (1994) caracterizaram IMP-1 em *Serratia marcescens*, a qual foi isolada em 1991 de um paciente com infecção do trato urinário no Hospital de Aichi, Okazaki, Japão. Alguns estudos realizados em hospitais japoneses demonstraram a disseminação de IMP-1 em várias regiões do Japão. Em um estudo realizado em 1993 foram avaliados 105 isolados *S. marcescens* de 7 hospitais japoneses e identificou-se quatro isolados com um gene similar a *bla*_{IMP-1} (ITO, 1995). SENDA *et al.* (1996a) avaliaram 3700 isolados de *P. aeruginosa* obtidas de 17 hospitais japoneses entre os anos de 1992 e 1994, e encontraram o gene *bla*_{IMP-1} em 15 dos 132 isolados selecionados para a pesquisa deste gene. Ao avaliarem a CIM para o imipenem dos isolados positivos para M β L observaram que a aquisição de genes para M β L sozinhos nem sempre estão associados com altos níveis de resistência aos carbapenems. Outro estudo em hospitais japoneses, realizado entre 1991 a 1996, avaliou 933 isolados de bacilos Gram negativo resistente a ceftazidima destes 80 possuíam o gene *bla*_{IMP-1} (HIRAKATA, 1998).

Por anos acreditou-se que bactérias produtoras de M β L do tipo IMP estavam restritas ao Japão. Esta convicção mudou com a identificação de IMP-2 e IMP-5 em *Acinetobacter baumannii* na Itália e em Portugal, em 1997 e 1998, respectivamente (RICCIO, 2000; SILVA, 2002). Atualmente são conhecidas 23 variantes pertencentes à subclasse IMP (LAHEY, 2007), as quais foram identificadas em diferentes microrganismos e em diversos países. A Tabela 1 contém os dados das principais variantes de IMP relatadas, microrganismos e país onde foram detectadas.

2.3.4.2 - Metalo- β -lactamases do tipo VIM

O segundo grupo dominante de M β L adquirida são as M β L do tipo VIM, também conhecida como M β L Européia, devido a grande prevalência desta enzima nos países do continente europeu (WALSH, 2005a). Atualmente são conhecidas 18 variantes identificadas em diferentes microrganismos e relatadas em vários países por todo o mundo (Tabela 2) (LAHEY, 2007). VIM-1 foi a primeira variante a ser identificada em *P. aeruginosa*, isolada de ferida cirúrgica de um paciente da CTI no Hospital Universitário de Verona na Itália, em 1997 (LAURETTI, 1999). Logo em seguida, CORNAGLIA *et al.* (2000) relataram um surto

de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenens produtora de VIM-1, nesta mesma instituição. Neste estudo, dos 541 isolados de *P. aeruginosa* obtidos entre 1997 e 1998, 35 foram suspeitos de produzir M β L e essa suspeita foi confirmada em oito isolados que possuíam o gene *bla*_{VIM-1}.

A segunda variante, VIM-2, foi identificada na França em um isolado de *P. aeruginosa* obtido de cultura de sangue de uma paciente com leucemia (POIREL, 2000). VIM-2 é a variante predominante das M β L do tipo VIM, já foi relatada em vários países e microrganismos, sendo responsável por surtos como o que ocorreu em um hospital grego (MAVROIDI, 2000).

2.3.4.3- M β L do tipo SPM-1

O terceiro tipo de M β L adquirida foi identificado em uma amostra de *P. aeruginosa* obtida a partir de uma cultura de urina de uma paciente com leucemia linfoblástica aguda hospitalizada no Complexo Hospitalar São Paulo, São Paulo, Brasil em 2001. Passados cinco dias, um isolado de *P. aeruginosa*, com o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, foi obtido a partir da hemocultura. A paciente veio a falecer logo em seguida devido choque séptico (TOLEMAN, 2002). SPM-1 hidrolisa todos os antimicrobianos β -lactâmicos, preferencialmente cefalosporinas, sendo incapaz de hidrolisar aztreonam, ticarcilina e ácido clavulânico (MURPHY, 2003). Até o momento SPM-1 só foi encontrada em *Pseudomonas aeruginosa* e está enzima parece estar restrita ao Brasil, pois não há relatos de cepas produtoras de M β L do tipo SPM-1 em outros países.

A disseminação epidêmica de *P. aeruginosa* produtora de M β L do tipo SPM-1 já foi evidenciada em vários estados brasileiros (GALES, 2003b). Em um estudo realizado no Recife, foram avaliados 19 isolados de *P. aeruginosa* e 11 foram identificados como produtores de M β L, a análise genotípica destes isolados demonstrou que eles possuíam o gene *bla*_{SPM-1} (POIREL, 2004). ZAVASCKI *et al.* (2005) avaliaram 35 isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenens do Hospital São Lucas (Porto Alegre, RS), entre janeiro e outubro de 2004, para a produção de M β L sendo que 27 isolados foram positivos e destes 21 transportavam o gene *bla*_{SPM-1}. Este foi o primeiro surto por *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 descrito no sul do Brasil.

TABELA 1: Principais variantes de M β L do tipo IMP.

Variante	Microrganismo	País	Referência
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i>	Japão	OSANO, 1994.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	SENDA, 1996.
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japão	SENDA, 1996b.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japão	SENDA, 1996b.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japão	SENDA, 1996b.
	<i>Citrobacter freundii</i>	Japão	HIRAKATA, 1998.
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Japão	HIRAKATA, 1998.
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Japão	HIRAKATA, 1998.
	<i>Acinetobacter</i> spp.	Japão	ARAKAWA, 2000.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Japão	ARAKAWA, 2000.
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Japão	ARAKAWA, 2000.
	<i>Escherichia coli</i>	Japão	ARAKAWA, 2000.
	<i>Proteus vulgaris</i>	Japão	ARAKAWA, 2000.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Taiwan	YAN, 2001a.
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwan	YAN, 2001a.
	<i>Acinetobacter junii</i>	Inglaterra	TYSALL, 2002.
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Providencia rettgeri</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Morganella morganii</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Acinetobacter</i> spp	Coréia	LEE, 2003a.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	FILHO, 2003.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Cingapura	KOH, 2004.
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Brasil	SADER, 2005a.
<i>Acinetobacter</i> spp	Brasil	SADER, 2005a.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	LINCOPAN, 2005.	
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Itália	RICCIO, 2000.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japão	IYOBE, 2000.
IMP-4	<i>Acinetobacter</i> spp	Hong Kong	CHU, 2001.
	<i>Citrobacter youngae</i>	China	HAWKEY, 2001.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Austrália	PELEG, 2004.
	<i>Serratia marcescens</i>	Austrália	PELEG, 2005.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Austrália	PELEG, 2005.
	<i>Escherichia coli</i>	Austrália	PELEG, 2005.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Austrália	PELEG, 2005.
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal	SILVA, 2002.
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japão	YANO, 2001.
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brasil	GALES, 2003a.
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canadá	GIBB, 2002.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Malásia	HO, 2002.
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan	YAN, 2001b.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taiwan	YAN, 2002.

IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	XIONG, 2006.
IMP-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	IYOBE, 2002.
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japão	IYOBE, 2002.
IMP-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	IYOBE, S. <i>et al.</i> *
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Itália	DOCQUIER, 2003.
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Itália	TOLEMAN, 2003.
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	MENDES, 2004a.
IMP-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Estados Unidos	HANSON, 2006.
IMP-19	<i>Aeromonas caviae</i>	França	NEUWIRTH, 2007.

* Não publicado. Fonte: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>

2.3.4.4- MβL do tipo GIM-1

Em 2002, cinco isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes foram obtidas de diferentes pacientes em Dusseldorf, Alemanha. Estes isolados foram provenientes do trato respiratório e apresentaram resistência a todos os antimicrobianos β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, sendo sensíveis apenas a polimixina B. Os testes fenotípicos indicaram a produção de MβL e a análise genética revelou um novo gene de MβL denominado *bla*_{GIM-1}, representando a quarta subclasse de MβL adquirida a ser identificada. GIM-1 possui um amplo perfil de hidrólise, mas não possui um substrato específico, e não hidrolisa aztreonam e os inibidores de β-lactamases. Assim como a maioria dos genes de MβL, GIM-1 é encontrado em integron de classe 1, o qual contém, além do gene *bla*_{GIM-1}, genes para resistência aos aminoglicosídeos e um gene para oxacilinase *bla*_{OXA-2} (CASTANHEIRA, 2004). Este é único relato de GIM-1, e desde 2002, nenhum novo relato de *P. aeruginosa* possuindo GIM-1 foi apresentado à literatura.

2.3.4.5- MβL do tipo SIM-1

SIM-1 foi à quinta subclasse de MβL a ser identificada. Esta nova MβL foi encontrada em sete isolados de *A. baumannii* obtidos de um hospital em Seul, Coreia, entre 2003-2004, de pacientes com pneumonia e infecção do trato urinário. Esses isolados possuíam baixos MICs para o imipenem e o meropenem (8 a 16μg/mL) e tinham um fenótipo de multirresistência. Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacino, mas resistentes ou intermediário para outros antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de amplo espectro, ampicilina sulbactam e todos os aminoglicosídeos testados. SIM-1 é codificada por um

integron de classe 1, e é mais relacionado com as enzimas do tipo IMP do que qualquer outra M β L (LEE, 2005a).

TABELA 2: Principais variantes de M β L do tipo VIM.

Variante	Microrganismo	País	Referência
VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Itália	LAURETTI, 1999.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grécia	TSAKRIS, 2000.
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Itália	RICCIO, 2001.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Itália	LOMBARDI, 2002.
	<i>Escherichia coli</i>	Grécia	MIRIAGOU, 2003.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grécia	GIAKKOUPPI, 2003.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	França	LARTIGUE, 2004.
	<i>Escherichia coli</i>	Espanha	TÓRTOLA, 2005.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Espanha	TÓRTOLA, 2005.
	<i>Proteus mirabilis</i>	Grécia	VOURLI, 2006.
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	França	POIREL, 2000.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grécia	MAVROIDI, 2000.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Taiwan	YAN, 2001a.
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwan	YAN, 2001a.
	<i>Serratia marcescens</i>	Coréia	YUM, 2002b.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Espanha	PRATS, 2002.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Portugal	CARDOSO, 2002.
	<i>Citrobacter freundii</i>	Taiwan	YAN, 2002.
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Coréia	YUM, 2002a.
	<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>	Coréia	YUM, 2002.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Coréia	JEONG, 2003.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Coréia	LEE, 2003a.
	<i>Acinetobacter spp</i>	Coréia	LEE, 2003a
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japão	SHIBATA, 2003.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polônia	WALSH, 2003.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Croácia	SARDELIC, 2003.
	<i>Pseudomonas spp</i>	Chile	MENDES, 2004b.
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Chile	MENDES, 2004b.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Venezuela	MENDES, 2004b.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	SADER, 2005b.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colômbia	VILLEGAS, 2006.
		<i>Pseudomonas putida</i>	Polônia
	<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>	Polônia	FIETT, 2006.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	PAGNIEZ, 2006.
VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Taiwan	YAN, 2001a.
VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grécia	POUNARAS, 2002.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Suécia	GISKE, 2003.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polônia	PATZER, 2004.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hungria	LIBISCH, 2004.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	LUZZARO, 2004.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Itália	LUZZARO, 2004.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tunísia	KTARI, 2006.

VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Turquia	BAHAR, 2004.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turquia	BAHAR, 2004.
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Cingapura	KOH, 2004.
VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Estados Unidos	TOLEMAN, 2004.
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colômbia	CRESPO, 2004.
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reino Unido	WALSH, 2005a.
VIM-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reino Unido	WALSH, 2005a.
VIM-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	PASTERAN, 2005.
VIM-12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grécia	POURNARAS, 2005.

2.3.5- Mecanismo de hidrólise das M β L

As β -lactamases inativam os antimicrobianos β -lactâmicos através da hidrólise da ligação C-N do anel β -lactâmico, este mecanismo difere entre as serina- β -lactamases e as M β L (WALSH, 2005a). As M β L possuem diferentes aminoácidos que definem a estrutura do seu sítio ativo o qual é coordenado por pelo menos um ou dois íons zinco, estes, por sua vez, coordenam duas moléculas de água que servem como nucleófilos e hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico (PAGE, 2002, PAUL-SOTO, 1999; WALSH, 2005a). A seqüência HXHXD (histidina-X-histidina-X-ácido aspártico) facilita a coordenação dos íons zinco no sítio ativo (WALSH, 2005b).

O mecanismo de hidrólise das M β L é complexo e varia de uma M β L para outra, por este motivo ele não está completamente esclarecido apesar da elucidação da estrutura tridimensional de algumas M β L (CONCHA, 1996; GARAU, 2005). O mecanismo proposto sugere que o sítio ativo orienta e polariza o anel β -lactâmico para facilitar o ataque nucleofílico pela ligação do íon zinco a água e/ou hidroxila (WALSH, 2005a). As M β L possuem um sítio ativo de amplo encaixe que podem acomodar diferentes substratos β -lactâmicos, o que facilita muito seu espectro de atividade (WALSH, 2005b).

A elucidação da estrutura tridimensional e a compreensão dos mecanismos de hidrólise são ferramentas úteis para o desenvolvimento de novos fármacos ou inibidores efetivos clinicamente capazes de inibir essas enzimas e proteger a atividade de antimicrobianos de amplo espectro como os carbapenens (CONCHA, 1996; GARAU, 2005).

2.3.6- Inibidores de M β L

As M β L não são inibidas pelos inibidores de serina- β -lactamase, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, no entanto, o desenvolvimento de um inibidor de M β L,

que seja efetivo para o uso clínico, não é uma tarefa fácil, devido às variações nos sítios ativos dessas enzimas, os quais foram observados pelas estruturas tridimensionais elucidadas, dificultando assim o desenvolvimento de um único inibidor que seja ativo para todas as M β L (CONCHA, 1996; GARAU, 2005, WALSH, 2005a).

Inúmeros compostos foram sintetizados e avaliados como inibidores de M β L, incluindo: derivados tioéster (PAYNE, 1997; HAMMOND, 1999), álcool trifluor metil e cetonas (WALTER, 1996), tióis (ARAKAWA, 2000; MOLLARD, 2001, SIEMANN, 2003), sulfonil hidrazonas (SIEMANN, 2002), produtos naturais tricíclicos (PAYNE, 2002), derivados do ácido succínico (TONEY, 2001), derivados do 1 β -metilcarbapenem (NAGANO, 1999), bifenil tetrazole (TONEY, 1999), inibidores do peptídeo cistenil (BOUNAGA, 2001) e hidroximatos (WALTER, 1999). No entanto, os estudos que avaliaram estes inibidores foram realizados em bactérias que codificavam M β L cromossômica ou produziam a enzima IMP-1, não incluindo as M β L de maior interesse como as do tipo VIM, SPM, GIM, SIM e as outras variantes do tipo IMP. São necessários mais estudos, incluindo todas as M β L conhecidas, além da elucidação da estrutura tridimensional das outras M β L das quais não se conhece a estrutura tridimensional, para o desenvolvimento de um inibidor efetivo clinicamente para todos os tipos de M β L.

2.3.7- Detecção laboratorial das M β L

A disseminação de genes que codificam M β L representa uma importante ameaça para a terapia antimicrobiana com β -lactâmicos, portanto, a identificação de bactérias produtoras de M β L pelo laboratório de microbiologia é necessária para evitar a disseminação destes genes de resistência e auxiliar na escolha da terapia antimicrobiana adequada. Até o momento, nem o CLSI nem os outros comitês internacionais, sugerem um teste para a detecção de amostras produtoras de M β L (PITOUT, 2005).

Com o aumento de relatos de cepas produtoras de M β L em várias partes do mundo, houve a necessidade do desenvolvimento de metodologias para a detecção dessas cepas. Os testes genotípicos são os mais seguros e eficazes para a detecção destas enzimas, no entanto, requerem tempo e pessoal altamente treinado, sendo inviável para a rotina do laboratório clínico. Aproveitando-se do fato de que essas enzimas possuem zinco no seu sítio ativo e são inibidas por agentes quelantes como EDTA e derivados de ésteres de tióis, vários testes fenotípicos foram desenvolvidos com o auxílio desses agentes quelantes (PITOUT, 2005).

Esses testes incluem: - o teste de sinergismo de disco aproximação usando EDTA com imipenem (IMI) e ceftazidima (CAZ), e o ácido 2-mercaptopropiônico com IMI e CAZ (ARAKAWA, 2000; LEE, 2001; LEE, 2003b); - o teste de Hodge modificado (LEE, 2001; LEE, 2003b); - teste do disco combinado de IMI ou CAZ com EDTA (YONG, 2002); - as tiras de Etest M β L (ARROYO, 2005; LEE, 2005b; WALSH, 2002); - o método de microdiluição usando EDTA e 1,10-fenantrolina com IMI (MIGLIAVACCA, 2002) – o ensaio microbiológico Imipenem-EDTA (MARCHIARO, 2005) e o teste fenotípico utilizando o ácido dipicolínico como inibidor de M β L (KIMURA, 2005a).

O teste de disco-aproximação é o teste fenotípico mais utilizado, por apresentar boa sensibilidade, especificidade, baixo custo e ser de fácil execução, no entanto, as M β L variam em seu nível de inibição com certos inibidores e também variam em sua habilidade de conferir resistência para alguns substratos como ceftazidime e imipenem. Os membros da família *Enterobacteriaceae* que possuem o gene para M β L podem ser sensíveis ou intermediários a esses substratos, dificultando assim o estabelecimento de critérios para a seleção de microrganismos suspeitos de portar esse mecanismo de resistência (WALSH, 2005a). Segundo FRANKLIN *et al.* (2006) o método fenotípico mais adequado para a detecção de microrganismos sensíveis aos carbapenens é o teste do disco combinado, e propõe que o teste fenotípico seja realizado nos microrganismos resistentes para ceftazidima ou ticarcilina/ácido clavulânico. O teste do disco combinado demonstrou ser adequado para a detecção de M β L em isolados de *K. pneumoniae*, reforçando o estudo anterior (PETROPOULOU, 2006). No entanto, o teste do disco combinado deve ser interpretado com cautela, pois os resultados podem variar conforme a preparação dos discos (ANDRADE, 2007).

As fitas de Etest também podem ser utilizadas para a detecção M β L, tanto cromossômica quanto plasmidial. Estas fitas são impregnadas em uma extremidade com imipenem e imipenem+EDTA na outra extremidade. É uma metodologia de fácil execução e interpretação, no entanto, possuem alto custo (WALSH, 2002). Segundo LEE *et al.* (2005b) as fitas de Etest M β L possuem alta sensibilidade e especificidade para a detecção de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. produtores de M β L. No entanto, o resultado obtido pode ser influenciado pelo nível de resistência ao imipenem e por outras condições do teste, como o armazenamento da cepa antes da realização do teste, pois as cepas armazenadas por muito tempo a temperatura ambiente podem perder o gene que codifica M β L e fornecer um resultado falso positivo (LEE, 2005b). Neste estudo os autores propõe a modificação das fitas

de Etest M β L para detectar isolados produtores de M β L com MIC <4 μ g/ml. Em um estudo realizado na África do Sul, 49 isolados de *A. baumannii* foram avaliados para a presença de M β L com a fita de Etest M β L, a qual indicou a presença desta β -lactamase. A análise molecular dessas amostras detectou a presença de oxacilinase, demonstrando que as fitas de Etest devem ser interpretadas com cautela em isolados de *A. baumannii* sendo necessário a análise molecular para a correta identificação (SEGAL, 2005).

2.3.8- Tratamento

O aumento da diversidade das M β L e a ocorrência em vários microrganismos, limita severamente as opções terapêuticas resultando no uso de combinações de agentes antimicrobianos na tentativa de obter sinergismo entre os fármacos que sozinhos seriam ineficazes. Outra alternativa é o uso de velhos antimicrobianos, como as polimixinas. No entanto, a terapia antimicrobiana adequada para o tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores de M β L continua desconhecida (WALSH, 2005a; WALSH, 2005b). Estratégias para prevenção e terapia incluem medidas de controle de infecção e modificações no uso de antimicrobianos. A co-resistência com outros antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, limita ainda mais as opções terapêuticas indicando a necessidade do desenvolvimento de novos e mais potentes agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação (WALSH, 2005b).

Embora em alguns estudos os carbapenems continuem ativos, sua utilidade clínica continua incerta (WALSH, 2005a). Altas doses de aztreonam demonstraram ser uma terapia útil para o tratamento de pneumonia por *P. aeruginosa* produtora do M β L em ratos (BELLAI, 2002b). Em outro estudo, o ciprofloxacino demonstrou ser o antimicrobiano mais eficaz para o tratamento de bacteremia endógena por *P. aeruginosa* portadora do gene *bla_{IMP}*, (AOKI, 2004).

A última alternativa terapêutica útil pode ser as polimixinas, que são antimicrobianos polipeptídicos que se tornaram disponíveis para o uso clínico no início dos anos 50 e 60. As polimixinas agem na parede celular bacteriana deslocando íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Esse processo resulta em um aumento da permeabilidade na membrana citoplasmática e conseqüentemente a morte celular (FALAGAS, 2005). As duas formas de polimixina disponíveis comercialmente são a Colistina (Polimixina E) e a Polimixina B, essas formulações foram gradualmente sendo abandonadas no início dos anos 80 devido aos seus efeitos adversos (nefrotoxicidade,

ototoxicidade e bloqueio neuromuscular) e o surgimento de agentes antimicrobianos mais seguros, como as cefalosporinas (FALAGAS, 2005; TAM, 2005). O uso clínico das polimixinas ficou limitado a formulações tópicas e para a prevenção de infecções em pacientes neutropênicos ou com fibrose cística (FALAGAS, 2005).

Estudos recentes demonstraram a eficácia das polimixinas para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes e revelaram que elas não são tão tóxicas quanto se imaginava (CATCHPOLE, 1997; LEVIN, 1999; KATRAGKOU, 2005; MICHALOPOULOS, 2005; SADER, 2006). Em um estudo onde foram avaliados 60 pacientes tratados com Polimixina B, 14% tiveram falência renal, mas esta condição clínica não foi associada exclusivamente ao uso da polimixina, pois outros antimicrobianos e fármacos nefrotóxicos foram administrados concomitantemente (OUDERKIRK, 2003). Esses estudos têm demonstrado que a toxicidade das polimixinas não difere muito dos outros antimicrobianos utilizados e que a função renal pode ser recuperada com a retirada do fármaco (SADER, 2006).

Com o aumento do uso das polimixinas a emergência de resistência para este agente é atualmente preocupante, uma vez que estes fármacos muitas vezes são os únicos eficazes para o tratamento de infecções por cepas multirresistentes. Por enquanto, a maioria dos microrganismos continua sensível as polimixinas, no entanto já há relatos de cepas resistentes (LANDMAN, 2005; LI, 2006; URBAN, 2003). No Brasil, cinco isolados de *A. baumannii* resistentes a polimixina foram identificados no Complexo Hospitalar São Paulo em 2003. O aparecimento dessas cepas resistentes as polimixinas pode ser sido devido à pressão seletiva e a disseminação clonal. Uma maneira para prevenir a resistência as polimixinas é a terapia combinada de polimixina com rifampicina e/ou imipenem e possivelmente azitromicina, o uso clínico dessas combinações necessita de mais estudos (LANDMAN, 2005).

A ausência de novos agentes antimicrobianos que sejam ativos contra os microrganismos produtores de M β L e a disseminação dos genes que codificam M β L podem conduzir a falha terapêutica. Isso será mais preocupante se os genes que codificam essa enzima se disseminarem para a comunidade, esta condição reforça a importância da detecção precoce dos produtores de M β L nas áreas onde eles já foram encontrados, além de rigorosas medidas de controle de infecção para impedir a disseminação desses genes (WALSH, 2005a).

2.3.9- Epidemiologia no Brasil e no mundo

A ocorrência de M β L mediando resistência em vários patógenos tem sido responsável por vários surtos nosocomiais em diferentes partes do mundo, demonstrando a necessidade de práticas apropriadas de controle de infecção. Na Grécia, a disseminação de M β L do tipo VIM já foi evidenciada por vários estudos (GIAKKOUI, 2003; IKONOMIDIS, 2005; TSAKRIS, 2000). Na Coreia, encontrou-se 60,7% de isolados produtores de M β L em 28 hospitais avaliados, com uma maior prevalência de *P. aeruginosa* produtora de M β L do que em outros países e observou-se o crescente aumento no número de *Acinetobacter* spp produtor de M β L (LEE, 2003a). Na Itália, 20% dos isolados de *P. aeruginosa* de um hospital ao norte do país possuíam M β L do tipo VIM e 70% dos isolados eram resistentes aos carbapenems (LAGATOLLA, 2004). Outro estudo realizado em 3 hospitais italianos de diferentes regiões demonstrou que *P. aeruginosa* multirresistente e produtora de M β L é um problema nacional, pois se encontra distribuída em diferentes regiões do país (TOLEMAN, 2005). No Japão a resistência aos carbapenems aumentou de 19,3% em 1998 para 38% em 2002 (FRITSCHÉ, 2005). KIMURA *et al.* (2005b) demonstraram em seu estudo a distribuição clonal de *P. aeruginosa* em 60 hospitais japoneses. Na Austrália o primeiro surto por isolados produtores de M β L foi relato em 2005, evidenciando a ampla disseminação desses genes ao redor do mundo (PELEG, 2005).

Na América Latina, a maior concentração de produtores de M β L está no Brasil e na Argentina. Dentre os países participantes do programa SENTRY entre os anos de 1997-2001, o Brasil contribuiu com 90% dos isolados de *P. aeruginosa* MDR. Segundo dados deste mesmo programa no período de 2001-2003, 70% dos isolados de *P. aeruginosa* do Brasil e 73% dos isolados de *Acinetobacter* spp. da Argentina foram produtores de M β L (SADER, 2005a).

No Brasil o primeiro relato de cepas produtoras de M β L ocorreu em 2002, em isolados de *P. aeruginosa* obtidos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho no Rio de Janeiro (PELLEGRINO, 2002). Dados do SENTRY indicam que 44,8% dos isolados de *P. aeruginosa* brasileiros são resistentes ao imipenem e 43,9% são produtores de M β L (FRITSCHÉ, 2005). Com a identificação de SPM-1, em 2001, amostras produtoras dessa enzima tem sido identificadas em vários centros brasileiros (GALES, 2003b). No Recife, das 24 amostras de *P. aeruginosa* avaliadas 15 foram produtoras de M β L do tipo SPM-1 (MAGALHÃES, 2005). Em um estudo realizado em 3 hospitais de Porto Alegre, RS, 49

(81,7%) dos 60 isolados de *P. aeruginosa* analisados foram produtores de M β L e possuíam M β L dos tipos SPM-1 ou IMP-1 (GASPARETO, 2007). Em 2005, identificou-se o primeiro isolado de *K. pneumoniae* produtora de M β L do tipo IMP-1 do Brasil e da América Latina (LINCOPAN, 2005), evidenciando ampla disseminação desse mecanismo em vários patógenos nos hospitais brasileiros.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Amostras bacterianas e caracterização fenotípica

Foram analisados 73 isolados multirresistentes de BGN-NF, no período de janeiro a junho de 2006, provenientes de diferentes amostras clínicas de pacientes atendidos no HUSM. Apenas um isolado por paciente foi analisado. As cepas foram selecionadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM) e encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), prédio 26, sala 1201, onde foi efetuada a pesquisa para M β L.

3.1.1 - Identificação fenotípica

A identificação fenotípica e a análise do resultado do antibiograma para a seleção das amostras foram efetuadas utilizando a automação (MicroScan- DADE – Behring). As cepas com resistência a ceftazidima e/ou imipenem foram selecionadas. Estes isolados foram repicados em ágar MacConKey e armazenados a -20°C em caldo TSB acrescido de 15% glicerol. Para a realização da pesquisa as cepas foram ativadas a partir deste estoque em ágar Mueller Hinton.

3.1.1.1- Identificação dos isolados de *Acinetobacter* spp.

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram identificados pela automação como *Acinetobacter baumannii/haemolyticus*. A técnica de crescimento a 44°C foi utilizada para a diferenciação entre essas duas espécies.

Para esta técnica empregou-se um tubo estéril com 3mL de caldo TSB onde o microrganismo foi inoculado e incubado por 24h em Banho Maria. Após este período o nítido crescimento bacteriano ou a turbidez do meio indicavam que o microrganismo era o *A. baumannii*.

3.2 - Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos – teste de difusão em ágar

A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada através do teste de difusão em ágar conforme recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003, atualmente CLSI). Todas as amostras foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos: Amicacina (AMI), Amoxicilina/ Ácido clavulânico (AMC), Aztreonam (ATM), Cefalotina (CFL), Cefotaxima (CTX), Cefoxitina (CFO), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Cefepima (CPM), Ciprofloxacina (CIP), Ertapenem (ETP), Gentamicina (GEN), Imipenem (IMI), Meropenem (MER), Piperacilina/tazobactam (PPT), Sulfametaxazol/trimetoprim (SFT). Todos os discos foram obtidos da SENSIDISC.

Para a realização do teste de disco difusão as cepas foram reativadas do caldo TSB acrescido de glicerol em ágar Mueller Hinton. Desta cultura foram escolhidas de 4 a 5 colônias isoladas as quais foram dissolvidas em solução salina 0,9%, para obtenção de uma turvação igual ao do tubo 0,5 da escala de McFarland. A seguir, esta suspensão foi espalhada em três direções, com auxílio de um “swab” estéril, em uma placa de Petri de 150mm contendo o meio de ágar Mueller Hinton. Após este procedimento os discos de antimicrobianos foram dispensados em uma seqüência que permitisse um teste “screening” para a detecção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e das β -lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC), conforme demonstrado na Figura 1.

Este antibiograma foi efetuado com todas as cepas, permitindo assim classificá-las de acordo com perfis de sensibilidade. A pesquisa de M β L foi realizada posteriormente, com todas as cepas como detalhada no próximo item. Os isolados que não possuíam nenhum dos mecanismos de resistência pesquisados (AmpC, ESBL ou M β L) foram classificados como multirresistentes (MDR).

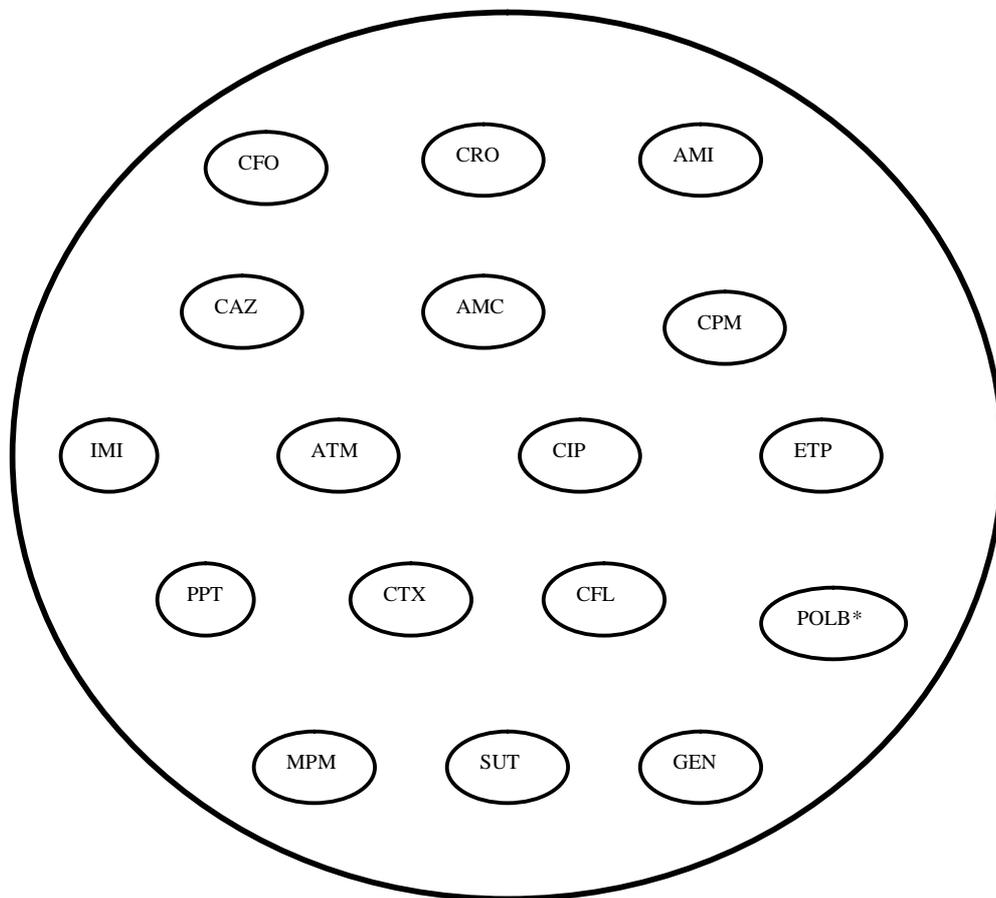
3.2.1- Identificação dos isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e das β -lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC)

A identificação dos produtores de AmpC foi observada pelo achatamento do halo da ceftazidima quando colocado a 2cm de distância de um disco de cefoxitina. Para a detecção de ESBL o aparecimento de uma zona fantasma entre o disco de amoxicilina ácido clavulânico e os discos de aztreonam, cefepima, ceftriaxona ou ceftazidima, colocados a 2cm

de distância, indicariam o isolado como produtor de ESBL. Após a dispensação dos discos as placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-24h, para posterior leitura dos halos de inibição.

3.2.2- Controle de qualidade dos discos de antimicrobianos

O controle de qualidade foi efetuado para todos os discos utilizados com cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27953 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, em conformidade com as normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana contidas no 15º Suplemento informativo (M100-S15) (CLSI), obedecendo as metodologias contidas no documento M2-A8.



* Somente para *P. aeruginosa*.

FIGURA 1- Disposição dos discos de antimicrobianos no teste “screening”.

3.3 - Detecção da produção de metalo- β -lactamases (M β L)

3.3.1-Método de disco aproximação

A pesquisa de M β L foi baseada no teste de disco aproximação conforme proposto por ARAKAWA *et al.* 2000 e LEE *et al.* 2001. Os inibidores de M β L utilizados foram: ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA), solução de EDTA 0,1M e solução de EDTA 0,5M. Os substratos utilizados foram: Ceftazidima e Imipenem.

Foi preparada uma suspensão bacteriana correspondente ao do tubo 0,5 da escala de McFarland a qual foi semeada em uma placa de Petri de 150 mm contendo ágar Mueller Hinton, onde 3 discos de cada substrato, CAZ e IMI, foram posicionados ao lado de um disco central de papel filtro estéril onde se adicionou uma alíquota dos seguintes agentes quelantes: 10 μ L EDTA 0,1 M, 10 μ L EDTA 0,5 M e 3 μ L ácido 2-mercaptopropiônico. A distância entre os discos de IMI e CAZ em relação às soluções de EDTA 0,1 e 0,5 mM foi de 1 cm, enquanto que para o 2-MPA foi de 1,5 a 2 cm, conforme indicado na Figura 2.

As placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-24h. O aparecimento de uma distorção e/ou ampliação do halo de inibição de crescimento da amostra bacteriana teste entre o disco contendo o substrato (CAZ e ou IMI) e o papel filtro adicionado de um dos agentes quelantes foi considerado positivo para a produção de M β L. Já em testes negativos não se observa a alteração no halo de crescimento da amostra bacteriana (Figura 3). Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2 - Método do disco combinado IMI+EDTA para a detecção de M β L

O método do disco combinado foi proposto por YONG *et al.* 2002, onde dois discos de IMI são dispensados sobre uma placa contendo ágar Mueller Hinton e em um dos discos acrescenta-se 4 μ L (750 μ g) de uma solução de EDTA 0,5M. Após o período de incubação de 18-24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, uma diferença maior ou igual a 7mm entre os halos de inibição dos discos de IMI com e sem o EDTA indica que o microrganismo é produtor de M β L.

Esta metodologia foi aplicada para os 11 isolados considerados produtores de M β L pela metodologia de disco aproximação descrita acima. Como controle negativo foram selecionados 11 isolados, aleatoriamente, classificados como não produtores de M β L.

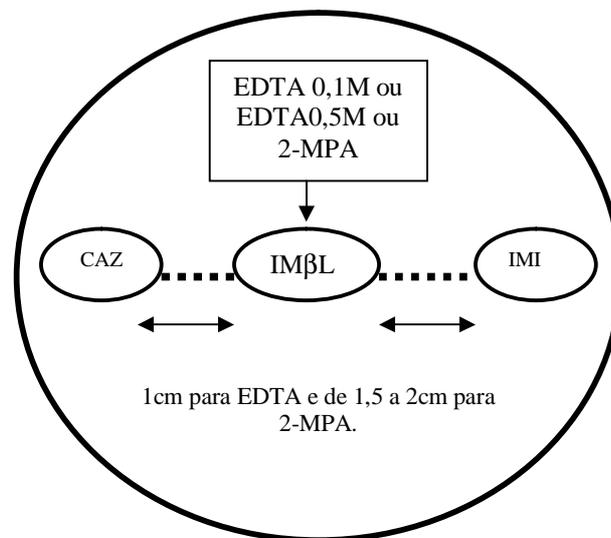


FIGURA 2 - Representação esquemática das distâncias, substratos e agentes quelantes utilizados para a detecção fenotípica de amostras produtoras de M β L.



Teste de disco difusão sem a adição de agente quelante.



NEGATIVO



POSITIVO

FIGURA 3 - Amostras bacterianas apresentando teste de disco difusão sem a adição de agente quelante e o teste fenotípico negativo e positivo para a produção de M β L, respectivamente.

3.4 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI 2007 para: Polimixina B, Imipenem e Ceftazidima. Para esta técnica empregaram-se placas de 96 poços onde foram distribuídos 100µl de caldo Mueller Hinton em cada poço e 20µl do antimicrobiano foi dispensado no primeiro poço, onde se obteve a concentração de 512µl/ml. Nos poços subsequentes realizaram-se diluições para a obtenção das seguintes concentrações: 256µl, 128µl, 64µl, 32µl, 16µl, 8µl, 4µl, 2µl e 1µl. O inóculo bacteriano correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi lido em espectrofotômetro à 625nm, obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,10. Após o ajuste do inóculo, 100µl do mesmo foram dispensados em cada poço.

Após o período de incubação de 16-24h a 35±2°C, dispensou-se em cada poço 15µl 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) 1% para facilitar a leitura visual da CIM. Este corante é incolor e quando reduzido torna-se vermelho pela formação do trifenilformazan (TTF) indicando que há crescimento bacteriano (ALEF, 1998), a ausência de crescimento bacteriano caracteriza a CIM (Figura 4). O teste foi realizado em triplicata.

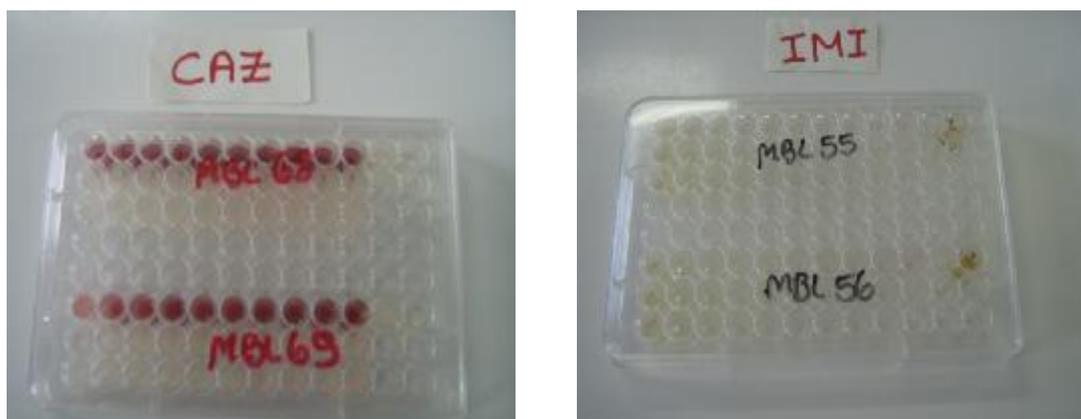


FIGURA 4 – Amostras bacterianas com CIM maior que 512µl/ml e menor que 1µl, para ceftazidima e imipenem, respectivamente.

3.5 - Perfil dos pacientes

O perfil dos pacientes foi delineado a partir dos dados contidos no registro do paciente, obtido através do número do SAME, constando no arquivo do HUSM. Não houve

contato direto com os pacientes ou exposição dos mesmos a questionários; sendo guardado sigilo total no que se refere ao nome do paciente do qual a cepa foi isolada. Não houve, portanto, a necessidade do emprego do Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento (TCLE). O trabalho foi aprovado pelo conselho de ética sob o número: 23081.017286/2006-17.

Os dados obtidos dos prontuários dos pacientes foram: idade, doença de base, tempo de internação, tempo de permanência na CTI, medicação utilizada antes e após o isolamento do microrganismo multirresistente e se o paciente foi a óbito. Esses dados foram utilizados para identificar os principais fatores de risco para a aquisição de microrganismos multirresistentes entre os pacientes atendidos no HUSM.

4 – RESULTADOS

Durante o período de estudo foram analisados 73 isolados, sendo 32 (43,84%) *P. aeruginosa* e 41 (56,16%) *A. baumannii*. Pela técnica de crescimento a 44°C para a diferenciação de *Acinetobacter haemolyticus/baumannii*, todos os isolados foram identificados como *A. baumannii*.

Na Tabela 3 estão representados os espécimes clínicos e as unidades hospitalares de procedência das 73 amostras analisadas neste estudo. Um total de 43,83% dos isolados foram obtidos de secreções do trato respiratório, seguido por ferida operatória (13,70%), urina (6,85%), sangue (2,74%) e outras secreções (32,88%). A clínica médica foi à unidade onde se obteve o maior número de procedência dos isolados com 28 amostras, seguido pelo centro de tratamento intensivo (CTI) (n=18), clínica cirúrgica (n=13), ambulatório (n=4), nefrologia (n=1). Em 9 amostras não foi possível identificar a unidade.

TABELA 3 – Distribuição das 73 amostras de bacilos Gram negativos não fermentadores multirresistentes obtidas a partir de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de janeiro a junho de 2006, de acordo com o material clínico e o setor de atendimento.

Espécime clínico/ Unidade	n	%
Espécime clínico		
Secreções do trato respiratório*	32	43,83
Ferida operatória	10	13,70
Urina	5	6,85
Sangue	2	2,74
Outras secreções**	24	32,88
Unidade		
Clínica médica	28	38,36
CTI	18	24,66
Clínica cirúrgica	13	17,80
Ambulatório	4	5,48
Nefrologia	1	1,37
Desconhecido	9	12,33
Total	73	100

*Aspirado traqueal- n=28 e Escarro- n=4

** Secreção de lesão, Secreção de pé, Secreção de escara, Secreção de orelha, Secreção de dreno, Líquido pleural, Swab calcâneo, Swab lesão de mid, ponta de cateter.

Dos 73 isolados analisados 11 (15,07%) foram identificados como produtores de M β L. Dos isolados restantes, 17 (23,3%) foram identificados como produtores de AmpC e 45 (61,64%) foram classificados como MDR, ou seja, não foi identificado nenhum dos mecanismo de resistência proposto neste estudo. Todos os isolados identificados como produtores de M β L foram de *P. aeruginosa*, esses isolados foram obtidos principalmente do trato respiratório (n=5; 45,45%), seguido por ferida operatória (n=2; 18,18%), urina (n=1; 9,10%) e outras secreções (n=3; 27,27%). A CTI foi à unidade com o maior número de isolados (n=5), seguido pela clínica médica (n=4) e clínica cirúrgica (n=2) (Tabela 4).

TABELA 4 – Distribuição das 11 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases (M β L), isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006, de acordo com o material clínico e com o setor de atendimento.

Espécime clínico/ Unidade	n	%
Espécime clínico		
Secreções do trato respiratório*	5	45,45
Ferida operatória	2	18,18
Urina	1	9,10
Outras secreções**	3	27,27
Unidade		
CTI	5	45,45
Clínica médica	4	36,36
Clínica cirúrgica	2	18,18
Total	11	100

* Todos de aspirado traqueal.

** Secreção biliar, Swab escara, Swab calcâneo.

O teste de disco difusão para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado conforme as recomendações do CLSI. Os antimicrobianos selecionados foram distribuídos em uma seqüência que permitisse a identificação dos isolados produtores de AmpC e ESBL. Na Figura 4 está representado um isolado produtor de AmpC onde se observa o nítido achatamento do halo da ceftazidima e na Figura 5 um isolado classificado como MDR resistente a todos os antimicrobianos avaliados.

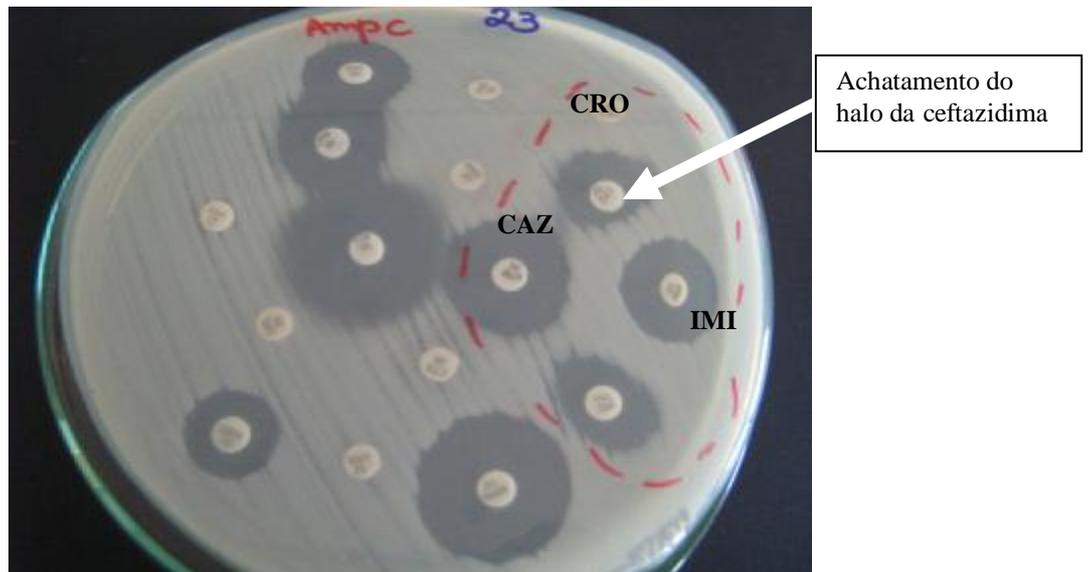


FIGURA 5 – Teste de disco difusão de um isolado de *P. aeruginosa* produtora de AmpC.

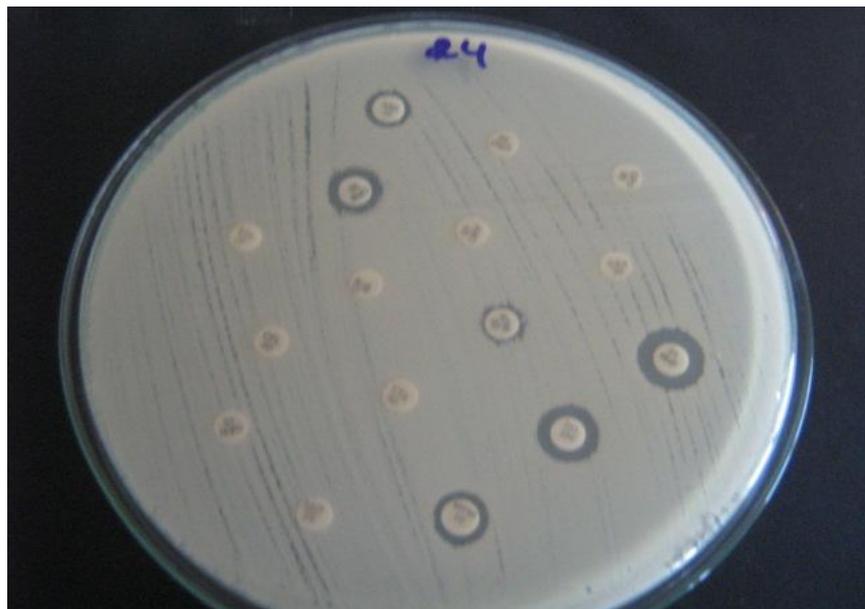


FIGURA 6 - Teste de disco difusão de um isolado de *A. baumannii* classificado como MDR.

Os antimicrobianos com maior sensibilidade foram imipenem e meropenem, com 41,09% e 34,25% de sensibilidade respectivamente. Para os demais antimicrobianos observou-se um alto índice de resistência (Tabela 5).

TABELA 5 – Perfis de sensibilidade dos 73 isolados de bacilos Gram negativos não fermentadores obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006, de acordo com os testes de difusão em ágar.

Antimicrobiano	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)
Amoxicilina ácido clavulânico	0	0	73 (100)
Amicacina	12 (16,44)	6 (8,22)	55 (75,34)
Aztreonam	15 (20,54)	8 (10,95)	50 (68,5)
Ceftazidima	2 (2,73)	0	71 (97,26)
Cefoxitina	1 (1,37)	0	72 (98,63)
Ciprofloxacino	7 (9,59)	0	65 (89,04)
Cefalotina	0	0	73 (100)
Cefepime	10 (13,7)	5 (6,85)	58 (79,45)
Cefotaxime	3 (4,10)	4 (5,48)	66 (90,41)
Ceftriaxone	1 (1,37)	6 (8,22)	66 (90,41)
Ertapenem	7 (9,59)	0	66 (90,41)
Gentamicina	9 (12,33)	1 (1,37)	63 (86,30)
Imipenem	30 (41,09)	6 (8,22)	37 (50,68)
Meropenem	25 (34,24)	2 (2,73)	46 (63,0)
Piperacilina/Tazobactam	7 (9,59)	1 (1,37)	65 (89,04)
Sulfametazol/trimetropim	2 (2,73)	0	71 (97,26)

Analisando apenas os 32 isolados *P. aeruginosa* os seguintes resultados foram obtidos: 11 (34,37%) produtores de MBL, 13 (40,62%) AmpC e 8 (25%) MDR. A sensibilidade a polimixina B pela metodologia de disco difusão foi avaliada para *P. aeruginosa*, de acordo com o CLSI 2007, sendo que todos os isolados foram sensíveis a este antimicrobiano. Foram identificados 11 perfis de sensibilidade entre os isolados, sendo que três foram mais prevalentes (Tabela 6).

TABELA 6 – Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos dos 32 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006.

Perfil	Antimicrobiano						
	POL B	ATM	IMI	MER	CAZ	CPM	n (%)
1	S	R	R	R	R	R	12 (37,5)
2	S	S	R	R	R	R	5 (15,62)
3	S	R	S	S	R	R	3 (9,37)
Outros	-	-	-	-	-	-	12 (37,5)

Nenhum dos 41 isolados de *A. baumannii* analisados foi produtor de M β L, sendo 36 (87,80%) isolados classificados como MDR e 5 (12,2%) foram produtores de AmpC. Pela análise da sensibilidade aos antimicrobianos, 11 perfis foram identificados. Os perfis predominantes estão representados na Tabela 7. Para isolados de *A. baumannii* o CLSI não recomenda a metodologia de disco para a Polimixina B, sendo preconizado a determinação da CIM para esses isolados.

TABELA 7 - Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de 41 isolados de *A. baumannii* obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006.

Perfil	Antimicrobiano							
	IMI	MER	ATM	CAZ	CPM	PPT	AMI	n (%)
1	R	R	R	R	R	R	R	20 (48,78)
2	S	S	R	R	R	R	R	8 (19,51)
3	S	R	R	R	R	R	R	4 (9,75)
4	S	R	R	R	R	R	S	2 (4,88)
Outros	-	-	-	-	-	-	-	7 (17,03)

Para os 11 isolados produtores de M β L identificou-se apenas três perfis de resistência que estão representados na Tabela 8.

TABELA 8 – Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de 11 isolados de *P. aeruginosa* produtores de Metallo- β -Lactamases.

Perfil	Antimicrobiano						
	POL B	ATM	IMI	MER	CAZ	CPM	n (%)
1	S	S	R	R	R	R	6 (54,54)
2	S	R	R	R	R	R	4 (36,36)
3	S	R	S	S	R	R	1 (9,09)

A pesquisa de M β L foi realizada pelo teste de disco aproximação proposto por ARAKAWA *et al.* 2000 e LEE *et al.* 2001 (Figura 7). Entre os substratos utilizados a ceftazidima demonstrou melhor sensibilidade, identificando os isolados produtores de M β L, enquanto que o imipenem identificou apenas dois dos 11 isolados produtores de M β L. Entre os agentes quelantes, a solução de EDTA 0,5 M e o 2-MPA apresentaram o melhor desempenho na identificação dos isolados produtores de M β L, detectando 10 e 9 isolados respectivamente. As distâncias utilizadas de 1cm para as soluções de EDTA e 2,0cm para o 2-MPA foram adequadas para a realização da pesquisa, facilitando a leitura e a identificação dos produtores de M β L.

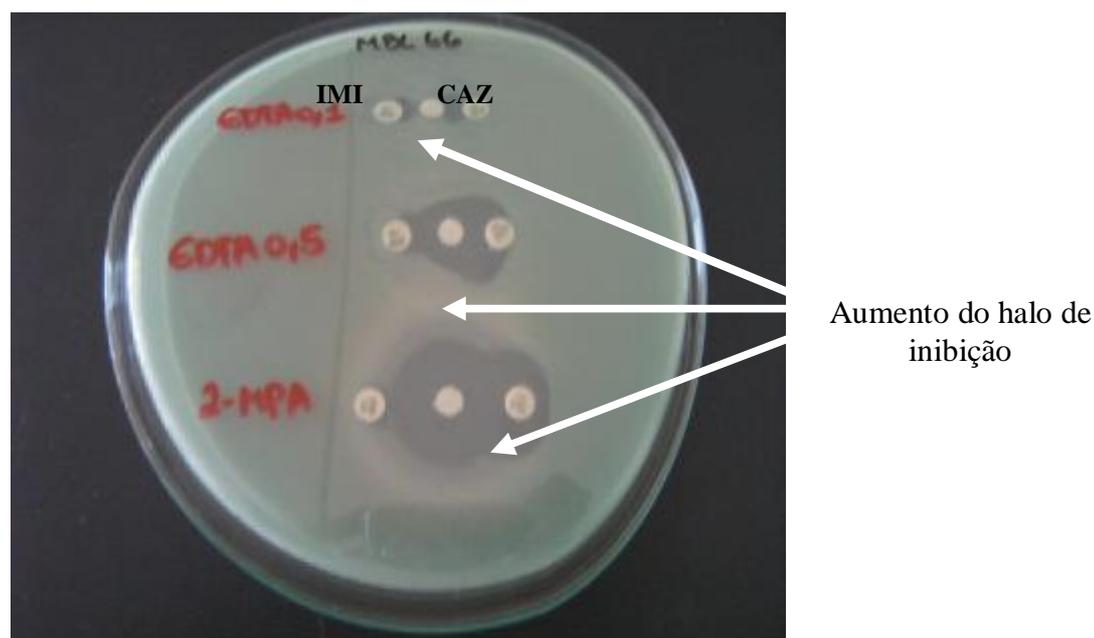


FIGURA 7 – Teste de disco aproximação em um isolado de *P. aeruginosa* produtor de M β L.

Para o teste do disco combinado os 11 isolados de *P. aeruginosa* classificados como produtores de M β L pelo teste de disco aproximação foram identificados como produtores de M β L, ou seja, as duas metodologias foram equivalentes. No entanto, entre os 11 isolados classificados como M β L negativo pela metodologia de disco aproximação, o teste do disco combinado identificou dois isolados de *A. baumannii* como produtores M β L (Figura 8).

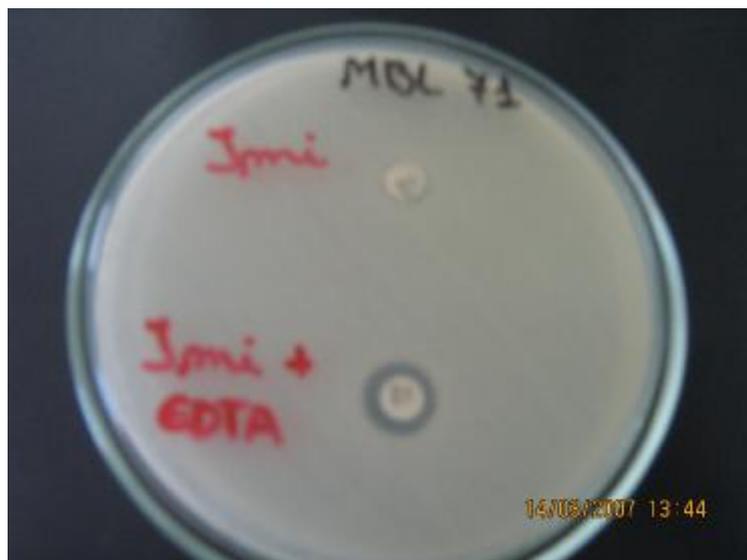


FIGURA 8 – Isolado de *A. baumannii* identificado como M β L positivo pelo método do disco combinado.

A CIM foi determinada apenas para polimixina B, imipenem e ceftazidima. Esses antimicrobianos foram escolhidos ou por serem utilizados na identificação dos isolados produtores de M β L ou para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. Apenas 72 isolados foram avaliados, pois um dos isolados de *P. aeruginosa* produtor de AmpC não cresceu. A sensibilidade a polimixina B, imipenem e ceftazidima foram de 90,28%, 36,11% e 16,66%, respectivamente (Tabela 9).

TABELA 9 – Perfis de sensibilidade obtidos através dos testes de microdiluição para Polimixina B, Imipenem e Ceftazidima para os 72 isolados de bacilos Gram negativos não fermentadores obtidos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria, no período de março a junho de 2006.

	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)	Total
Polimixina B	65 (90,28)	0	7 (9,72)	72
Imipenem	26 (36,11)	24 (33,33)	22 (30,56)	72
Ceftazidima	12 (16,66)	3 (4,17)	57 (79,17)	72

Comparando os resultados obtidos pela CIM e pela disco-difusão obteve-se 66,68% e 87,50% de compatibilidade para o imipenem e a ceftazidima, respectivamente. Em relação a polimixina B, apenas para *P. aeruginosa* está padronizado o teste de disco difusão pelo CLSI 2007, sendo que houve 93,55% de compatibilidade entre as duas metodologias avaliadas. Dos 7 isolados resistentes a polimixina B, cinco foram de *A. baumannii* multiresistente e dois de *P. aeruginosa*, uma multiresistente e outra produtora de AmpC (Figura 9).



FIGURA 9 – Isolados de *A. baumannii* resistentes a Polimixina B pelo teste de microdiluição.

Os principais fatores de risco para a aquisição de isolados multiresistentes foram obtidos através do perfil dos pacientes. Esses dados foram avaliados apenas para 59 pacientes, pois para 14 pacientes não se teve acesso aos prontuários. A idade dos pacientes variou de 13 a 96 anos, com uma média de 50,73 anos. Dos 59 pacientes em que se teve acesso aos prontuários 40 foram transferidos para CTI em algum momento da internação, permanecendo nessa unidade por um tempo médio de 19,26 dias. A permanência média dos pacientes no

ambiente hospitalar foi de 64,26 dias. Alguns pacientes possuíam duas ou mais doenças de base, sendo que doença neurológica e doença intra-abdominal foram as patologias predominantes. O uso de vários antimicrobianos foi o principal fator de risco para o aparecimento de isolados multirresistentes (Tabela 10). Dos pacientes avaliados 24 foram a óbito.

TABELA 10 – Principais fatores de risco para a aquisição de isolados multirresistentes em pacientes internados no HUSM.

	MbL n(%)	AmpC n(%)	MDR n(%)	Total n(%)
n	10	10	39	59
Doença de base				
Neurológica	2 (20)	5 (50)	13 (33,33)	20 (33,9)
Intra-abdominal	2 (20)	2 (20)	9 (23,07)	13 (22,0)
Diabetes	-	4 (40)	3 (7,69)	7 (11,8)
Câncer	-	-	6 (15,38)	6 (10,17)
AIDS	2 (20)	1 (10)	2 (5,12)	5 (8,50)
Traumatismo	1 (10)	-	4 (10,25)	5 (8,50)
Renal	1 (10)	-	4 (10,25)	5 (8,50)
Pulmonar	-	1 (10)	4 (10,25)	5 (8,50)
Cardíaca	2 (20)	-	-	2 (3,40)
Antimicrobianos utilizados				
Carbapenens	10 (100)	6 (60)	33 (84,61)	48 (81,35)
Cefalosporinas	8 (80)	6 (60)	22 (56,41)	38 (64,4)
Outros β -lactâmicos	8 (80)	8 (80)	12 (30,76)	28 (47,45)
Vancomicina	10 (100)	10 (100)	38 (97,43)	58 (98,30)
Lincomicina	4 (40)	2 (20)	6 (15,38)	12 (20,33)
Aminoglicosídeos	9 (90)	10 (100)	22 (56,41)	41 (89,83)
Polimixina B	3 (30)	2 (20)	3 (7,69)	8 (13,55)
Outras variáveis				
Media de idade (anos)	43,7	54,1	54,4	50,73
Tempo médio de internação (dias)	88,8	40,7	63,3	64,26
Tempo médio de permanência na CTI (dias)	11,5	21,9	24,4	19,26
Número de óbitos	4	5	15	24

5 - DISCUSSÃO

O aumento da prevalência de patógenos multirresistentes nas últimas décadas vem preocupando clínicos e a comunidade científica, pois as opções de tratamento para vários patógenos de grande relevância estão ficando restritas a poucos antimicrobianos. As M β L têm recebido atualmente uma notável atenção entre as β -lactamases, devido a sua habilidade em hidrolisar carbapenems e outras classes de antimicrobianos, comprometendo, assim, o uso desses agentes para o tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores desta enzima (BUSH, 1998). Há relatos de isolados produtores de M β L em vários países ao redor do mundo, como foi demonstrado nas Tabelas 1 e 2, sendo responsáveis por surtos e falha na resposta terapêutica com os principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções por microrganismos MDR (FRITSCH, 2005; LAGATOLLA, 2004; LAUPLAND, 2005).

Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com vários outros estudos de diversas partes do mundo, onde os isolados MDR estão se tornando um problema de saúde pública. No presente estudo a maioria dos isolados foram classificados como MDR (61,64%), podendo apresentar outro mecanismo de resistência que não os pesquisados neste estudo. Apenas 11 (15,07%) isolados foram produtores de M β L, sendo todos de *P. aeruginosa*. No Japão um estudo avaliou 88 isolados de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem, de diferentes hospitais japoneses, destas 11 (12,5%) foram produtoras de M β L. Este estudo concluiu que a disseminação de isolados produtores de M β L não aumentou nos últimos anos no Japão, no entanto o mesmo clone se disseminou por várias regiões daquele país (KIMURA, 2005b). Na Índia dos 50 isolados de *P. aeruginosa* avaliados, 14 (28%) foram produtores de M β L (HEMALATHA, 2005). Dos 228 isolados analisados no Canadá, 98 (48%) foram produtores de M β L (LAUPLAND, 2005). Na América Latina, a maior concentração de isolados produtores de M β L está no Brasil e Argentina (FRITSCH, 2005; SADER, 2005a). No Brasil, isolados produtores de M β L já foram identificados em diversas regiões (GALES, 2003b). Das 198 amostras de *P. aeruginosa* analisadas em João Pessoa, Paraíba, apenas 4 foram produtoras de M β L (FILHO, 2002). No Recife, 62% dos isolados de *P. aeruginosa* avaliados foram produtores de M β L (MAGALHÃES, 2005). Em um estudo realizado em Porto Alegre dos 298 isolados de *P. aeruginosa* avaliados 86 (28,86%) foram identificados como produtores

de M β L (ZAVASCKI, 2006). Pode-se notar que a prevalência de isolados produtores de M β L varia de uma região para outra no Brasil.

Os mecanismos de resistência aos carbapenems em *Acinetobacter* spp. são pouco compreendidos, e incluem a produção de M β L e de oxacilinases (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 1996; URBAN, 2006). O grande número de isolados de *Acinetobacter* spp. apresentando resistência a quase todos os antimicrobianos disponíveis atualmente é alarmante. Esta situação pode ser consequência de sua origem saprófita, onde este microrganismo esteve exposto por longos períodos a outros microrganismos produtores de antimicrobianos no solo e por este motivo consegue desenvolver rapidamente mecanismos de resistência (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 1996, URBAN, 2006). Há poucos relatos na literatura de isolados de *A. baumannii* produtores de M β L, no entanto, já foram relatados em diversas partes do mundo como: Portugal (SILVA, 1999; SILVA, 2002), Coréia (YUM, 2002a; LEE, 2003a), Itália (RICCIO, 2000), Hong Kong (CHU, 2001), Japão (SHIBATA, 2003; TAKAHASHI, 2000), Reino Unido (TYSALL, 2002), Polônia (FIETT, 2006), Argentina (SADER, 2005a). No Brasil, o primeiro relato de *A. baumannii* produtor de M β L foi em 2003 em um paciente hospitalizado no Complexo Hospitalar São Paulo, onde o nível de resistência entre isolados de *Acinetobacter* spp. chega a aproximadamente 10% (GALES, 2003a). A última variante de M β L a ser identificada, SIM-1, foi encontrada em 7 isolados de *A. baumannii* obtidos de amostras de escarro e urina na Coréia (LEE, 2005a). Em nosso estudo, todos os isolados de *A. baumannii* foram MDR, podendo possuir outros mecanismos de resistência que não os propostos para este estudo.

O espécime clínico predominante entre os 73 isolados avaliados no nosso estudo foi às secreções do trato respiratório, correspondendo a 43,83% das amostras. Esse também é o espécime clínico predominante em vários outros estudos (PELEG, 2005; LEE, 2003a). No estudo de ANDRADE et al (2003), dos 1894 isolados de *P. aeruginosa*, 43,3% foram provenientes do trato respiratório. Em um estudo realizado com 135 isolados de *P. aeruginosa*, no Hospital São Lucas, em Porto Alegre, 43% dos isolados foram provenientes de secreções do trato respiratório, seguido por urina (33,3%), ferida cirúrgica (5,9%), cateter (3%) e outras secreções (9,6%). Em Fortaleza, onde foram avaliados 331 isolados de *Pseudomonas* spp., os principais espécimes clínicos foram aspirado traqueal (26,36%), urina (23,15%) e sangue (12,86%) (TORRES, 2006). Em nosso estudo urina e sangue aparecem em 3º e 4º lugar, respectivamente, entre os espécimes prevalentes. A unidade médica onde foi obtida a maioria dos isolados foi à clínica médica (38,36%), seguida pela CTI (24,66%). Estes

resultados diferem de outros estudos, onde a CTI é a unidade prevalente (PAGANI, 2005). No estudo de TORRES et al (2006) a unidade de tratamento de urgência e a CTI foram as unidades prevalentes. A diferença encontrada em nosso estudo pode ser devido ao alto grau de debilidade dos pacientes encontrados na clínica médica.

Quanto ao padrão de sensibilidade aos antimicrobianos dos 73 isolados observou-se um alto grau de resistência às diversas classes de antimicrobianos, sendo que os antimicrobianos com maior sensibilidade foram o imipenem e o meropenem, com 41,09% e 34,25% respectivamente. Todos os isolados de *P. aeruginosa* foram sensíveis a polimixina B pelo teste de disco difusão. SADER *et al.* (2005) encontraram 55,2% de sensibilidade para o imipenem e a gentamicina e 57,4% de sensibilidade para o meropenem, entre os 183 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes com bacteremia do Complexo Hospitalar São Paulo. No Hospital Geral de Fortaleza, 62,7% das 311 cepas de *P. aeruginosa* foram sensíveis ao imipenem (TORRES, 2006). Em um estudo realizado em João Pessoa, 80,3% dos foram sensíveis ao imipenem (FILHO, 2002).

Com base na sensibilidade aos antimicrobianos foram definidos os perfis sensibilidade para as amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Para os 32 isolados de *P. aeruginosa* avaliados neste estudo identificou-se 11 perfis de resistência sendo que 3 foram predominantes. O perfil identificado como perfil 1 foi o de maior prevalência em 12 (37,5%) isolados, este perfil compreende os isolados com sensibilidade apenas a polimixina B (Tabela 6). Entre os 11 isolados de *P. aeruginosa* produtoras de M β L identificou-se 3 perfis, sendo que o perfil com sensibilidade apenas a polimixina B e aztreonam foi o predominante. Para os 41 isolados de *A. baumannii* também foram identificados 11 perfis de sensibilidade, sendo que o perfil 1 compreendeu 20 (48,78%) isolados, os quais foram resistentes a todos os antimicrobianos avaliados. Há poucos estudos na literatura que classificam os isolados de acordo com os perfis de sensibilidade. No estudo realizado por ZAVASCKI *et al.* (2005), no Hospital São Lucas em Porto Alegre, foram identificados 19 perfis de sensibilidade entre as 135 amostras de *P. aeruginosa* analisadas, sendo que o perfil predominante foi encontrado em 37% dos isolados que foram sensíveis apenas a polimixina B e o aztreonam. A sensibilidade apenas a poliximina foi encontrada em 26,7% dos isolados esta condição representa o perfil 2. Em outro estudo realizado neste mesmo hospital com 298 isolados de *P. aeruginosa*, foram identificados 63 perfis de resistência, sendo que o perfil predominante foi o mesmo do estudo anterior, sensibilidade apenas para polimixina B e aztreonam (ZAVASCKI, 2006).

A identificação rápida e correta dos isolados produtores de M β L é de grande importância para a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, pois permite a tomada de

decisões para evitar surtos e a disseminação desses microrganismos no ambiente hospitalar. Várias metodologias para a detecção de isolados produtores de M β L foram propostas. As técnicas genotípicas são as mais seguras para a identificação dos isolados portadores dos genes para M β L, no entanto são metodologias de alto custo, trabalhosas e inadequadas para serem implementadas na rotina dos laboratórios de bacteriologia. As metodologias fenotípicas são as mais utilizadas, pois se baseiam no fato de que essas enzimas necessitam de cátions divalentes para desempenhar a sua função e empregam agentes quelantes, como o EDTA ou os derivados de ésteres de tióis, os quais capturam esses íons divalentes, inativando as M β L (PITOUT,2005; WALSH, 2005a).

Em nosso estudo, visando determinar uma metodologia simples e de fácil aplicação na rotina laboratorial, apenas a metodologia fenotípica foi avaliada. No presente estudo, a metodologia de disco aproximação, segundo ARAKAWA *et al.* (2000) e LEE *et al.* (2001) foi utilizada e comparou-se o desempenho dos 3 principais agentes quelantes relatados na literatura: solução de EDTA 0,1M, solução de EDTA 0,5M e o 2-MPA. A solução de EDTA 0,1M não teve um bom desempenho na detecção dos isolados produtores de M β L, pois falhou na detecção de 4 isolados e em outros 2 isolados resultou em uma zona de inibição fraca e de difícil interpretação. A solução de EDTA 0,5M e o 2-MPA detectaram 10 e 9 isolados respectivamente, sendo que o isolado que não foi identificado pela solução de EDTA 0,5M foi identificado pelo 2-MPA. Com base nesses resultados, o uso conjunto da solução de EDTA 0,5M e do 2-MPA pode ser utilizado para a detecção dos isolados suspeitos de produzir M β L, pois os testes utilizando esses agentes quelantes resultam halos de inibição claros e de fácil interpretação.

Entre os substratos utilizados para a identificação dos isolados produtores de M β L, o imipenem e a ceftazidima são os mais preconizados, no entanto, há estudos que utilizam o meropenem. Em nosso estudo, os substratos utilizados foram imipenem e ceftazidima, sendo que a ceftazidima foi o substrato que apresentou o melhor desempenho detectando todos os isolados produtores de M β L. As distâncias entre os discos dos substratos e o disco de papel filtro onde foi adicionado o agente quelante foram de 1cm para as soluções de EDTA e 1,5-2,0cm para o 2-MPA; essas distâncias se mostraram adequadas para a identificação de M β L.

Pelo estudo de ARAKAWA *et al.* (2000) o melhor substrato foi a ceftazidima e o 2-MPA resultou em halos de inibição de fácil interpretação, enquanto que a solução de EDTA 0,1M resultou em uma fraca zona de inibição de difícil interpretação. Para LEE *et al.* (2001) a solução de EDTA 0,5M obteve melhor desempenho na identificação dos isolados produtores

de M β L, enquanto que o melhor substrato foi o imipenem, pois a ceftazidima demonstrou baixa especificidade. Os resultados deste estudo estão parcialmente de acordo com ARAKAWA *et al.* (2000) e LEE *et al.* (2001).

O teste do disco combinado de imipenem+EDTA 0,5M foi realizado para efeito comparativo com a metodologia de disco aproximação. Todos os isolados produtores de M β L foram identificados por esta metodologia também. Como controle negativo da metodologia do disco combinado foram selecionadas 11 amostras aleatórias entre as 62 cepas consideradas M β L negativas. Através desta metodologia dois isolados de *A. baumannii* foram identificados como produtores de M β L. No entanto, há relatos na literatura de isolados de *A. baumannii* identificados como produtores de M β L pelas metodologias fenotípicas e a análise genotípica identificar a produção de oxacilinas (SEGAL, 2005). Portanto, para a correta identificação desses isolados seria necessário a realização de técnicas genotípicas. Por outro lado, a metodologia do disco combinado é de fácil execução e interpretação, portanto é adequada para o emprego na rotina laboratorial. Além disso, os discos podem ser preparados antes do uso e armazenados a -20°C sem perda da sua atividade (YONG, 2002). ANDRADE *et al.* (2007) avaliaram a preparação dos discos e os substratos ceftazidima e imipenem com vários inibidores de M β L. A melhor combinação encontrada naquele estudo foi imipenem+EDTA, quanto à preparação dos discos, tanto os discos armazenados quanto os discos onde o EDTA é adicionado no momento do teste devem ser interpretados com cautela, pois resultados variam dependendo do substrato utilizado. O método do disco combinado é mais adequado para a detecção de isolados com sensibilidade aos carbapenens, mas portadores do gene para M β L do que o teste de disco aproximação (FRANKLIN, 2006). Em adição, a metodologia do disco combinado parece ser adequada também para a detecção de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de M β L (PETROPOULOU, 2006).

Com determinação da CIM observamos o alto grau de resistência do isolados analisados neste estudo. O encontro de 7 isolados resistentes a polimixina B é de grande preocupação, pois este antimicrobiano é uma das últimas alternativas terapêuticas para o tratamento de isolados MDR. Isolados com resistência reduzida a polimixina B tem sido relatados em diversas partes do mundo (LANDMAN, 2005; LI, 2006). No Brasil, há um relato de 5 isolados de *A. baumannii* resistente a polimixina B encontrados no Complexo Hospital São Paulo (REIS, 2003). Uma das razões para o aparecimento desses isolados é a pressão seletiva e a disseminação clonal (REIS, 2003).

O conhecimento dos principais fatores de risco de uma instituição é de grande importância para o delineamento da terapia empírica adequada e para evitar a pressão seletiva. Os principais fatores de risco para a aquisição de isolados MDR e produtores de M β L para os pacientes internados no HUSM foram: idade avançada, doença neurológica, longos períodos de internação e a exposição a antimicrobianos. Dos pacientes aos quais se teve acesso aos prontuários 24 (40,68%) foram a óbito.

Os principais fatores de risco variam de uma instituição para outra como pode ser evidenciado em vários estudos realizados em diferentes regiões geográficas. Em um hospital universitário coreano, onde foram avaliados os principais fatores de risco para mortalidade entre 136 pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*, a média de idade foi de 55 anos e a principal doença de base foi a presença de tumores sólidos. A terapia antimicrobiana incorreta foi apontada como um dos fatores de risco para mortalidade, dos 136 pacientes avaliados, 53 morreram (KANG, 2003). Em Israel, a média de idade dos pacientes foi de 65 anos, os antimicrobianos mais utilizados foram às penicilinas, agentes anti-pseudomonas e aminoglicosídeos, sendo que 20,61% dos pacientes foram a óbito (ALOUSH, 2006). Na Austrália, os principais fatores de risco estavam relacionados com a exposição aos carbapenens e ao tempo de internação dos pacientes, dos 16 pacientes daquele estudo, seis foram a óbito (PELEG, 2005). A exposição aos carbapenens é apontada por HIRAKATA *et al.* (2003) como um dos principais fatores de risco para o aparecimento de isolados produtores de M β L, juntamente com longos períodos de internação e a administração de agentes anti-neoplásicos ou corticóides. Na Albânia, os principais fatores de risco encontrados foram: idade avançada, longos períodos de internação, pacientes em CTI com ventilação mecânica, severidade da doença e exposição prévia a agentes anti-pseudomonas (LODISE, 2007). Nos hospitais brasileiros o principal fator de risco encontrado foi à exposição a antimicrobianos, em especial a exposição a quinolonas, no entanto, o mecanismo pelo qual a exposição a um antimicrobiano específico predispõe ao desenvolvimento de um mecanismo de resistência é pouco conhecido (NOUÉR, 2005; ZAVASCKI, 2005; ZAVASCKI, 2006).

Isolados produtores de M β L estão relacionados com altas taxas de mortalidade e falha na resposta terapêutica, portanto, a identificação destes microrganismos é de grande importância a nível nosocomial. Além disso, disseminação deste mecanismo de resistência no ambiente hospitalar resultaria em uma condição desastrosa para a terapia antimicrobiana, pois não há perspectivas de novas opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por microrganismos MDR nos próximos anos. Medidas de controle de infecção hospitalar,

incluindo o uso racional de antimicrobianos e o isolamento dos pacientes colonizados e/ou infectados por microrganismos produtores de M β L ou apresentando outros mecanismos de resistência, são de grande importância para prevenir o aparecimento e a disseminação destes isolados no ambiente hospitalar.

6 – CONCLUSÕES

- ü Evidenciou-se um elevado número de isolados de *A. baumannii* MDR no HUSM, sendo que foram encontrados isolados de *P. aeruginosa* produtora de M β L.
- ü O perfil de sensibilidade predominante para os isolados de *P. aeruginosa* foi o de sensibilidade apenas a polimixina B, enquanto que para os isolados de *A. baumannii* a resistência a todos os antimicrobianos avaliados foi dominante. Entre os isolados produtores de M β L a sensibilidade a polimixina B e ao aztreonam foi encontrado na maioria dos isolados.
- ü As duas metodologias fenotípicas utilizadas para a identificação de isolados produtores de M β L (disco aproximação e disco combinado) apresentaram um desempenho similar. No entanto, a metodologia do disco combinado é mais prática para a rotina laboratorial.
- ü Para a metodologia de disco aproximação, os agentes quelantes, EDTA 0,5M e o 2-MPA, e ceftazidima, como substrato, produziram nítidos halos de fácil leitura e interpretação dos resultados. As distâncias de 1cm para o EDTA e de 1,5 a 2cm para o 2-MPA foram adequadas para este teste.
- ü Houve uma boa compatibilidade entre as metodologias de disco aproximação e microdiluição.
- ü Os testes de microdiluição em caldo evidenciaram o alto nível de resistência dos isolados analisados, identificando 7 isolados resistentes a polimixina B.
- ü Os principais fatores de risco para a aquisição de isolados MDR no HUSM foram: doença neurológica, longos períodos de internação, permanência na CTI e a exposição a antimicrobianos, principalmente a carbapenêmicos, aminoglicosídeos e vancomicina.

7 - REFERÊNCIAS

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (ed). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 1ª Ed. San Diego: Academic Press, 576 p., 1998.

ALOUSH, V. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.1, p.43-48, 2006.

AMBLER, R.P. The structure of β -lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v.289, n.36, p.321-331, 1980.

ANDRADE, S. S., et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.142-141, 2003.

ANDRADE, S. S. et al. Influence of disk preparation on detection of metallo- β -lactamase-producing isolates by the combined disk assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.2058-2060, 2007.

AOKI, S. et al. Virulence of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.5, p.1876-1878, 2004.

ARAKAWA, Y. et al. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, n.7, p.1612-1615, 1995.

ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.38, n.1, p.40-43, 2000.

ARROYO, L. A. et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 903-905, 2005

AVISON, M. B. et al. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.2, p.413-419, 2001.

BAHAR, G. et al. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.282-283, 2004.

BANDO, K. et al. Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.35, n.2, p.371-372, 1991.

BELLAIS, S. et al. Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.7, p.1878-1886, 2000a.

BELLAIS, S. et al. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v.44, n.11, p.3028-3034, 2000b.

BELLAIS, S., NAAS, T.; NORDMANN, P. Genetic and biochemical characterization of CGB-1, an Ambler class B carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Chryseobacterium gleum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.9, p.2791-2796, 2002a.

BELLAIS, S. et al. Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.2032-2034, 2002b.

BENNETT, P. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.1-4, 1999.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E., TOWNER. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p.148-165, 1996.

BOSCHI, L. et al. The *Legionella (Fluoribacter) gormanii* metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.6, p.1538-1543, 2000.

BOUNAGA, S. et al. Cysteinyll peptide inhibitors of *Bacillus cereus* zinc β -lactamase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.9 n.2, p.503-510, 2001.

BUSH, K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n.1, p.109-123, 1988.

BUSH, K. Characterization of β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.33, n.3, p.259-263, 1989.

BUSH, K.; JACOBI, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.

BUSH, K. Metallo- β -lactamases: A class apart. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, supp.1, p.S48-S53, 1998.

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p. 1085-1089, 2001.

CARDOSO, O. et al. Metallo- β -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. **Microbiol Drug Resistance**, v.8, n.2, p.93-97, 2002.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4654-4661, 2004.

CATCHPOLE, C. R. et al. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.39, p.255-260, 1997.

CHEN, Y. et al. β -lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. **Journal Bacteriology**, v.185, n.3, p.823-830, 2003.

CHU, Y. W. et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.3, p.710-714, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI – formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS).. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; seventeenth Informational Supplement**. M100-S17, M2A9, v.27, n.1, 2007.

CONCHA, N. O. et al. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. **Structure**, v.4, p.823-836, 1996.

CORNAGLIA, G. et al. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- β -lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.1119-1125, 2000.

CRESPO, M. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. **Journal of clinical Microbiology**, v.42, n.11, p.5094-5101, 2004.

CROWDER, M. W. et al Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, n.4, p.921-926, 1998.

CUCHURAL, G. J.; MALAMY, M.H.; TALLY, F.P. β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.30, n.5, p.645-648, 1986.

DOCQUIER, J. D. et al. CAU-1, a subclass B3 metallo- β -lactamase of low substrate affinity encoded by an ortholog present in the *Caulobacter crescentus* chromosome. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1823-1830, 2002.

DOCQUIER, J. D. et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, n.5, p.1522-1528, 2003.

DOCQUIER, J. D. et al. Biochemical characterization of the THIN-B metallo- β -lactamase of *Janthinobacterium lividum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4778-4783, 2004.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polylyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n.1, p. 1333-1341, 2005.

FIETT, J. et al. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, n.3, p.880-886, 2006.

FILHO, L. S. et al. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.4, p. 291-296, 2002.

FILHO, L. S. et al. Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamases isoladas em João Pessoa/PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.35, n.3, p.127-131, 2003.

FRANKLIN C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A. Y. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p.3139-3144, 2006.

FRITSCHÉ, T. R. et al. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.S276-S278, 2005.

FUJII, T. et al. Biochemical properties of β -lactamase produced by *Legionella gormanii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.29, n.5, p.925-926, 1986.

GALES, A.C. et al. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.1, p.13-20, 2002.

GALES, A. G. et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.45, p.77-79, 2003a.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.699-702, 2003b.

GALLENI, M. et al. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.3, p.660-663, 2001.

GARAU, G. et al. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.7, p.2347-2349, 2004.

GARAU, G. et al. A metallo- β -lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. **Journal of Molecular Biology**, v.345, p.785-795, 2005.

GASPARETO, P. B. et al. Occurrence of BLA_{SPM-1} and BLA_{IMP-1} genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.108-109, 2007.

GIAKKOUPI, P. et al. VIM-1 metallo- β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3893-9896, 2003.

GIBB, A. P. et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.1, p.255-258, 2002.

GISKE, C. G.; RYLANDER, M.; KRONVALL, G. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.9, p.3034-3035, 2003.

HANNOND, G.G. et al. Inhibition of IMP-1 metallo- β -lactamase and sensitization of IMP-1-producing bacteria by thioester derivatives. **FEMS Microbiology Letters**, v.179, n.2, p.289-296, 1999.

HANSON, N. D. et al. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- β -lactamase, IMP-18. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, n.6, p.2272-2273, 2006.

HAWKEY, P. M. et al. Occurrence of a new metallo- β -lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the people's republic of China. **FEMS Microbiology Letters**, v.194, n.1, p.53-57, 2001.

HEMALATHA, V.; SEKAR, U.; KAMAT, V. Detection of metallo β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients. **Indian Journal Medical Research**, p. 148-152, 2005.

HIRAKATA, Y. et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, n.8, p.2006-2011, 1998.

HIRAKATA, Y. et al. Clinical and bacteriology characteristics of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p. 26-32, 2003.

HO, S. E. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia producing IMP-7 β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.10, p.3286-3287, 2002.

HUSSAIN, M. et al Cloning and sequencing of the metallothioprotein β -lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.164, n.1, p.223-229, 1985.

IACONIS, J. P.; SANDERS, C. C. Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.34, n.1, p.44-51, 1990.

IKONOMIDIS, A. et al Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.10, p.5344-5347, 2005.

ITO, H. et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, n.4, p.824-829, 1995.

IYOBE, S. et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.8, p.2023-2027, 2000.

IYOBE, S. et al. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP 10, from two unrelated Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes xylosoxidans* strain. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.6, p.2014-2016, 2002.

JEONG, S. H. et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.397-400, 2003.

JONES, R. N. et al. Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, p.77-84, 2005.

KANG, C. I. et al *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.745-751, 2003.

KATRAGKOU, A.; ROILIDES, E. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with colistin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4916-4917, 2005.

KIMURA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.51, p.241-244, 2005a.

KIMURA, S. et al. Clonal diversity of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.458-461, 2005b.

KOH, T. H.; WANG, G. C. Y.; SNG, L.H. IMP-1 and a novel metallo- β -lactamase, VIM-6, in fluorescent *Pseudomonas* isolated in Singapore. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.6, p.2334-2336, 2004.

KTARI, S. et al. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo- β -lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase, and CMY-4 AmpC- β -lactamase in a Tunisian University Hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, n.12, p.4198-4201, 2006.

KUWABARA, S.; ABRAHAM, E.P. Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. **Biochemical Journal**, v. 103, p. 27c-30c, 1967.

LAGATOLLA, C. et al. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- β -lactamase determinants in European hospital. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.3, p.535-538, 2004.

LAHEY CLINIC. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>. Acesso em: 15 out. 2007.

LANDMAN, D. et al. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.954-957, 2005.

LARTIGUE, M. F.; POIREL, L.; NORDMAN, P. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an *Enterobacteriaceae* isolate in France. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4929-4930, 2004.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, n.7, p.1584-1590, 1999.

LAUPLAND, K.B. et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Importance of metallo- β -lactamase (MBL) – producing strains. **The Journal Infectious Diseases**, v.192, p.1606-1612, 2005.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 87-91, 2001.

LEE, K. et al. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.7, p.868-871, 2003a.

LEE, K. et al. Evaluation of the Hodge test and the Imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4623-4629, 2003b.

LEE, K. et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.11, p.4485-4491, 2005a.

LEE, K. et al. Evaluation of Etest MBL for detection of *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 2, p. 942-944, 2005b.

LEVIN, A. S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**, v.28, p.1008-1011, 1999.

LI, J. et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, n.9, p.2946-2950, 2006.

LIBISCH, B. et al. Isolation of an integron-borne *bla*_{VIM-4} type metallo- β -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.9, p.3576-3578, 2004.

LINCOPAN, N. et al. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.516-519, 2005.

LIVERMORE, D. M. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p. 557-584,1995.

LODISE, T. P. et al. Clinical prediction tool to identify patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk for multidrug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.2, p.417-422, 2007.

LOMBARDI, G. et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.11, p.4051-4055, 2002.

LUZZARO, F. et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.2, p.648-650, 2004.

MAGALHÃES, V.; LINS, A. K.; MAGALHÃES, M. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.123-125, 2005.

MAMMERI, H.; BELLAIS, S.; NORDMANN, P. Chromosome-encoded β -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.11, p.3561-3567, 2002.

MARCHIARO, P. et al. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in nonfermentative Gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5648-5652, 2005.

MASSIDA, O.; ROSSOLINI, G. M.; SATTA, G. The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. **Journal of bacteriology**, v.173, n.15, p.4611-4617, 1991.

MAVROIDI, A. et al Carbapenm-hydrolysing VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, p.1037-1046, 2000.

MENDES, R. E. et al. Integron carrying a novel metallo- β -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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4693-4702, 2004a.

MENDES, R. E. et al. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.4, p.1433-1434, 2004b.

MICHALOPOULOS, A. S. et al. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: The renaissance of an old antibiotic. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.11, p.115-121, 2005.

MIGLIAVACCA, R. et al. Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4388-4390, 2002.

MIRIAGOU, V. et al. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, n.1, p.395-397, 2003.

MOLLARD, C. et al. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc β -lactamases. **The journal of biological chemistry**, v.276, n.48, p.45015-45023, 2001.

MURPHY, T. A. et al. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.2, p.582-587, 2003.

MURRAY, P. R. et al. *Microbiologia médica*. Ed. Guanabara Koogan, 4ªEd., 2004.

NAAS, T.; BELLAIS, S.; NORDMANN, P. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.267-273, 2003.

NAGANO, R. et al. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various β -lactamase, including class B metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, n.10, p.2497-2503, 1999.

NEUWIRTH, C. et al. First occurrence of an IMP metallo- β -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in a French isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.51, n.12 p.4486-4488, 2007.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.8, p. 321-331, 2002.

NOUÉR, S. A. et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.9, p.3663-3667, 2005.

OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.38, n.1, p.71-78, 1994.

OUDEKIRK, J. P. et al. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, n.8, p.2659-2662, 2003.

PAGANI, L. et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n.8, p.3824-3828, 2005.

PAGE, M. L. Understanding metallo- β -lactamase. **ASM News**, v.68, n.5, p.217-221, 2002.

PAGNIEZ, G. et al. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.38, p.33-37, 2006.

PASTERAN, F. et al. novel variant (*bla*_{VIM-11}) of the metallo- β -lactamase *bla*_{VIM} family in a GES-1 extend-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.1, p.474-475, 2005.

PATZER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.451-456, 2004.

PAUL-SOTO, R. et al. Mono- and binuclear Zn²⁺ - β -lactamase. **The Journal of Biology Chemistry**, v.274, n.19, p.13242-12249, 1999.

PAYNE, D. J. et al Rapid identification of metallo and serine β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.38, n.5, p. 991-996, 1994.

PAYNE, D. J. et al. Inhibition of metallo- β -lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivates . **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, n.1, p.135-140, 1997.

PAYNE, D. J. et al. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1880-1886, 2002.

PELEG, A. Y. et al. Emergence of IMP-4 metallo- β -lactamase in a clinical isolate from Australia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.699-700, 2004.

PELEG, A. Y. et al. Dissemination of metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP-4} among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1549-1556, 2005.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. Occurrence of a multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2420-2424, 2002.

PETROPOULOU, D. et al. Evaluation of imipenem/imipenem+EDTA disk method for detection of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures. **Microbiology Drug Resistance**, v.12, n.1, p.39-43, 2006.

PITOUT, J. D. D. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.7, p.3129-3135, 2005.

POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.4, p.891-897, 2000.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Acquired Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.3, p.117-127, 2002.

POIREL, L. et al. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.4, p.1406-1409, 2004.

POUNARAS, S. et al. Novel variant (*bla*_{VIM-4}) of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.12, p.4026-4028, 2002.

POUNARAS, S. et al. VIM-12 a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.12, p.5153-5156, 2005.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.10, supp. 4, p. 23-31, 2004.

PRATS, G. et al. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.3, p.932-933, 2002.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing- β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, n.2, p. 223-232, 1997.

REIS, A. O. et al. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.8, p.1025-1027, 2003.

RICCIO, M.L. et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.5, p.1229-1235, 2000.

RICCIO, M. L. et al. In70 of plasmid pAX22, a *bla*_{VIM-1}-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.4, p.1249-1253, 2001.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Bacilos Gram-negativos: Beta-lactamases. In:____. **Resistência bacteriana interpretando o antibiograma**. Ed. Atheneu, 2005. cap. 5, p. 65-93.

ROSSOLINI, G. M. et al. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile. **Biochemical Journal**, v.332, p.145-152, 1998.

ROSSOLINI, G. M. et al. Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.3, p.837-844, 2001.

ROSSOLINI, G. M. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p.1557-1558, 2005.

SAAVEDRA, M. J. et al. Sfh-I, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, n.7, p.2330-2333, 2003.

SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. **Biochemical Journal**, v. 98,p. 11c-13c, 1966.

SADER, H. S. et al. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.57-61, 2005a.

SADER, H. S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.1, p.73-76, 2005b.

SADER, H. S. Polimixinas: menos tóxicas e mais necessárias que imaginávamos. **Prática Hospitalar**, n. 46, p. 216-220, 2006.

SAINO, Y. et al Purification and properties of inducible penicillin- β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.22, n.4, p.564-570, 1982.

SARDELIC, S. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carryng VIM-2 metallo- β -lactamase determinants, Croatia. **Emerging Infections Diseases**, v.9, n.8, p.1022-1023, 2003.

SATO, K. et al. Biochemical properties of β -lactamase produced by *Flavobacterium odoratum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.27, n.4, p.612-614, 1985.

SEGAL, H.; ELISHA, B. G. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.598, 2005.

SENDA, K. et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, n.2, p.349-353, 1996a.

SENDA, K. et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.2909-2913, 1996b.

SHIBATA, N. et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5407-5413, 2003.

SIEMANN, S. et al. N-arylsulfonyl hydrazones as inhibitors of IMP-1 metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p.2450-2457, 2002.

SIEMANN, S. et al. Thiols as classical and slow-binding inhibitors of IMP-1 and other binuclear metallo- β -lactamases. **Biochemistry**, v.42, n.6, p.1673-1683, 2003.

SILVA, G.J.; LEITÃO, R. e PEIXE, L. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.2109-2110, 1999.

SILVA, D. J. et al. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **FEMS Microbiology Letters**, v.215, n.1, p.33-39, 2002.

SIMM, A. M. et al. A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. **FEBS Letters**, v.509, p.350-354, 2001.

TAKAHASHI, A. et al. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.526-529, 2000.

TAM, V. H. et al. Pharmacodynamics of polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.9, p.3624-3630, 2005.

TENOVER, F. C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, supp.3, p. S108-S115, 2001.

TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.673-679, 2002.

TOLEMAN, M. A. et al. Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.583-590, 2003.

TOLEMAN, M. A. et al. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.1, p.329-332, 2004.

TOLEMAN, M. A. et al. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.61-70, 2005.

TONEY, J. H. et al. Structure-activity relationships of biphenyl tetrazoles as metallo- β -lactamase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, n.18, p.2741-2746, 1999.

TONEY, J. H. et al. Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo- β -lactamase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.34, p.31913-31918, 2001.

TORRES, J.C.N., et al. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo- β -lactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.5, p.313-319, 2006.

TÓRTOLA, M. T. et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.8, p.3492-3494, 2005.

TSAKRIS, A. et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, p.1290-1292, 2000.

TYSALL, L. et al. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.215-224, 2002.

URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S.; RAHAL, J.J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infections Diseases**, v.36, p. 1268-1274, 2003.

VILLEGAS, M. V. et al. First detection of metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, n.1, p.226-229, 2006.

VOURLI, S. et al. Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene. **Clinical Microbiology and Infection**, v.22, n.7, p.691-694, 2006.

XIONG, J. et al. *bla*_{IMP-9} and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the people's republic of China. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.50, n.1, p.355-358, 2006.

WALSH, T. R. et al. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo- β -lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p.423-431, 1996.

WALSH, T. R. et al. Distribution and expression of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p.171-178, 1997.

WALSH, T. R. et al. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamase in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 8, p. 2755-2759, 2002.

WALSH, T. R. et al. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in eastern Europe: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.116-119, 2003.

WALSH, T. R. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005a.

WALSH, T. R. The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, supp.6 p. 2-9, 2005b.

WALTER, M.W. et al. Trifluoromethyl alcohol and ketone inhibitors of metallo- β -lactamases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.6, n.20, p. 2455-2458, 1996.

WALTER, W. W. et al. Hydroxamate inhibitors of *Aeromonas hydrophyla* AE036 metallo- β -lactamase. **Bioorganic Chemistry**, v.27, n.1, p.35-40, 1999.

WANG, Z.; BENKOVIC, S.J. Purification, characterization, and kinetic studies of a soluble *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase that provides multiple antibiotic resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.35, p.22402-22408, 1998.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.35, n.1, p.147-151, 1991.

WOODFORD, N. et al. Carbapenemases of *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution of *bla*B and characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*B3, in the type strain, NCTC 10016. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.6, p.1448-1452, 2000.

YAMAZOE, K. et al. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.11, p.2808-2810, 1999.

YAN, J. J. et al. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.8, p.2224-2228, 2001a.

YAN, J. J. et al. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.8, p.2368-2371, 2001b.

YAN, J. J. et al. Metallo- β -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*. **Journal of Microbial Chemotherapy**, v.50, p.503-511, 2002.

YANO, H. et al. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.5, p.1343-1348, 2001.

YONG, D. et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3798-3801, 2002.

YOTSUJI, A. et al. Properties of novel β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.24, n.6, p.925-929, 1983.

YUM, J. H. et al. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassette. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.837-840, 2002a.

YUM, J. H. et al. A new integron carrying VIM-2 metallo- β -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.42, n.3, p.217-219, 2002b.

ZAVASCKI, A. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.1148-1151, 2005.

ZAVASCKI, A. P. et al. The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p. 387-392, 2006.

8 - APÊNDICE

1 – Meios de cultura e materiais utilizados

Mueller Hinton Ágar

Fabricante: Himedia

FÓRMULA:

Beef, infusion from -----	300g
Casein acid hydrolusate -----	17,5g
Starch -----	1,5g
Ágar -----	17g

PROCEDIMENTO:

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante (38g para 1000mL). Esterilizar em autoclave (1g21°C, 1atm) por 15 minutos. Distribuir de 50 a 60mL para placas de Petri de 150mm e de 20 a 25mL para placas de Petri de 90mm. É de extremamente importante que o meio tenha espessura homogênea de 3 a 4mm.

MacConkey Agar

Fabricante: Acumédia

FÓRMULA:

Enzima digestiva de gelatina -----	17g
Enzima digestiva de caseína -----	1,5g
Enzima digestiva de tecido animal -----	1,5g
Lactose -----	1g
Mistura de sal biliar -----	1,5g
Cloreto de sódio -----	5g
Vermelho neutro -----	0,03g
Cristal violeta -----	0,001g
Agar -----	13,5g

PROCEDIMENTO:

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante (50g para 1000mL). Esterilizar em autoclave (1g21°C, 1atm) por 15 minutos e distribuir em placas Petri.

Caldo soja tripticaseína

Fabricante: Biobrás diagnósticos

FÓRMULA:

Peptona de caseína -----	17g
Peptona de soja -----	3,0g
Dextrose -----	2,5g
Cloreto de sódio -----	5,0g
Fosfato bifásico de potássio -----	2,5g

PROCEDIMENTO:

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante (30g para 1000mL). Esterilizar em autoclave (1g21°C, 1atm) por 15 minutos.

Caldo Mueller Hinton

Fabricante: Himedia

FÓRMULA:

Infusão de Bife -----	300g
Caseína Ácida Hidrolisada -----	17,50
Amido -----	1,50

PROCEDIMENTO:

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante (21g para 1000mL). Esterilizar em autoclave (1g21°C, 1atm) por 15 minutos.

Solução de EDTA 0,1M

Fabricante: Belga

EDTA PA (Sal Dissódico)

1mol EDTA = 372,24g

1M -----	1mol -----	1000mL
1M -----	372,24g -----	1000mL
0,1M -----	37,224g -----	1000mL
	X -----	50mL
	X = 1,8612g	

PROCEDIMENTO:

Preparar a solução e esterilizar em autoclave (1g21°C, 1atm) por 15 minutos.

Solução de EDTA 0,5M

Fabricante: Belga

EDTA PA (Sal Dissódico)

1mol EDTA = 372,24g

$$\begin{array}{rcl}
 1\text{M} & \text{-----} & 1\text{mol} & \text{-----} & 1000\text{mL} \\
 1\text{M} & \text{-----} & 372,24\text{g} & \text{-----} & 1000\text{mL} \\
 0,5\text{M} & \text{-----} & 186,12\text{g} & \text{-----} & 1000\text{mL} \\
 & & X & \text{-----} & 50\text{mL} \\
 & & X = 9,306\text{g} & &
 \end{array}$$

PROCEDIMENTO:

Preparar a solução e esterilizar em autoclave (1g21°C, 1atm) por 15 minutos.

Ácido 2-mercaptopropiônico

Fabricante: Merck

PROCEDIMENTO:

Adicionar 3µL do ácido sem diluir sobre o disco de papel filtro estéril.

2 – Diluição dos fármacos para a realização do CIM**Imipenem**

Fabricante: Eurofarma

Concentração 500mg

Reconstituição: 10mL de solução salina

Concentração final: 10,24mg/mL

$$\begin{array}{rcl}
 500\text{mg Imipenem} & \text{-----} & 10\text{mL} \\
 X & \text{-----} & 1\text{mL} \\
 X = 50\text{mg/mL} & & \\
 50\text{mg Imipenem} & \text{-----} & 1\text{mL} \\
 51,2\text{mg Imipenem} & \text{-----} & X \\
 X = 1,024\text{mL} & &
 \end{array}$$

PROCEDIMENTO:

Pipetar 1024µL do medicamento e colocar em balão volumétrico de 5mL.

Ceftazidima

Fabricante: Eurofarma

Concentração 1000mg

Reconstituição: 10mL de solução salina

Concentração final: 10,24mg/mL

1000mg Imipenem -----10mL

X ----- 1mL

$$X = 100\text{mg/mL}$$

100mg Imipenem ----- 1mL

51,2mg Imipenem ----- X

$$X = 0,512\text{mL}$$

PROCEDIMENTO:

Pipetar 520 μ L do medicamento e colocar em balão volumétrico de 5mL.

PolimixinaPotência: 81420 μ g/mLConcentração final: 1024 μ g/mL

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol (mL)} \times \text{Conc. } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mL})}$$

$$\text{Potência } (\mu\text{g/mL})$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{5\text{mL} \times 1024 \mu\text{g/mL}}{81420 \mu\text{g/mL}}$$

$$81420 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Peso (mg)} = 0,0629\text{mg}$$

PROCEDIMENTO:

Pesar 0,0629mg de polimixina e diluir em balão volumétrico de 5mL.