

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

MILENA POLOTTO

**Detecção de genes de beta-lactamases de amplo espectro em
Pseudomonas aeruginosa resistentes aos carbapenêmicos isoladas em São
José do Rio Preto – SP**

São José do Rio Preto

2010

MILENA POLOTTO

**Detecção de genes de beta-lactamases de amplo espectro em
Pseudomonas aeruginosa resistentes aos carbapenêmicos isoladas em São
José do Rio Preto – SP**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia, área de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mara Correa Lelles Nogueira
Professora Doutora
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Prof^a Dr^a Renata Cristina Picão
Professora Doutora
Universidade Federal de São Paulo – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Prof^a Dr^a Eleni Gomes
Professora Doutora
UNESP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 5 de março de 2010

Polotto, Milena.

Detecção de genes de beta-lactamases de amplo espectro em *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isoladas em São José do Rio Preto-SP / Milena Polotto. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

61 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mara Correa Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia médica. 2. Infecção hospitalar. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. Antibióticos beta-lactâmicos. I. Nogueira, Mara Correa Lelles. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.61

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais João Carlos e
Sonia pelo amor, dedicação e compreensão
durante todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Mara Corrêa Lelles Nogueira pela oportunidade, atenção e disposição em me orientar. Muito obrigada não apenas pela parte profissional, mas também pela amizade e pelo agradável convívio.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos e em todas as dificuldades de minha vida.

Às minhas amadas irmãs Adriana e Marina pelo carinho e união e ao Ricardo pelo amor e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira pela colaboração neste trabalho, por conceder-me uma bolsa técnica, fato muito importante para meu amadurecimento na pesquisa e por ceder o Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida pelas sábias palavras e conselhos em vários momentos.

Ao Tiago Casella por sua paciência, amizade e grande contribuição neste trabalho.

À Silvia Pereira Nunes, biomédica do laboratório de Virologia por sua grande amizade e sua infinita disponibilidade em auxiliar, principalmente no sequenciamento das amostras.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia da FAMERP Fernanda, Tatiana, Gisele, Lucely, Luana e Keith pelo auxílio na execução desse trabalho, pela amizade e por todos os bons momentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Ana Theresa, Lígia, Vinícius, Gislaine, Danilo, Adriano, Arieli, Carol, Aninha e Amanda pelos inúmeros momentos de descontração e pela agradável companhia.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia do Hospital de Base por terem gentilmente cedido as cepas de *P. aeruginosa*.

À Dr^a Renata Cristina Picão do Laboratório ALERTA pela gentileza e simpatia em esclarecer minhas dúvidas e por ceder importantes controles utilizados neste estudo.

À Dr^a Ana Cristina Gales do Laboratório ALERTA e ao Dr. Nilton Lincopan do Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas da Universidade de São Paulo por suas importantes colaborações.

Aos Professores e à Coordenação do Curso por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo imprescindível apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.....	3
2.2 Resistência aos Antimicrobianos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.3 Resistência aos Carbapenêmicos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.3.1 Carbapenemases em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.3.2 Metalo-beta-lactamases	7
2.4 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.5 Vigilância da Resistência.....	12
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo Geral.....	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Seleção e Manutenção das Cepas.....	15
4.2 Teste Fenotípico para a Confirmação da Produção de MβLs.....	16
4.3 Obtenção de DNA Genômico Bacteriano	16
4.4 Detecção de Genes de MβLs através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	17
4.4.1 Detecção do gene <i>bla</i> _{IMP-1}	17
4.4.2 Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1}	18
4.4.3 Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-1}	18
4.5 Detecção de Genes de ESBLs através de PCR	19
4.5.1 Detecção dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{GES}	19
4.5.2 Agrupamento dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} por RFLP.....	20
4.6 Purificação dos Produtos de PCR para Sequenciamento	20
4.7 Sequenciamento dos Genes <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{SPM} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{GES}	21

4.8 Avaliação da Similaridade Genética entre as Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (PFGE).....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Perfil <i>In Vitro</i> da Suscetibilidade aos Antimicrobianos	24
5.2 Análise Epidemiológica.....	25
5.3 Teste Fenotípico para a Confirmação da Produção de MβLs.....	26
5.4 Detecção e Identificação dos Genes de MβLs por PCR	28
5.5 Detecção dos Genes de ESBLs por PCR.....	31
5.6 Tipagem Molecular	37
5.6.1 Tipagem molecular das cepas carreadoras de <i>bla</i> _{SPM-1}	37
5.6.2 Tipagem molecular das cepas carreadoras de <i>bla</i> _{IMP-1} e <i>bla</i> _{CTX-M-2}	40
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Porcentagem de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos antimicrobianos.....	25
Figura 2.	Distribuição das amostras clínicas de <i>P. aeruginosa</i> por sítio anatômico.....	26
Figura 3.	Teste fenotípico para a confirmação fenotípica da produção de M β Ls.....	27
Figura 4.	Gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla</i> _{IMP-1}	28
Figura 5.	Gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla</i> _{SPM-1}	28
Figura 6.	Gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla</i> _{VIM-1}	29
Figura 7.	Gel de agarose mostrando a amplificação do gene <i>bla</i> _{CTX-M} e o seu perfil de restrição utilizando <i>Pst</i> I e <i>Pvu</i> II.....	32
Figura 8.	Gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla</i> _{GES}	32
Figura 9.	PFGE das cepas carreadoras de <i>bla</i> _{SPM-1}	38
Figura 10.	PFGE das cepas carreadoras de <i>bla</i> _{IMP-1} e de <i>bla</i> _{CTX-M-2}	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>“Primers”</i> utilizados no estudo.....	23
Tabela 2.	Resultados do teste de sensibilidade, do teste fenotípico e do teste genotípico para MβLs das cepas estudadas.....	35
Tabela 3.	Distribuição das cepas carreadoras de <i>bla</i> _{SPM-1} no HB.....	39
Tabela 4.	Distribuição das cepas carreadoras de <i>bla</i> _{IMP-1} e <i>bla</i> _{CTX-M-2} no HB.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

g – giros

Kb – Quilobases

pb - Pares de bases

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

mL – Mililitro

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

NaCl – Cloreto de Sódio

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol

AIM - “Australian Imipenemase”

ATCC - “American Type Culture Collection”

ATM - Aztreonam

AK – Amicacina

BGNNF - Bacilo Gram-negativo não-fermentador

BSA - “Bovine Serum Albumin”

CAZ - Ceftazidima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

Ciprofloxacina - CIP

CLSI - "Clinical and Laboratory Standards Institute"

CN - Gentamicina

CTX - Cefotaxima

DIM - "Dustch Imipenemase"

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxynucleoside Triphosphate

EDTA - Ácido etileno-diamino tetracético

ERIC-PCR - "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR"

ESBL - "Extended-spectrum beta-lactamase"

EDTA - Ácido etileno-diamino tetracético

FEP – Cefepime

GES - "Guiana extended-spectrum serine beta-lactamase"

HB - Hospital de Base

IMP - Imipenem

IPM - Imipenemase

KHM - "Kyorin University Hospital imipenemase"

KPC - "Klebsiella pneumoniae carbapenemase"

LBA - Lavado-bronco-Alveolar

LEV - Levofloxacina

MβLs - Metallo-beta-lactamases

MPA - Ácido mercaptopropiônico

MYSTIC - “Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection”

MEM - Meropenem

NDM - Nova Deli Imipenemase

PB - Polimixina B

PCR - “Polymerase chain reaction”

PFGE - “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

OprD - “Outer Protein D”

OXA - Oxacilinase

RAPD - “Random Amplification of Polymorphic DNA”

RFLP - “Restriction fragment length polymorphisms”

SENTRY - Antimicrobial Surveillance Program

SPM - São Paulo Metallo-Beta-Lactamase

SHV - “Sulphydryl variable”

SIM - Seul Imipenemase

TBE - Tris, EDTA, Ácido bórico e Água

TE - Tris, EDTA e Água

TEM - Temoriana

Tris - Hidroximetilaminometano

TSB - “Tryptic Soy Broth”

TZP - Piperacilina Tazobactam

UTI - Unidade Terapia Intensiva

UTI-E - Unidade Terapia Intensiva Emergência

UTI-G - Unidade Terapia Intensiva Geral

UTSI - Unidade Terapia Semi Intensiva

VIM - Verona Imipenemase

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não formador de esporos encontrado no solo, água, plantas e animais, incluindo os seres humanos, onde provoca infecções oportunistas. Infecções causadas por *P. aeruginosa* são de difícil tratamento devido a sua virulência e resistência a vários antimicrobianos. Os carbapenêmicos são geralmente ativos contra *P. aeruginosa* multirresistentes, mas as altas taxas de resistência a estas drogas estão se tornando comuns e podem indicar a produção de metalo-beta-lactamases (MβLs). O propósito deste estudo foi detectar e identificar, em cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos genes que codificam a produção de MβLs (bla_{SPM} , bla_{IMP} e bla_{VIM}) e ESBLs (bla_{CTX-M} e bla_{GES}), e avaliar a similaridade genética entre as cepas. Foram avaliadas sessenta cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isoladas de pacientes do Hospital de Base de São José do Rio Preto, no período de junho de 2009 a dezembro de 2009. Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com a padronização do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (2009) utilizando o método de disco-difusão. O teste fenotípico para a produção de MβLs foi realizado através do método de aproximação de discos, com os substratos ceftazidima e imipenem e com o inibidor de MβLs 2-MPA. A detecção dos genes de MβLs bla_{IMP} , bla_{VIM} e bla_{SPM} e de ESBLs bla_{CTX-M} e bla_{GES} foi realizada por PCR, e a identificação através de seqüenciamento. A avaliação da similaridade genética entre as cepas foi realizada nas amostras produtoras de MβL e ESBLs do tipo CTX-M através de PFGE. No teste de suscetibilidade por disco-difusão 98,3% (59/60) das cepas apresentaram resistência ao imipenem e 75% (45/60) ao meropenem. Polimixina B foi o único agente a inibir o crescimento de 100% das amostras. A amostra clínica mais frequente foi aspirado traqueal, correspondendo a 40% (24/60) do total. No teste fenotípico, quatorze cepas (23,3%) apresentaram resultado positivo. O gene bla_{SPM-1} foi detectado em 16,7% das cepas (10/60) e bla_{IMP-1} em 13,3% (8/60). O gene bla_{VIM} não foi detectado. Em relação aos genes de ESBLs, bla_{CTX-M} foi detectado em 21,7% das cepas (13/60) e bla_{GES} em 3,3% das cepas (2/60), sendo PHB59 carreadora de bla_{GES-1} e PHB64 carreadora de bla_{GES-5} . A análise da eletroforese em campo pulsado mostrou que as cepas carreadoras de bla_{SPM} estão geneticamente relacionadas e pertencem a um único pulsotipo (A). As cepas carreadoras de bla_{IMP-1} e bla_{CTX-M} pertencem a diferentes pulsotipos, havendo agrupamento de algumas cepas em um único pulsotipo (B). A ocorrência da transmissão horizontal de

cepas carreadoras tanto de *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{CTX-M} foi inferida através da observação do isolamento de cepas do mesmo pulstipo de diferentes pacientes. Esses resultados mostram que a produção de MβLs não é o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos apresentado por *P. aeruginosa* no HB, e reforçam a necessidade de revisão das medidas de controle da infecção na instituição.

Palavras-chaves: Metalo-beta-lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenêmicos, Infecção hospitalar, Resistência.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a versatile microorganism, with low nutritional demands and easy proliferation in culture medium. It's a Gram-negative bacillus, aerobic, non-sporulated and it can be isolated from soil, water, plants and animals, including humans. *P. aeruginosa* infections are hard to treat because of its virulence and resistance to various antimicrobials. Carbapenems are usually active against multiresistant *P. aeruginosa*, but high levels of resistance to these antibiotics are becoming common and it can indicate metallo-beta-lactamases presence (MβLs). The purpose of this study was to detect and identify, in *P. aeruginosa* strains, MβL and ESBL encoding genes (*bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{GES}) and to determine genetic similarity between the carrier strains. The study was done analyzing sixty *P. aeruginosa* strains resistant to carbapenems isolated at Hospital de Base de São José do Rio Preto, in the period of June/2009 to December/2009. The isolates were submitted to disc-diffusion susceptibility test, as standardized by the "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) (2009). The phenotypic test for MβL production was performed by means of the double disk synergy method, having ceftazidime and imipenem used as substratum and 2-MPA as an inhibitor. The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the MβLs genes (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}) and the ESBL genes (*bla*_{CTX-M} and *bla*_{GES}) and sequencing was carried out for their identification. The genetic similarity between the strains was evaluated in samples which were positive for MβLs and ESBLs genes using the PFGE technique. In disc-diffusion susceptibility test, 98,3% (59/60) of the strains were imipenem resistant and 75% (45/60) were meropenem resistant. All isolates were inhibited by Polymixin B. Tracheal aspirate were the most frequent isolated clinic specimen, with 40% (24/60) of total. Fourteen strains (23,3%) were positive in phenotypic test and in PCR, 16,7% (10/60) of the isolates were positive for *bla*_{SPM-1} and 13,3% (8/60) for *bla*_{IMP-1}. No *bla*_{VIM} gene were detected. The percentage of ESBL genes detected was 21,7% for *bla*_{CTX-M-2} and 3,3% for *bla*_{GES} (*bla*_{GES-1} in strain PHB59 and *bla*_{GES-5} in PHB 64). The PFGE analysis showed that all *bla*_{SPM-1} gene-carrying strains were genetically related (Pulsetype A), suggesting a horizontal transmission. The majority of the isolates carrying *bla*_{IMP-1} and *bla*_{CTX-M-2} were related genetically (Pulsetype B), but some of them were not. The horizontal transmission occurrence between the *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{CTX-M-2} carrier strains was inferred by observing that the same pulsotypes (A e B) were isolated from different patients. These

results show that M β L production is not the main resistance mechanism to carbapenems presented by *P. aeruginosa* at HB, and they increase the need for revising the infection-control measures in the institution.

Key-words: Metallo-beta-lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenems, Nosocomial infection, Resistance.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no mundo, principalmente em pacientes propensos devido à imunossupressão, rompimentos de barreiras físicas (queimaduras, cirurgias, danos oculares, procedimentos invasivos) e doenças de base, como o diabetes *mellitus* e a fibrose cística.

Os carbapenêmicos imipenem e meropenem são drogas de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por *P. aeruginosa*. Entretanto, a frequência de isolamento de cepas resistentes a estas drogas tem aumentado consideravelmente em todo o mundo e na América Latina, e, inclusive no Brasil, a prevalência das infecções por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos tem crescido mais rapidamente que em outras regiões.

A produção de carbapenemases é um mecanismo de resistência de grande importância em *P. aeruginosa*, pois cepas produtoras são resistentes não apenas ao imipenem e ao meropenem, mas também a outras drogas beta-lactâmicas usadas para o tratamento. Estas enzimas, codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, como integrons inseridos ou não em plasmídios têm disseminado rapidamente entre patógenos de importância clínica, como *P. aeruginosa*. Além disso, a disseminação de clones produtores de carbapenemases é um importante fator para o declínio da susceptibilidade a estas drogas. Esta realidade torna a detecção precoce de cepas produtoras de carbapenemases uma importante tarefa para os laboratórios clínicos de todo o mundo, pois a prescrição correta dos antimicrobianos influencia o sucesso do tratamento e auxilia na redução dos índices de infecção.

O Laboratório de Microbiologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) isola com alta frequência cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e/ou meropenem.

Esta realidade pode ser explicada pelas características do hospital, que realiza procedimentos de alta complexidade, como transplantes de rim, fígado, medula óssea e córnea, cirurgia cardíaca, neurocirurgia, atendimento ao trauma, entre outros. Além disso, é o único hospital de referência para o tratamento de AIDS e fibrose cística na região.

Os mecanismos responsáveis pela significativa resistência aos carbapenêmicos apresentada por *P. aeruginosa* isoladas no HB não são conhecidos. Acreditamos que os

dados gerados por este estudo serão úteis para o melhor conhecimento da epidemiologia da resistência aos carbapenêmicos em nossa instituição e no Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa* e as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não-fermentador da glicose, pertencente à família Pseudomonaceae. É uma espécie estritamente aeróbia, que obtém energia através do metabolismo oxidativo dos carboidratos, móvel por um único flagelo polar. Cresce em temperaturas que variam de 5°C a 42°C, sendo 37°C a temperatura ideal para seu crescimento. Produz pigmentos fluorescentes difusíveis (pioverdina e piocianina) e, algumas cepas podem produzir pigmentos vermelho-escuros ou pretos, que recebem o nome de piorrubina e piomelanina. (KISKA & GILLIGAN, 2003; MURRAY, 2003). Ubíquo na natureza é encontrado no solo, água, plantas e animais, incluindo os seres humanos. Multiplica-se com poucas exigências nutricionais, com proliferação favorável em vários meios de cultura, sem necessidade de fatores orgânicos de crescimento, sendo inclusive capaz de sobreviver em água destilada (ADACHI et. al., 2009; POLLACK, 2000). Possui um dos maiores genomas entre os procariotos e codifica grande quantidade de proteínas envolvidas nas funções de regulação, transporte e virulência, o que explica a alta capacidade adaptativa dessa espécie (WOODS, 2004).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista, que apresenta resistência inata a muitos anti-sépticos e antibióticos, além de possuir extrema habilidade em adquirir resistência aos tratamentos antimicrobianos (HOBAN, 2003; DEPLANO, 2005). É amplamente disseminado através das mãos de profissionais de saúde e fômites contaminados (WIDMER et al., 1993; POLLACK, 2000), o que contribui para sua prevalência como um importante agente etiológico de infecções relacionadas à assistência à saúde em todo o mundo.

Há grupos de pacientes propensos à infecção por *P. aeruginosa*: os imunossuprimidos e os predispostos às infecções por quebra de barreiras físicas (queimaduras, cirurgias, danos oculares). Entretanto, a grande mortalidade por esse patógeno é observada em pacientes com alguma doença de base, como a fibrose cística, pois são expostos repetidamente a antibióticos, induzindo a pressão seletiva e hipermutabilidade nessas cepas (LIVERMORE, 2009; LEE et al., 1999). Outros fatores de risco para a aquisição de *P. aeruginosa* são ventilação mecânica, idade avançada, uso de cateter venoso central ou urinário, diabetes *mellitus*, hospitalização prolongada e uso

prévio de antimicrobianos (BARTH & PITT, 1998; GIAMARELLOU & KANELLAKOPOULOU, 2008).

Estudos realizados em vários países mostram a importância de *P. aeruginosa* como agente de infecções relacionadas à assistência à saúde. Nos Estados Unidos, Lockhart e colaboradores (2007) encontraram *P. aeruginosa* como espécie mais prevalente (22,2%) nas infecções causadas por bacilos Gram-negativos em unidades de terapia intensiva, sendo seguida de *Escherichia coli* (18,8%) e *Klebsiella pneumoniae* (14,2%). No Brasil, *P. aeruginosa* é causa frequente de infecções relacionadas à assistência à saúde, variando de primeira causa em infecções do trato respiratório inferior, segunda em infecções de ferida operatória e do trato urinário e quinta em bacteremias (SADER et al., 2001). Em estudo do programa MYSTIC realizado por Kiffer e colaboradores (2005) onde foram investigadas infecções causadas por bactérias Gram-negativas em vinte hospitais brasileiros concluiu que *P. aeruginosa* foi a espécie prevalente com (30,3%).

Em unidades de terapia intensiva cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes são agentes comuns de infecções (SATOH et al., 2008; CEZARIO et al., 2009; CRIVARO et al., 2009), e as altas taxas de prevalência deste patógeno assim como a alta resistência aos antimicrobianos tem dificultado a escolha da terapêutica. Infecções causadas por cepas multirresistentes estão relacionadas à grande morbi-mortalidade e são de difícil controle, ocasionando maior tempo de internação hospitalar e alto custo com exames e medicamentos (MARTINS, 2002).

2.2 Resistência aos Antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa*

Nos últimos cinquenta anos, descritos como a era dos antibióticos, surgiu uma grande diversidade de drogas antimicrobianas, que alteraram drasticamente a história da medicina e permitiram o tratamento de infecções antes fatais. Infelizmente, os benefícios trazidos por estas drogas foram acompanhados pelo surgimento da resistência aos antimicrobianos em várias espécies de bactérias patogênicas (MOELLERING, 1998), o que dificulta o tratamento pela limitação das opções terapêuticas (ALEKSHUM & LEVY, 2007).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser resultado de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é uma característica natural de determinados grupos de bactérias, sendo espécies ou gênero-específica. Provém da herança

genética do microrganismo, sendo transmitida verticalmente às células-filhas. A resistência adquirida ocorre quando as bactérias naturalmente sensíveis tornam-se resistentes, devido à aquisição de genes de resistência decorrente da transferência de material genético, ou de mutações em genes cromossômicos (GOLD & MOELLERING, 1996).

Nos últimos anos tem sido observado um importante aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (SLAMA, 2008). Esta bactéria possui grande capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência e cepas multirresistentes apresentam uma combinação de mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência que lhes conferem resistência a pelo menos três classes de drogas (NORDMANN et al., 2007).

A baixa permeabilidade da membrana externa a determinadas drogas, a produção de beta-lactamases cromossômicas tipo AmpC e a presença constitutiva de bombas de efluxo são mecanismos intrínsecos de resistência responsáveis pela resistência natural desta espécie às penicilinas de espectro restrito, cefalosporinas de primeira e segunda geração, trimetoprim e sulfonamidas. Opções terapêuticas são as penicilinas ticarcilina e piperacilina e as cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima e cefepima), aztreonam, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (SPIEGEL, 2005).

Alguns dos mecanismos de resistência adquiridos são a produção de beta-lactamases de diferentes classes moleculares, de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, a perda de porinas (proteínas OprD) devido à mutação e a hiperexpressão de bombas de efluxo (LIVERMORE, 2002; BONOMO & SZABO, 2006; STRATEVA & YORDANOV, 2009). Cepas panresistentes combinam diversos destes mecanismos e são resistentes praticamente todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis, exceto a colicistina e a polimixina B, este último, um agente antimicrobiano catiônico altamente tóxico (ZAVASCKI et al., 2007; MICHALOPOULOS & FALAGAS, 2008).

2.3 Resistência aos Carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa*

A resistência aos beta-lactâmicos em *P. aeruginosa* é um sério problema clínico, pois estas drogas são as mais comumente utilizadas entre os agentes antimicrobianos. Os carbapenêmicos, por possuírem amplo espectro de atividade e serem estáveis à maioria das beta-lactamases são uma importante opção terapêutica para as infecções graves causadas

por *P. aeruginosa* multirresistentes (KATTAN et al., 2008). São utilizados o imipenem e o meropenem, pois o ertapenem, apesar de seu amplo espectro de ação, apresenta atividade limitada sobre *P. aeruginosa* (SHAH & ISAACS, 2003).

Devido à ampla utilização no ambiente hospitalar, subpopulações com sensibilidades diminuídas ou resistentes aos carbapenêmicos têm sido selecionadas, e a frequência de *P. aeruginosa* resistentes a estas drogas tem aumentado consideravelmente (MALTEZOU, 2008). Infecções causadas por cepas resistentes têm sido descritas na Europa (SOULI et al., 2008), Estados Unidos (MCGOWAN, 2006), América Latina (ANDRADE et al., 2003) e na Ásia (TURNIDGE et al., 2002).

Em países da América Latina a resistência em *P. aeruginosa* tem aumentado significativamente em um curto período de tempo, sendo que neste continente a prevalência de resistência a carbapenêmicos tem crescido mais rapidamente que em outras regiões do mundo (GALES et al., 2006). No Brasil, de 26 a 31% das amostras de *P. aeruginosa* são resistentes ao imipenem e meropenem, respectivamente (SILVA et al., 2007), e em alguns hospitais brasileiros, de 15 a 35% das amostras isoladas de infecções são consideradas panresistentes (SADER et al., 1999; GALES et al., 2000).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* é causada pelos seguintes mecanismos: hiperexpressão de sistemas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana à droga mediada pela perda ou diminuição da expressão de porinas, alteração das proteínas ligadoras de penicilinas e produção de enzimas inativadoras (STRATEVA & YORDANOV, 2009). A perda de uma porina específica, a OprD, devido a mutação no gene *oprD*, que codifica porinas com reduzida afinidade pelo imipenem é considerada uma importante causa de resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2009), e cepas mutantes são frequentemente selecionadas durante a terapia com a droga (LIVERMORE, 2009). A resistência ao meropenem é relatada como consequência da hiperexpressão do sistema de efluxo MexAB-OprM (HAMMAMI et al., 2009). Entretanto, diferentes mecanismos podem ocorrer simultaneamente ou em diversas combinações em uma cepa, e a diversidade de mecanismos de resistência apresentados por cada cepa está associada ao fenótipo de resistência, com variações na redução da susceptibilidade ao imipenem e meropenem (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2009).

A produção de carbapenemases, enzimas que inativam os carbapenêmicos, é um mecanismo de resistência emergente. O progressivo aumento na identificação de cepas produtoras, assim como da diversidade de enzimas tem apontado para a importância deste

mecanismo como causa da redução utilidade clínica do imipenem e meropenem para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* (LIVERMORE, 2002; HAWKEY & JONES, 2009).

2.3.1 Carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa*

As beta-lactamases são enzimas capazes hidrolisar os antibióticos beta-lactâmicos através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel beta-lactâmico, gerando compostos sem atividade antimicrobiana (BUSH, 2001). Vários sistemas de classificação para as beta-lactamases foram propostos, mas atualmente utiliza-se a combinação das características estruturais e funcionais das beta-lactamases: a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1991) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995). A classificação molecular de Ambler baseia-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, e reconhece quatro classes, designadas de A a D. As enzimas das classes A, C e D contêm serina em seu sítio ativo; as enzimas da classe B são representadas pelas metaloenzimas, contendo zinco no sítio ativo. A classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das beta-lactamases, e é dividida em diferentes subgrupos.

As carbapenemases, enzimas que degradam os beta-lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, fazem parte de um grupo heterogêneo de beta-lactamases; sendo conhecidas as enzimas da classe A de Ambler (subgrupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros), classe B de Ambler (subgrupos 3a, 3b e 3c de Bush-Jacoby-Medeiros) e classe D de Ambler (grupo 2 de de Bush-Jacoby-Medeiros). As carbapenemases encontradas em *P. aeruginosa* até o presente serão discutidas a seguir.

2.3.2 Metallo-Beta-lactamases

Na classe B de Ambler estão as metalo-beta-lactamases (MβLs), carbapenemases que possuem atividade hidrolítica dependente da interação da droga com o íon zinco no sítio ativo da enzima (NORDMANN & POIREL, 2002; QUEENAN & BUSH, 2007). As MβLs constituem o grupo de carbapenemases de maior importância clínica por apresentarem atividade hidrolítica não somente sobre os carbapenêmicos, mas também

sobre penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e oxacefamicinas e não serem inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam (BUSH, 1998; LARAKI et al., 1999).

Atualmente são conhecidas dez subclasses de MβL adquiridas: IMP (imipenemase) (OSANO et al., 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et al., 1999), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al., 2005), AIM (Australian imipenemase) (YONG et al., 2007), KHM (Kyorin University Hospital imipenemase) (SEKIGUCHI et al., 2008), NDM (Nova Deli imipenamase) (YONG et al., 2009), DIM (Dutsch imipenamase) (POIREL et al., 2009) e TMB (Tripoli metalo-beta-lactamase) (SALABI et al., dados não publicados).

A primeira MβL descrita foi IMP-1, encontrada em uma cepa de *Serratia marcescens* no Japão (OSANO et al., 1994), onde estas enzimas apresentam uma alta prevalência. Atualmente, as MβLs tipo IMP são encontradas em outros países da Ásia, na Austrália, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Itália, Portugal e Brasil, em diversas espécies de enterobactérias e BGNNF (MALTEZOU et al., 2008).

Diferentes nomenclaturas são empregadas para as MβLs adquiridas mostrando notável divergência nas sequências. O mesmo nome, com diferentes números no sufixo, tem sido designado às variantes alélicas de cada linhagem, que diferem umas das outras por substituições de aminoácidos (CORNAGLIA et al., 2007). Assim, várias variantes alélicas diferentes de IMP têm sido descritas e podem ser divergentes entre si em até 22% em nível de estrutura primária (ROSSOLINI & DOCQUIER, 2007). O grupo IMP compreende 26 tipos designados IMP-1 a IMP-26 (<http://www.lahey.org/studies/>). IMP-1 hidrolisa cefalosporinas de terceira e quarta gerações (cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima), carbapenêmicos (imipenem, meropenem) e não é inibida por ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (POIREL & NORDMANN, 2002).

A enzima VIM-1 foi encontrada inicialmente em *P. aeruginosa*, em Verona, na Itália (LAURETTI et al., 1999), mas atualmente encontra-se disseminada em países da Europa, América do Sul, América do Norte, Austrália, Índia, Coreia e Irã (MALTEZOU et al., 2008). O perfil de hidrólise de VIM-1 é típico das beta-lactamases da classe B, ocasiona um significativo declínio da suscetibilidade aos beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Apenas aztreonam, resistente a todas as MβLs, não é hidrolisado. Como em *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} também está inserido em integrons de classe 1 (POIREL & NORDMANN, 2002). Existem várias variantes alélicas de VIM

descritas e podem ser divergentes entre si em até 27% em nível de estrutura primária (ROSSOLINI & DOCQUIER, 2007). Enzimas do tipo VIM compreendem 23 tipos designados VIM-1 a VIM-23 (<http://www.lahey.org/studies/>).

Há significantes diferenças na capacidade de hidrólise entre os diferentes grupos de MβLs (HELFAND & BONOMO, 2005). Dentre as MβLs do grupo VIM, VIM-1 hidrolisa ceftazidima, piperacilina e meropenem mais eficientemente que VIM-2, diferença que pode ocorrer devido à substituição de dois aminoácidos (na posição 224 há substituição de histidina por tirosina e, na posição 228, serina por arginina) ambos próximos ao sítio ativo da proteína (DOCQUIER et al., 2003).

A enzima SPM-1 foi inicialmente descrita em uma amostra clínica de *Pseudomonas aeruginosa* isolada em um hospital em São Paulo (TOLEMAN et al., 2002). SPM é uma enzima distinta de IMP e VIM, não está localizada em integrons e representa uma nova subfamília de MβLs que hidrolisam preferencialmente as cefalosporinas (TOLEMAN et al., 2002; ZAVASKI et al., 2005; BONOMO & SZABO, 2006). O gene *bla_{SPM}* está localizado no cromossomo bacteriano e a maioria dos surtos de infecção por *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 são causados por um único clone (WALSH, 2008).

O gene que codifica SPM-1 parece ser exclusivo de *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi detectado em outros microrganismos (POIREL et al., 2004; GALES et al., 2003). Desde a primeira descrição, esta enzima têm sido encontrada em cepas bacterianas isoladas durante surtos de infecção em diversos hospitais brasileiros, o que sugere que *bla_{SPM}* tenha se tornado endêmico nestas instituições (GALES et al., 2003; MARTINS et al., 2007).

As enzimas GIM-1 e AIM-1 foram inicialmente descritas em *P. aeruginosa*, SIM-1 em *A. baumannii*. Estas enzimas, de menor prevalência, foram isoladas durante surtos de infecção hospitalar na Alemanha (GIM-1), Austrália (AIM-1) e Coréia do Sul (SIM-1), como descrito por Castanheira e colaboradores (2004), Yong e colaboradores (2007) e Lee e colaboradores (2005). As enzimas mais recentemente descritas, NDM-1 (YONG et al., 2009), DIM-1 (POIREL et al., 2009) e KHM-1 (SEKIGUCHI et al., 2008) foram isoladas de cepas de *K. pneumoniae* na Índia, *Pseudomonas stutzeri* na Holanda e *Citrobacter freundii* no Japão, respectivamente.

Na América Latina já foram descritas as MβLs SPM-1, IMP-1, IMP-16, VIM-2, VIM-8 e VIM-11 (WALSH et al., 2005), e, no Brasil, já foi descrito o isolamento de cepas

de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1, IMP-1, IMP-16, IMP-18 e VIM-2 (TOLEMAN et al., 2002; MENDES et al., 2004; SADER et al. 2005b; XAVIER et al., 2006).

2.4 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) em *P. aeruginosa*

As ESBL (Beta-Lactamases de espectro estendido) apresentam a capacidade de hidrolisar as penicilinas, todas as cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações e o aztreonam, e são inibidas pelos inibidores das beta-lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (PATERSON & BONOMO, 2005; BERTRAND et al., 2006). Também não possuem atividade contra as cefamicinas, como cefoxitin e cefotetan.

Estas enzimas pertencem ao grupo 2be e 2d de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush et al., 1995) e ao grupo A de Ambler, com exceção das ESBL tipo OXA que pertencem a classe D de Ambler e ao grupo 2be e 2d de Bush-Jacoby-Medeiros (PATERSON & BONOMO, 2005).

Em *P. aeruginosa*, já foram descritas as ESBLs tipo SHV, TEM, PER, VEB, BEL, GES e CTX-M (LIVERMORE & WOODFORD, 2006). No Brasil, existem relatos da detecção de ESBLs tipo GES e CTX-M em *P. aeruginosa*, e TEM e SHV, comumente encontradas em membros da família Enterobacteriaceae não foram detectadas em estudo realizado recentemente (PICÃO et al., 2009b).

As enzimas GES possuem uma plasticidade fenotípica incomum, pois além apresentarem características das beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), como a atividade contra penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e o aztreonam (PATERSON & BONOMO, 2005), algumas variantes hidrolisam as cefamicinas e os carbapenêmicos (WALTHER-RASMUSSEN & HØIBY, 2007). GES-2 foi a primeira ESBL com atividade sobre os carbapenêmicos a ser descrita. Esta enzima, derivada de GES-1 por uma única substituição Gly170Asn no sítio ativo apresenta atividade catalítica contra o imipenem 100 vezes maior que a GES-1 (POIREL et al., 2001a; POIREL et al., 2002b). Além de GES-2, as ESBL GES-4, GES-5, GES-6 e GES-11 também hidrolisam o imipenem (NAAS et al., 2008). GES-5, que apresenta uma substituição Gly170Ser é capaz também de hidrolisar a cefoxitina (VOURLI et al., 2004).

Até o presente foram descritas 15 variantes de GES designados GES-1 a GES-15 (<http://www.lahey.org/studies/>). Quando comparadas com as carbapenemases da classe B

de Ambler, as enzimas tipo GES apresentam fraca atividade hidrolítica contra os carbapenêmicos (NORDMANN & POIREL, 2002).

Nos últimos anos, as ESBL tipo CTX-M tornaram-se as beta-lactamases mais prevalentes, principalmente na Europa e em determinados países da América do Sul (CANTON & COQUE, 2006). Estas enzimas pertencem ao grupo 2be e 2d de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995) e ao grupo A de Ambler (AMBLER et al., 1991) e não apresentam relação próxima com as ESBL tipo TEM ou SHV (BRADFORD, 2001).

Essas enzimas são classificadas em cinco grandes grupos de acordo com a similaridade entre suas sequências de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25, entre as enzimas de um mesmo grupo, o percentual de identidade é igual ou superior a 94%, enquanto entre enzimas de grupos diferentes esta porcentagem é inferior a 90% (BONNET, 2004).

As CTX-M eram inicialmente reconhecidas por hidrolisarem preferencialmente a cefotaxima, e a maioria das cepas produtoras de CTX-M apresenta MICs para cefotaxima na faixa de resistência, enquanto os MICs para ceftazidima estão quase sempre na faixa de suscetibilidade (PATERSON & BONOMO, 2005). Entretanto, recentemente alguns organismos produtores de variantes de CTX-M com alta capacidade hidrolítica sobre a ceftazidima têm sido descritos (BONNET et al., 2001; POIREL et al., 2001b; PITOUT et al., 2004).

Vários estudos sugerem que as enzimas CTX-M são derivadas de genes cromossômicos de diferentes espécies de *Kluyvera* que, posteriormente, se disseminaram entre bactérias patogênicas e não patogênicas (DECOUSSER et al., 2001; HUMENIUK et al., 2002; POIREL et al., 2002a; RODRIGUEZ et al., 2004). A grande capacidade de disseminação destas enzimas entre diversas espécies bacterianas, devido principalmente à transmissão horizontal de transposons inseridos em plasmídios conjugativos (POIREL et al., 2001b; CANTON & COQUE, 2006) transformou as CTX-M nas ESBLs mais frequentemente encontradas em espécies da família *Enterobacteriaceae* (BONNET, 2004; PITOUT et al., 2008;)

Apesar de incomuns em não-fermentadores, as ESBLs tipo CTX-M tem sido descritas em *P. aeruginosa* (AL NAIEMI et al., 2006; CELENZA et al., 2006; PICÃO et al., 2009a). Segundo Eckert e colaboradores (2006) a disseminação de *bla*_{CTX-M} em *P. aeruginosa* está relacionada à associação destes genes com o elemento de inserção ISEcp1 e integrons. Na prática clínica, a produção de CTX-M por *P. aeruginosa* é um problema

emergente, pois cepas produtoras podem apresentar no teste de suscetibilidade resistência à cefepima e sensibilidade à ceftazidima. Como não existe um método fenotípico padronizado para a detecção da produção de ESBLs por *P. aeruginosa*, infecções por cepas produtoras de CTX-M podem ser erroneamente tratadas com ceftazidima, o que pode levar a falha terapêutica. Além disso, devido à incapacidade de detecção de *P. aeruginosa* produtoras de ESBLs, a prevalência de CTX-M nesta espécie é subestimada (PICÃO et al., 2009b).

2.5 Vigilância da Resistência

Programas de vigilância da resistência visam determinar perfis de suscetibilidade e monitorar a evolução, transmissão e expressão da resistência entre várias populações de patógenos. Estes programas têm sido conduzidos em vários países e geram informações úteis para o controle do surgimento e disseminação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (JONES & MATERSON, 2001). Neste contexto, a caracterização genética dos mecanismos de resistência e a aplicação de técnicas moleculares para a avaliação da relação genética entre cepas resistentes (tipagem molecular) permitem a obtenção de informações não acessíveis pela utilização exclusiva de métodos fenotípicos, permitindo grandes avanços no conhecimento da epidemiologia e genética da resistência bacteriana (BERGERON & OUELLETTE, 1998; COCKERILL, 1999).

A identificação de genes de resistência em patógenos comumente associados a infecções relacionadas à assistência à saúde possibilita antecipar o surgimento de novos fenótipos e orientar a conduta da terapia antimicrobiana de forma a aumentar sua eficiência e reduzir a prevalência de clones resistentes. Estas informações, associadas aos dados de tipagem molecular, facilitam a implantação de medidas de barreira (RICE et al., 1996; RICE, 1999; RAHAL et al., 1998; PFALLER et al., 2001).

Diversos métodos moleculares têm sido para a tipagem molecular de patógenos bacterianos (FOXMAN & RILEY, 2001). Estas técnicas podem ser baseadas na análise de ácidos nucleicos, de produtos de PCR, de proteínas e da expressão de genes. Entre elas, as técnicas de ribotipagem, PFGE, RAPD e ERIC-PCR têm sido descritas como eficientes para a tipagem molecular de patógenos bacterianos (VERSALOVIC et al., 1991; SADER et al., 1995; SINGH et al., 2006).

Em nosso estudo, optamos pela técnica de PFGE para a tipagem molecular dos isolados clínicos. A técnica de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), baseada na análise do perfil de restrição do DNA cromossômico através de eletroforese em gel (TENOVER et al., 1995) é considerada padrão ouro para a tipagem comparativa, devido a sua excelente capacidade discriminatória (PFALLER et al., 2001), e tem sido amplamente utilizada em estudos envolvendo epidemiologia molecular de *P. aeruginosa*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Detectar e identificar genes que codificam a produção de carbapenemases em *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e/ou meropenem isoladas no Hospital de Base em São José do Rio Preto e determinar a similaridade genética entre as cepas estudadas.

3.2. Objetivos Específicos

- Detectar e identificar os genes para MβLs *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} e *bla*_{VIM}
- Detectar e identificar os genes para ESBLs *bla*_{GES} e *bla*_{CTX-M}
- Avaliar a similaridade genética entre os as cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e/ou meropenem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção e Manutenção das Cepas

Foram selecionadas para o estudo sessenta cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos imipenem e/ou meropenem, isoladas consecutivamente de pacientes admitidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) no período de junho a dezembro de 2009. Foram considerados para o estudo apenas uma cepa originada de cada paciente, isoladas de diversos sítios (hemoculturas, uroculturas, culturas de aspirado traqueal e lavado bronco-alveolar). Os isolados clínicos foram identificados no Laboratório Central do HB através de metodologia convencional (testes bioquímicos) ou automatizada (MicroScan, Dade Behring, Tokyo, Japan), onde também foram realizados os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos através da técnica de disco-difusão, de acordo com as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009). Os testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela equipe do Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do HB.

Para o teste de disco-difusão foram utilizados os seguintes antimicrobianos (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra): aztreonam (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), ampicilina (5 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg) e polimixina B (300 U).

Imediatamente após a coleta, os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano foram anotados e os dados interpretados de acordo com normas do CLSI (2009). Os isolados clínicos foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da FAMERP, onde foram purificados em ágar MacConkey (Himedia, Mumbai, Índia) e mantidos em coleção de cultura em freezer a -80 °C, para isso, uma colônia isolada obtida da placa de MacConkey foi inoculada em caldo TSB (“Tryptic Soy Broth”, BACTO™, França) a 37 °C por 16-18 horas. Após este tempo, 0,7 mL de cada cultura foi transferida para criotubos estéreis previamente rotulados, onde foram adicionados 0,3 mL de glicerol 50% estéril. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em triplicata e cada criotubo identificado com um número da coleção de cultura e data de armazenamento. Paralelamente, os dados relativos a cada isolado clínico foram armazenados em uma planilha, contendo informações como seu número de identificação na coleção de cultura,

sempre precedido pelo número do prontuário do paciente, data, sítio de isolamento e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

4.2 Teste Fenotípico para a Confirmação da Produção de MβLs

O teste fenotípico para a confirmação da produção de MβLs foi realizado utilizando-se a técnica de aproximação de discos, previamente descrita por Picão e colaboradores (2008). Uma colônia isolada de cada cepa bacteriana foi inoculada em caldo Müeller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) e incubada por aproximadamente quatro horas em agitação até atingir a escala 0,5 de Mc Farland (10^8 UFC/mL). Esta suspensão foi inoculada de forma homogênea com o auxílio de um swab em placas de 15 cm preenchidas com ágar Müeller-Hinton, e deixou-se a placa em repouso durante 5 minutos para absorver o excesso de umidade. Os discos de papel de filtro foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos para conferir esterilidade ao material, o inibidor de MβL utilizado foi o 2-MPA (ácido 2-mercaptopropiônico) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EUA). No momento do uso foram adicionados 5 µL do 2-MPA a 1,4 mM (1:8) aos discos estéreis. Estes foram posicionados no centro da placa de Petri e em cada lado foram posicionados os discos contendo os substratos ceftazidima (30 µg) e imipenem (10 µg) - (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) respeitando a distância de dois centímetros dos discos dos antibióticos com o do inibidor 2-MPA. As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C. Foram consideradas produtoras de MβL as cepas que apresentaram ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria testada na região do ágar onde houve a difusão do 2-MPA.

4.3 Obtenção de DNA Genômico Bacteriano

Inicialmente, as cepas armazenadas a -80 °C foram reativadas através de cultivo em caldo TSB por 16-24 horas a 37 °C em agitação. Em seguida, uma alíquota da suspensão bacteriana (1,5 mL contendo aproximadamente 10^9 células/mL) foi centrifugada a 8000 g por 10 minutos. A massa celular obtida foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano, através da utilização do Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad, California).

À massa celular obtida foram adicionados 350 µL da solução de lise, seguindo-se uma incubação a 65 °C por 10 minutos. Após este tempo, foram adicionados, em cada tubo, 150 µL da solução precipitante e a mistura foi agitada vigorosamente até ficar

uniformemente viscosa. Em seguida, foram adicionados 500 μL de clorofórmio em cada tubo e a mistura foi agitada até a obtenção de uma solução homogênea. Os tubos foram centrifugados a 16100 g por 15 minutos a 4 °C para a separação das fases. A fase superior foi transferida para novos tubos, sendo adicionado 1 mL de etanol absoluto (Merck Chemicals) a -20 °C em cada um. Depois de homogeneizados, cada tubo foi incubado em gelo por 30 minutos.

Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados a 16100 g por 15 minutos a 4 °C. O etanol foi removido e o DNA precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 80% a -20 °C e as etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas. O sobrenadante foi descartado e, após completa evaporação do etanol, o “pellet” foi ressuscitado em 100 μL de solução tamponante TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 8,0) adicionado de 2 μL de RNase (2 mg/mL). Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. O DNA obtido foi armazenado em freezer -20 °C para posterior utilização.

4.4 Detecção de Genes de MBLs através de Reação em Cadeia da Polimerase

4.4.1 Detecção do gene *bla*_{IMP-1}

A amplificação de *bla*_{IMP-1} foi realizada utilizando-se os primers descritos por Yan e colaboradores (2001), IMP1F e IMP1R (Tabela 1). O protocolo utilizado foi descrito por Senda e colaboradores (1996).

Foram adicionados em tubo “tipo eppendorf”, contendo aproximadamente 100 ng de DNA, os seguintes reagentes: 5,0 μL de tampão 10X, 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 8,0 μL de dNTP (2,5 mM), 5,0 μL de cada primer (10 pmol/ μL), 0,5 μL de Taq (5 U/ μL) e água q.s.p. 50 μL . Os tubos foram colocados no termociclador (Veriti 96 wells, Applied Biosystems, Foster City, CA-USA), programado com passo inicial de desnaturação (94 °C por 3 minutos), seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação (94° C por 1 minuto), hibridização (50 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), com uma fase de extensão final a 72°C por 7 minutos. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo. Uma cepa de *P. aeruginosa* carreadora de *bla*_{IMP} gentilmente cedida pela Dr^a. Ana Cristina Gales (Laboratório ALERTA /UNIFESP) foi utilizada como controle positivo.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 50 V/cm durante 60 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 10 µL da reação, adicionados de 2 µL de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho do fragmento obtido. O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software).

4.4.2 Detecção do gene *bla*_{SPM-1}

Para a amplificação dos genes *bla*_{SPM-1} por PCR, foram utilizados os primers SPM1A e SPM1B descritos por Pitout e colaboradores (2005) (Tabela 1). O protocolo utilizado foi adaptado de Sanbrook e Russel (2001).

Em tubos “tipo eppendorf” contendo aproximadamente 100 ng do DNA de cada cepa foram adicionados os reagentes: 2,5 µL de tampão 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,25 µL de Taq (5 U/µL) e água q.s.p 25 µL. Os tubos foram colocados no termociclador (Veriti 96 wells, Applied Biosystems, Foster City, CA-USA), programado para 94 °C por 2 minutos (primeiro ciclo apenas), seguido de 30 ciclos sequenciais de desnaturação (94 °C por 1 minuto), hibridização (55 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 2 minutos). Após os ciclos seqüenciais, um passo de 72°C por 5 minutos foi realizado para extensão final das cadeias. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo de contaminação. A cepa de *P. aeruginosa* 1088 carreadora de *bla*_{SPM} gentilmente cedida pela Dr^a. Ana Cristina Gales (Laboratório ALERTA /UNIFESP) foi utilizada como controle positivo. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, preparado conforme descrição acima (4.4.1).

4.4.3 Detecção do gene *bla*_{VIM-1}

Para amplificação do gene *bla*_{VIM-1} foram utilizados os primers VIM1A e VIM1B (Tabela 1), descritos previamente por Poirel e colaboradores (2000a). O protocolo utilizado foi padronizado de Sanbrook e Russel (2001).

Em tubos “tipo eppendorf” contendo aproximadamente 100 ng do DNA de cada cepa, foram adicionados os reagentes: 2,5 µL de tampão 10X , 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,25 µL de Taq (5 U/µL) e água q.s.p 25 µL. Os tubos foram colocados no termociclador (Veriti 96 wells, Applied Biosystems, Foster City, CA-USA), com passo inicial (94 °C por 3 minutos) seguido por 35 ciclos seqüenciais de desnaturação (94 °C por 1 minuto), hibridização (50°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto) e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo de contaminação. Uma amostra de *P. aeruginosa* carreadora de *bla*_{VIM} gentilmente cedida pelo Dr. Nilton Lincopan (Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas/USP) foi utilizada como controle positivo. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, preparado conforme descrição acima (4.4.1).

4.5 Detecção de Genes de ESBLs através de PCR

4.5.1 Detecção dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{GES}

Para amplificação do gene *bla*_{CTX-M} foram utilizados os primers e metodologia descritos por Edelstein e colaboradores (2003) e para amplificação do gene *bla*_{GES-1} foram utilizados os primers descritos previamente por Poirel e colaboradores (2000b), representados na Tabela 1.

Em tubos “tipo eppendorf” contendo aproximadamente 200ng do DNA de cada cepa, obtido pelo procedimento acima descrito, foram adicionados os seguintes reagentes: 5,0 µL de tampão 10X , 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,5 µL de Taq (5 U/µL) e água q.s.p 50µL. Os tubos foram colocados no termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City CA-USA) , que foi programado para 94°C por 2 minutos (primeiro ciclo apenas), seguido de 35 ciclos seqüenciais de desnaturação (95°C por 20 segundos), hibridização (51°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos). Após os ciclos seqüenciais, um passo de 72°C por 3 minutos foi realizado para extensão final das cadeias. Foram utilizadas como controles positivos uma cepa de *K. pneumoniae* isolada no Hospital de Base de São José do Rio Preto carreadora de *bla*_{CTX-M} pertencente à coleção de cultura do Laboratório

de Microbiologia da FAMERP depositada no “Gene Bank” com número de acesso FJ815246 e uma cepa carreadora de *bla*_{GES} cedida gentilmente pelo Dr. Nilton Lincopan (Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas / USP). Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, preparado conforme descrição acima (4.4.1).

4.5.2 Agrupamento dos genes *bla*_{CTX-M} por RFLP

A análise do RFLP - “Restriction Fragment Length Polymorphism” foi realizada para agrupar os genes *bla*_{CTX-M} amplificados entre os grupos previamente descritos por Bonnet (2004). As endonucleases de restrição utilizadas foram selecionadas de acordo com metodologia descrita por Edelstein e colaboradores (2003).

A RFLP foi realizada em tubos “tipo eppendorf” contendo os seguintes reagentes da Invitrogen (Life Technologies, Brasil): 2,0 µL de tampão React II (10X), 2,0 µL de BSA (500µg/mL), 1,0 µL de Enzima *Pst* I (10U/µL), 0,5 µL de Enzima *Pvu* II (10U/µl), 4,5 µL de Água Ultra Pura (Invitrogen) e 10 µL de Produto da PCR purificados. As reações foram incubadas a 37 °C por 3 horas.

Após a digestão, os produtos foram analisados em gel de agarose a 2,5%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,08 µL/ 100 mL). A eletroforese foi realizada a 25 V/cm durante 120 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com o volume total da reação (20 µL) adicionados de 2 µL de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado conforme já descrito.

4.6 Purificação dos Produtos de PCR para Sequenciamento

Os produtos obtidos em todas as reações de PCR foram purificados com etanol, de acordo com metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001). Os “amplicons” foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 ml onde foi realizada a purificação. A estes tubos foram adicionados 3 µl de acetato de sódio 3 M seguido de 150 µl de etanol 100%.

Os tubos foram colocados em freezer -80 °C por 20 minutos para que o DNA fosse precipitado. Submeteu-se estes tubos a centrifugação a 16100 g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100µL de etanol 70% (Merck

Chemicals). Em seguida foi realizada centrifugação de 10 minutos, a 16100 g, à temperatura de 4 °C, para a obtenção de um precipitado, o qual foi homogeneizado em 20 µl de água ultra-pura (Invitrogen).

4.7 Sequenciamento dos Genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{GES}

As sequências dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{GES} foram determinadas utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA), segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento teve como finalidade confirmar se os “amplicons” correspondiam realmente aos genes procurados, e, posteriormente, para identificar os tipos de IMP, SPM, VIM, CTX-M e GES. Os “primers” utilizados para o seqüenciamento desses genes estão descritos na Tabela 1.

Na reação de PCR para sequenciamento foram utilizados 2,0 µL de “Big Dye Terminator”, 4,0 µL de solução tamponante (5X), 1,0 µL de primer específico (3,2 pmol/µL), 1,0 µL de DNA purificado com concentração aproximada de 200 ng/mL e água q.s.p. 20 µL. A amplificação foi realizada em 25 ciclos: desnaturação a 96 °C por 30 segundos, hibridização a 50 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos.

As reações de seqüenciamento foram realizadas no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City, CA). As sequências foram analisadas com auxílio do programa DS Gene 2.0 (Accelrys, USA) e foram feitas comparações com sequências existentes no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

4.8 Avaliação da Similaridade Genética entre as Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada de acordo com metodologia descrita por Silbert e colaboradores (2004).

Aproximadamente 10 colônias de cada amostra bacteriana foram inoculadas em 10 ml de TSB (“Tryptic Soy Broth”, BACTO™ Becton Dickinson,) e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas em agitação.

Após incubação, os tubos foram centrifugados a 8000 g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas foram suspensas em 1 mL de solução salina e transferidas para um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) de peso

conhecido. Os tubos foram centrifugados a 8000 g por aproximadamente três minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado. Com a finalidade de se determinar o peso da massa celular os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da solução salina em μL foi equivalente ao peso do centrifugado em μg . Um volume de 5 μL desta solução foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 300 μL da solução tampão TEN (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada a 340 μL de agarose 2% ("low melting" - Invitrogen, Carlsbad, EUA) para a formação de pequenos blocos de gel contendo o DNA cromossômico ("plugs"). Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em solução EC (Tris 6 mM, pH 7,5; NaCl 1 M; EDTA 10 mM ; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) a 37 °C e, a seguir incubados, a 50 °C em 2mL de solução ES (EDTA 0,4 M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20 mg/mL, Promega Corporation, Madison, EUA) numa proporção de 1:1 (2 mg de proteinase K para 2 mL de ES) por um período de 12 horas. Após este período de incubação os blocos foram lavados quatro vezes com solução CHEF-TE (Tris 100 mM, pH 7,5; EDTA 100 mM) e armazenados nessa solução até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

O DNA bacteriano das amostras de *P. aeruginosa* estudadas foi digerido com a enzima de restrição *SpeI* (Fermentas Life Sciences, MD, EUA), 10 U por amostra, por 12 a 18 horas à temperatura de 37 °C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR II (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) e o padrão de variação da corrente elétrica ("switch time") foi de 5 a 60 segundos. A eletroforese foi realizada por um período de 22 horas, em solução 0,5X TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA, 2 mM) a uma temperatura de 13 °C, utilizando uma corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm) com peso molecular Lambda Ladder PFG marker 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (New England Biolabs, Beverly, Mass, EUA). O gel foi revelado com brometo de etídio (0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografado sob luz ultravioleta (Gel Logic 2200 Imaging System-Kodak Camera Corporation, EUA). As cepas foram consideradas diferentes quando apresentarem diferenças em quatro ou mais bandas (TENOVER et al., 1995).

Tabela 1. Primers para amplificação e sequenciamento de genes pesquisados no estudo.

Gene	Função	Primers 5' a 3'	Posição	Amplicon (pb)	Referência	
<i>bla_{IMP}</i>	Amplificação e sequenciamento	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	2 a 21	740	Yan et al., 2001	
		TTAGTTGCTTGTTTTGATG	741 a 722			
	Sequenciamento	CGGGCCTGGATAAAAAACTT	465 a 446	-		
		GCCACAAATTCATTTAGCGG	394 a 413	-		
<i>bla_{SPM}</i>	Amplificação	CTGCTTGGATTCATGGGCGC	25 a 44	784	Pitout et al., 2005	
		CCTTTTCCGCGACCTTGATC	808 a 789			
	Amplificação e sequenciamento	TATCGGAGATCGGAATGAAC	- 14 a 6	844	Próprio Estudo	
		AGACTACAGTCTCATTTCGC	834 a 815			
	Sequenciamento	AGTAGCGAAAATGCTTGATG	189 a 208	-		
		AGCTGGTTGAGTTTCATTTC	554 a 571	-		
<i>bla_{VIM}</i>	Amplificação	TCTACATGACCGCGTCTGTC	29 a 48	748		Poirel et al., 2000a.
		TGTGCTTTGACAACGTTTCGC	776 a 757			
<i>bla_{CTX-M}</i>	Amplificação	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	205 a 228	544	Edelstein et al., 2003	
		CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	727 a 748			
<i>bla_{CTX-M2}</i>	Amplificação	ATGATGACTCAGAGCATTTCG	1 a 20	866	Próprio Estudo	
		TGGGTTACGATTTTCGCCGC	866 a 847			
	Sequenciamento	AGCTGGAAGCCCTGGAGAAAAG	107 a 122	-		
		ATCAAGAAGAGCGACCTGG	298 a 319	-		
		TGATTTCAACGCGCTGATTTAG	301 a 279	-		
		CACGCTCAATACCGCCATTC	510 a 529	-		
		AATGGCGGTATTGAGCGTGG	528 a 509	-		
		CTACCCATGATTTTCGGCAGAC	700 a 680	-		
<i>bla_{GES}</i>	Amplificação e sequenciamento	ATGCGCTTCATTCACGCAC	1 a 20	864	Poirel et al., 2000b.	
		CTATTTGTCCGTGCTCAGG	864 a 846			
	Sequenciamento	ACTGAGAGAAATTGGCGGA	399 a 417	-	Próprio estudo	
		AGTTGTATCTCTGAGGTCGC	528 a 509	-		

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil *In Vitro* da Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Neste estudo, cepas de *P. aeruginosa* apresentando resistência ao imipenem e/ou meropenem foram selecionadas para a investigação da diversidade de genes para MβLs.

Com relação aos carbapenêmicos, 98,3% (59/60) das cepas apresentaram resistência ao imipenem e 75% (45/60) ao meropenem. Variações nas taxas de resistência ao imipenem e ao meropenem já foram previamente descritas. Rodríguez-Martínez e colaboradores (2009) observaram maiores taxas de resistência ao imipenem quando comparadas ao meropenem, e, no Brasil, estudo realizado por Silva e colaboradores (2007) descreveu 26% das amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e 31% resistentes ao meropenem.

A diferença de suscetibilidade entre os antibióticos carbapenêmicos pode ser explicada pela ocorrência simultânea ou em diversas combinações, de vários mecanismos de resistência como a perda da proteína de membrana externa OprD, da superexpressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexXY-OprM ou MexCD-OprJ e da produção de carbapenamases (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2009). Observamos que nove cepas (PHB3, PHB8, PHB17, PHB22, PHB29, PHB32, PHB39, PHB41 e PHB42) apresentaram sensibilidade ao meropenem e resistência ao imipenem (Tabela 2). Essas cepas possivelmente apresentam permeabilidade reduzida à droga, que pode ser ocasionada pela perda da proteína de membrana externa OprD, que causa resistência ao imipenem e não ao meropenem (BONOMO & SZABO, 2006).

As cepas estudadas também apresentaram um perfil de multirresistência (Figura 1), com altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Com relação às cefalosporinas, 78,3% (47/60) apresentaram resistência à ceftazidima, 96,7% (58/60) à cefotaxima e 98,3 (59/60) ao cefepime. Entre os aminoglicosídeos, observou-se que 46,7% (28/60) das cepas apresentaram resistência à amicacina e 83,3% (50/60) apresentaram resistência à gentamicina. Entre as fluoroquinolonas, 78,3% (47/60) apresentaram resistência à ciprofloxacina e 81,7% (49/60) apresentaram resistência à levofloxacina. Com relação à combinação piperacilina/tazobactam, 78,3% (47/60) das cepas apresentaram resistência. Todos os isolados apresentaram sensibilidade à polimixina B O percentual de cepas resistentes ao aztreonam foi de 60% (36/60). A polimixina B foi o único antimicrobiano

capaz de inibir o crescimento de todas as cepas estudadas, com uma taxa de sensibilidade de 100%.

P. aeruginosa multirresistentes têm sido relatadas com grande frequência na Europa, América do Norte e América Latina, sendo que cepas isoladas na América Latina, inclusive no Brasil, possuem as menores taxas de suscetibilidade aos antimicrobianos (MOET et al., 2007). O perfil de suscetibilidade das cepas isoladas no HB refletiu esta realidade, e especialmente neste estudo, o critério de seleção das cepas (resistência aos carbapenêmicos) já direcionou para a seleção de cepas com provável resistência a outras classes de drogas, já que os carbapenêmicos são uma importante opção terapêutica para infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes.

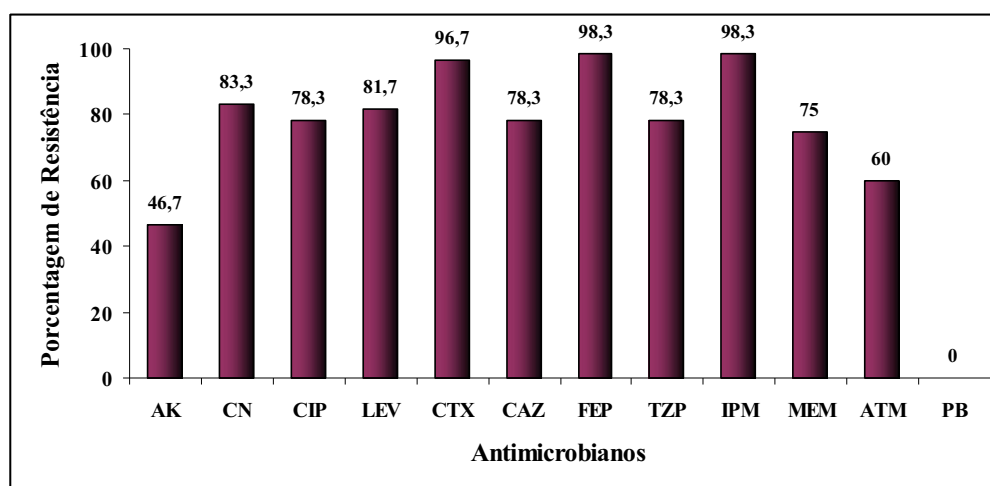


Figura 1. Porcentagem de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos. AK: Amicacina; CN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; TZP: Piperacilina/Tazobactam; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; ATM: Aztreonam; PB: Polimixina B.

5.2 Análise Epidemiológica

As cepas de *P. aeruginosa* incluídas neste estudo foram isoladas de amostras clínicas obtidas de diferentes sítios anatômicos (Figura 2). As amostras do trato respiratório inferior (lavado bronco alveolar e aspirado traqueal) corresponderam a 48,5% (29/60) das amostras coletadas, sendo que aspirado traqueal foi a amostra clínica mais frequente, correspondendo a 40% (24/60) do total. A urina correspondeu a 30% (18/60) das amostras, seguida por lavado bronco-alveolar com 8,5% (5/60), biópsias (partes moles,

fragmento úmero, fragmento esterno e tendão do pé) com 8,5% (5/60), secreções oculares com 5% (3/60), sangue com 3,3% (2/60), ponta de cateter com 3,3% (2/60) e líquido pleural com 1,7% (1/60) do total das amostras clínicas.

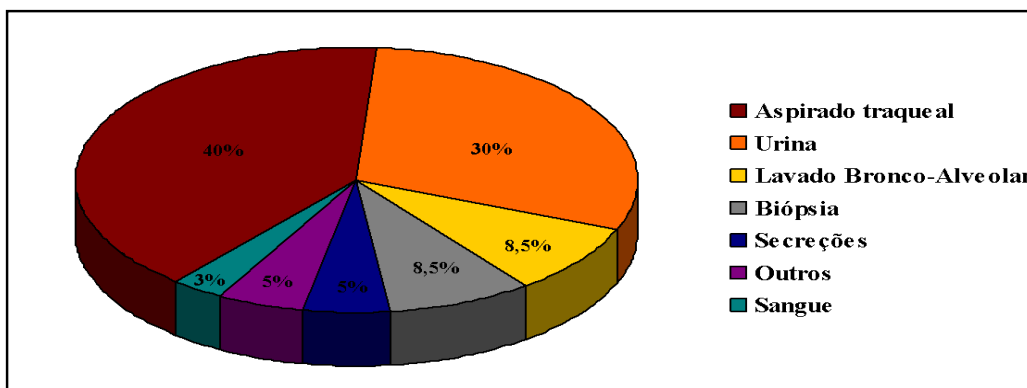


Figura 2. Distribuição das sessenta amostras clínicas obtidas de *P. aeruginosa* separadas por sítio anatômico.

Nas UTIs, estudos relatam que o principal sítio de ocorrência de *P. aeruginosa* é o trato respiratório inferior, geralmente causando pneumonias associadas à ventilação mecânica (GARAU & GOMES, 2003). Estudos epidemiológicos realizados no Brasil (FREITAS & BARTH, 2002) e em outros países da América Latina (GALES et al., 2002), mostram a alta freqüência de isolamento de *P. aeruginosa* à partir de amostras do trato respiratório e urina. Recentemente, *P. aeruginosa* foi relatada como causa mais frequente de pneumonias em pacientes hospitalizados, e o terceiro patógeno mais frequentemente isolado de infecções urinárias em um estudo realizado no país (CASTRUCCI, 2008). Nos Estados Unidos foram analisados mais de 410 mil isolados bacterianos adquiridos em unidades de terapia intensiva (UTI), no período de 1986 a 2003 e *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno mais isolado de pneumonias hospitalares, a terceira causa mais comum de infecções urinárias, o quarto patógeno mais comuns em infecções de sítio cirúrgico e o sexto patógeno mais isolado em corrente sanguínea (GAYNES & EDWARDS, 2005).

5.3 Teste Fenotípico para a Confirmação da Produção de MβLs

Entre as 60 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e/ou meropenem estudadas, 23,3% (14/60) apresentaram resultado positivo (Figura 3) no teste fenotípico para confirmação da produção de MβL (Tabela 2).

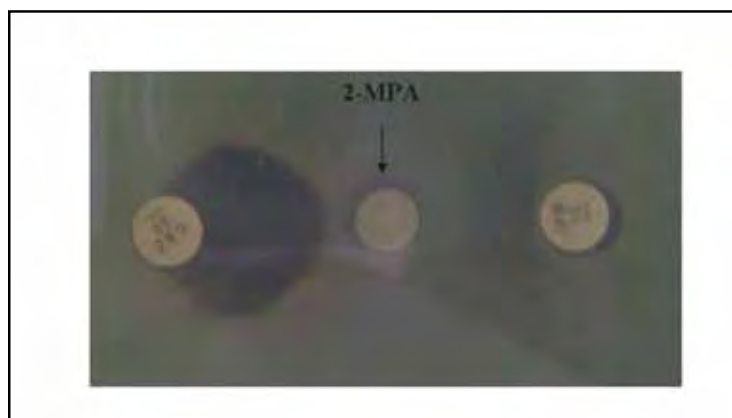


Figura 3. Teste de aproximação de discos para a confirmação fenotípica da produção de M β Ls: observação de sinergismo entre a ceftazidima e 2-MPA, sugerindo a produção de M β L pela cepa PHB 69.

Atualmente não há método padronizado para a detecção fenotípica de M β Ls, mas o método de aproximação de discos para detecção do sinergismo entre pelo menos uma das drogas (imipenem e ceftazidima) e o inibidor 2-MPA foi previamente descrito como adequado para detecção das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M β L, e recomendado para a triagem da produção de M β Ls em amostras clínicas (PICÃO et al., 2008). Com base nesta recomendação, acreditamos que o teste realizado tenha sido eficiente na identificação das cepas produtoras de M β L, e que a resistência ao imipenem e/ou meropenem observada nestas cepas seja decorrente da produção de M β Ls.

Apesar do bom desempenho de testes fenotípicos na detecção de M β Ls, se recomenda que os resultados de testes fenotípicos sejam confirmados através do teste de hidrólise de carbapenêmicos, considerado padrão-ouro para detecção de cepas produtoras de M β Ls (MIRIAGOU et al., 2010). Pretendemos implantar esta técnica em nosso laboratório para realizar a triagem das cepas produtoras de M β Ls que serão submetidas à investigação genética, pois a reação em cadeia da polimerase (PCR) é capaz de detectar apenas a presença de genes que codificam M β Ls previamente descritos (FRANKLIN et al., 2006; MIRIAGOU et al., 2010).

5.4 Detecção e Identificação dos Genes de MβLs por PCR

Genes que codificam MβLs foram detectados em 100% das cepas que apresentaram teste fenotípico positivo, e além destas, nas cepas PHB2, PHB51, PHB53 e PHB60, totalizando 30% (18/60) das cepas estudadas (Tabela 2).

O gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em 16,7% das cepas (10/60) e *bla*_{IMP-1} em 13,3% (8/60). A figura 4 ilustra a detecção de *bla*_{IMP} e a figura 5 de *bla*_{SPM}. O gene *bla*_{VIM} não foi detectado (Figura 6). Os *amplicons* foram sequenciados e foi obtida uma similaridade de 100% com *bla*_{IMP-1} e *bla*_{SPM-1}, respectivamente.

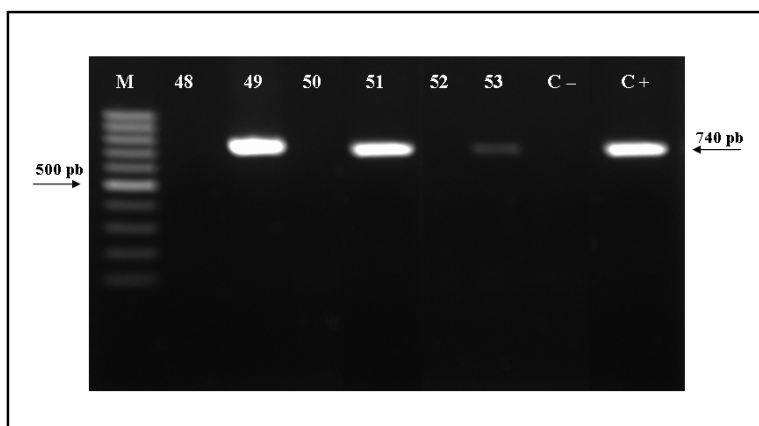


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *bla*_{IMP-1}. M, marcador de peso molecular 100 pb; amostras PHB 48, 49, 50, 51, 52 e 53; Controle Negativo; Controle Positivo. A seta indica o fragmento de 740 pb correspondente ao gene *bla*_{IMP}.

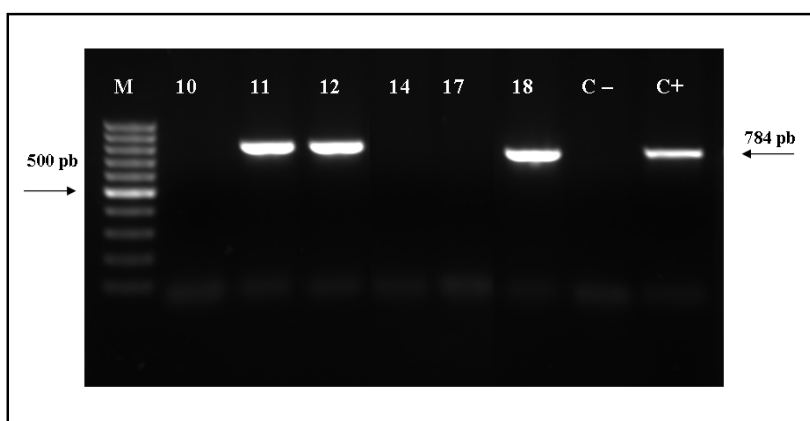


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *bla*_{SPM-1}. M, marcador de peso molecular 100 pb; amostras PHB 10, 11, 12, 14, 17, 18; Controle Negativo; Controle Positivo. A seta indica o fragmento de 784 pb correspondente ao gene *bla*_{SPM}.



Figura 6. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *bla*_{VIM-1}. M, marcador de peso molecular 100 pb; amostras PHB 1, 2, 3, 4, 5, 6; Controle Negativo; Controle Positivo. A seta indica o fragmento de 748 pb correspondente ao gene *bla*_{VIM}.

Estudos realizados no Brasil indicam que *bla*_{SPM-1} é o gene de MβL mais prevalente em várias regiões, com taxas de 5,3% (MARRA et al., 2006), 55,6% (SADER et al., 2005b) a 62,8% (PICÃO et al., 2009b) em São Paulo; 20% no Rio de Janeiro (CARVALHO et al., 2006), 33% em Minas Gerais (CEZÁRIO et al., 2009); 7,5% na região Norte (VIEIRA et al., 2005) e 19,7% no Sul do país (MARTINS et al., 2007).

O gene *bla*_{IMP-1} já foi detectado em São Paulo com prevalências de 8,3 % e 2,6% (SADER et al., 2005b; MARRA et al., 2006) e no Sul do país com prevalência de 5,4 % (MARTINS et al., 2007). Além disso, no Distrito Federal e em Salvador foram detectadas novas variantes, *bla*_{IMP-16} (MENDES et al., 2004) e *bla*_{IMP-18} (XAVIER, 2006) respectivamente. O gene *bla*_{VIM-2} foi detectado no Brasil por Sader e colaboradores (2005b) com prevalência de 30,6%. Nesse mesmo ano um estudo do programa Sentry (SADER et al., 2005a) na América Latina onde foram avaliados hospitais da Argentina, Brasil, Chile, México e Venezuela e *bla*_{VIM-2} foi detectado somente no Chile e na Venezuela.

Em nosso estudo não foi aplicada nenhuma ferramenta estatística para a determinação da prevalência dos genes para MβLs, mas as taxas encontradas estão em acordo com as descritas na literatura.

A não detecção de genes para MβL em 70% das cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, associado ao resultado do teste fenotípico reforça a hipótese de que a produção de MβLs não é o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* isoladas no HB. Este resultado sugere a ocorrência de outros mecanismos de resistência, como mutações no gene *oprD*, que resultam em porinas com reduzida

afinidade pelo imipenem (LIVERMORE, 2002; FARRA et al., 2008) e é considerado o principal responsável pela resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2009). A resistência ao meropenem pode ser resultado da hiperexpressão de sistemas de efluxo (PAGÈS & AMARAL, 2009). Além disso, a resistência ao aztreonam, observada em quatro cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1} (PHB51, PHB53, PHB60, PHB62) e duas cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1} (PHB18 e PHB28) indica a ocorrência de outros mecanismos de resistência, como a produção de beta-lactamases de espectro estendido e cefalosporinases do tipo AmpC (LIVERMORE, 2009), pois MβLs são incapazes de hidrolisar os monobactâmicos (WALSH et al., 2005).

A sensibilidade da técnica molecular usada para a detecção dos genes para MβLs pode ser confirmada pela detecção de genes que codificam MβLs em todas as cepas que apresentaram resultado positivo no teste fenotípico. Além disso, a detecção de *bla*_{IMP-1} nas cepas PHB2, PHB51, PHB53 e PHB60 (Tabela 2), que apresentaram resultado negativo no teste fenotípico, reforça a necessidade de confirmação do fenótipo através do teste de hidrólise de carbapenêmicos.

Todas as cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1} (10/60) apresentaram resistência à cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem condizentes com características de cepas produtoras de MβL (CORNAGLIA et al., 2007).

Entre as cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1}, uma (PHB3) apresentou sensibilidade ao meropenem e resultado positivo no teste fenotípico; e três (PHB2, PHB51 e PHB53) apresentaram sensibilidade à ceftazidima e resultados negativos no teste fenotípico. A cepa PHB3, apesar de carrear *bla*_{IMP-1} e apresentar fenótipo característico para a produção de MβL, pode não ter produzido enzima na concentração suficiente para a hidrólise do meropenem nas condições testadas. Esta hipótese é baseada no conhecimento do ambiente genético e dos mecanismos de expressão dos genes de resistência a antimicrobianos. O nível de expressão de genes de resistência encontrados em cassetes associados à integrons é afetado pela posição do gene cassete no integron. Assim, genes para MβLs podem ser expressos em com maior intensidade se estiverem localizados mais próximos do promotor, resultando em maiores concentrações da enzima e maiores níveis de resistência (COLLIS & HALL, 1995). É possível que baixa expressão da enzima IMP-1 na cepa PHB3, seja resultado da localização do gene cassete no integron, resultando em produção de enzima em quantidade insuficiente para hidrolisar o meropenem na concentração utilizada no teste de sensibilidade.

As cepas PHB2, PHB51 e PHB53, carreadoras de *bla*_{IMP-1} apresentaram resultado negativo no teste fenotípico e foram sensíveis à ceftazidima, fenótipo inesperado para cepas carreadoras de MβLs. A expressão do gene *bla*_{IMP-1} nessas cepas pode estar fraca, resultando em produção de concentrações de MβL insuficientes para a detecção fenotípica através do teste de disco-aproximação e para a hidrólise da ceftazidima na concentração utilizada no teste de suscetibilidade. Em estudo de Pournaras e colaboradores (2005) uma cepa de *P. aeruginosa* carreadora de *bla*_{VIM-2} também apresentou sensibilidade à ceftazidima. De acordo com estes autores, apesar desse resultado ser inesperado, a produção de MβLs isoladamente, pode não ser suficiente para elevar a concentração inibitória mínima de ceftazidima.

A detecção de genes para MβL em cepas sensíveis aos carbapenêmicos também já foi descrita na literatura: Senda e colaboradores (1996) detectaram cepas carreadoras de *bla*_{IMP} e Pellegrino e colaboradores (2008) detectaram cepas carreadoras de *bla*_{SPM} sensíveis aos carbapenêmicos. De acordo com Pellegrino e colaboradores (2008), muitos isolados clínicos de *P. aeruginosa* carreadores de MβLs demonstram níveis baixos de resistência aos carbapenêmicos, indicando que a aquisição de genes produtores de MβLs isoladamente pode não conferir, necessariamente, elevados níveis de resistência a estas drogas. Em cepas com baixa expressão dos genes de MβLs, a resistência ao imipenem e meropenem pode resultar principalmente de alterações na permeabilidade da membrana externa e na expressão de sistemas de bombas de efluxo, que implicam em altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009).

5.5 Detecção dos Genes de ESBLs por PCR

O gene *bla*_{CTX-M} foi detectado em 21,7% das cepas (13/60) (Figura 7A) e o gene *bla*_{GES} foi detectado em 3,3% das cepas (2/60) (Figura 8). A análise por RFLP mostrou que todos os *bla*_{CTX-M} detectados pertencem ao grupo CTX-M 2 (Figura 7B). O sequenciamento dos *amplicons* com “*primers*” específicos para CTX-M grupo 2 identificou onze cepas como carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} e duas amostras não foram sequenciadas.

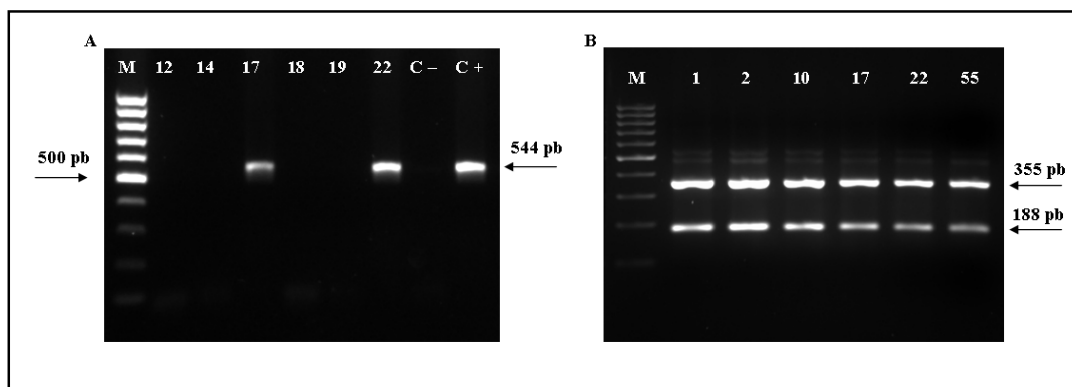


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do gene *bla*_{CTX-M} e o seu perfil de restrição utilizando *Pst* I e *Pvu* II. A: M, marcador de peso molecular 100 pb; amostras PHB 12, 14, 17, 18, 19, 22; Controle Negativo; Controle Positivo. A seta indica o fragmento de 544 pb correspondente ao gene *bla*_{CTX-M}. B: RFLP das amostras carreadoras de *bla*_{CTX-M}. M, marcador de peso molecular 100 pb; amostras PHB 1, 2, 10, 17, 22, 55. Os fragmentos de 355 e 188 pb são característicos de *bla*_{CTX-M} do grupo 2.

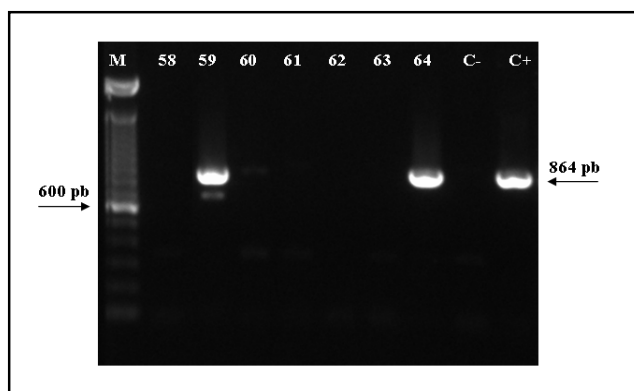


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *bla*_{GES}. M, marcador de peso molecular 100 pb; amostra PHB 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64; Controle Negativo; Controle Positivo. A seta indica o fragmento de 864 pb correspondente ao gene *bla*_{GES}.

A investigação da presença de genes que codificam ESBLs foi realizada com o objetivo de identificar o mecanismo responsável pela resistência às cefalosporinas de terceira geração e ao cefepime nas cepas de *P. aeruginosa* onde não haviam sido detectados genes para M β Ls. As enzimas CTX-M e GES foram selecionadas por serem ESBLs cuja frequência de isolamento em *P. aeruginosa* tem aumentado nos últimos anos (AL NAIEMI et al, 2006; CELENZA et al., 2006; NAAS et al., 2008; PICÃO et al., 2009a; PICÃO et al., 2009b).

A tabela 2 mostra o perfil de suscetibilidade das amostras carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{GES}. Todas as treze cepas carreadoras de *bla*_{CTX-M} apresentaram resistência à cefotaxima e ao cefepime, mas entre estas, cinco cepas (PHB2, PHB22, PHB52, PHB53, PHB57) foram sensíveis à ceftazidima. A ocorrência de *P. aeruginosa* resistentes ao cefepime, mas sensíveis à ceftazidima tem sido relatada mundialmente (LIVERMORE & WOODFORD, 2006), e, a produção de ESBLs tipo CTX-M é considerado um dos principais mecanismos de resistência associado a este fenótipo (PATERSON & BONOMO, 2005), pois estas enzimas são reconhecidas por hidrolisar preferencialmente a cefotaxima, e apresentam baixa capacidade de hidrólise da ceftazidima (BONNET et al., 2001). De fato, uma cepa de *P. aeruginosa* produtora de CTX-M-2 sensível à ceftazidima foi recentemente isolada em um hospital de São Paulo (PICÃO et al., 2009a).

A real prevalência de CTX-M em *P. aeruginosa* é desconhecida, pois não existem métodos padronizados para a detecção fenotípica de ESBLs nesta espécie, e muitos laboratórios utilizam a resistência à ceftazidima como critério para a detecção. Assim, a estimativa da prevalência destas enzimas, incluindo CTX-M é comprometida. A realização de PCR e sequenciamento para a detecção e identificação de genes é um recurso disponível em poucos laboratórios de pesquisa, e não acessível aos laboratórios clínicos.

Este trabalho relata pela terceira vez a detecção de *bla*_{CTX-M} em cepas de *P. aeruginosa* isoladas no Brasil. Os dois primeiros relatos descrevem a presença de *bla*_{CTX-M-2} em *P. aeruginosa* isoladas em um hospital universitário de São Paulo (PICÃO et al., 2009a; PICÃO et al., 2009b).

É interessante observar que *bla*_{CTX-M-2} foi detectado em *P. aeruginosa* isoladas tanto em São Paulo como em São José do Rio Preto. Estudo prévio realizado no Laboratório de Microbiologia da FAMERP (TOLENTINO, 2009) identificou várias cepas de *K. pneumoniae* carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} isoladas no HB. *K. pneumoniae* é um reconhecido reservatório de genes para ESBLs, e a ocorrência do mesmo gene nas duas espécies isoladas do mesmo hospital levanta a hipótese de transmissão horizontal, através de plasmídeos e integrons.

Os *amplicons* de *bla*_{GES}, detectados nas cepas PHB59 e PHB64, foram sequenciados e comparados com sequências nucleotídicas presentes no banco de dados e foi obtida similaridade de 100% com *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5}, respectivamente. As duas cepas carreadoras de *bla*_{GES}, no atual estudo, apresentaram resistência ao cefepime e à

ceftazidima, perfil de resistência típico de produtores desse tipo de ESBL (PATERSON & BONOMO, 2005).

A enzima GES-1 confere resistência às oximino-cefalosporinas, principalmente ceftazidima (POIREL et al., 2000b). A enzima GES-5 é uma ESBL com atividade de carbapenemase, com atividade sobre o imipenem (VOURLI et al., 2004). A produção de GES-5 pode ser a causa da resistência ao imipenem na cepa PHB 64. De fato, existem outros relatos no Brasil de cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem carreadoras de *bla*_{GES-5} (DA FONSECA et al., 2007; PICÃO et al., 2009b).

ESBLs tipo GES foram previamente descritas em *P. aeruginosa* em várias partes do mundo, como Espanha (VIEDMA et al., 2009), Grécia (KOTSAKIS et al., 2010), Japão (WANG et al., 2006), Brasil (PICÃO et al., 2009b; DA FONSECA et al., 2007), e sua disseminação nesta espécie é preocupante, pois algumas variantes, como GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6 possuem atividade de carbapenemase (NAAS et al., 2008).

Em nosso estudo foram identificadas cinco cepas carreadoras de genes de MβLs e ESBLs simultaneamente (PHB2, PHB3, PHB53, PHB59, PHB60). Essa combinação de MβL e ESBL em uma mesma cepa foi primeiramente descrita em uma cepa de *P. aeruginosa* carreadora de *bla*_{VIM-2} e *bla*_{PER-1} isolada na Itália (DOCQUIER et al., 2001). No Brasil, a co-produção de ESBL e MβL foi detectada apenas através de teste fenotípico em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada no Rio de Janeiro (PELLEGRINO et al., 2002). No atual estudo foram identificadas cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{IMP-1} e *bla*_{GES}. O acúmulo de diferentes determinantes de resistência em uma cepa é preocupante, pois impõe uma limitação nas opções terapêuticas para as infecções causadas por Gram-negativos (PELLEGRINO et al., 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2. Resultados do teste de sensibilidade por disco-difusão (halo de inibição em cm), do teste fenotípico para MβLs e do teste genotípico. R: Resistente; S: Sensível.

Cepas	Teste de Sensibilidade por Disco-Difusão - Halo (mm)														Teste Fenotípico MβL	Genótipo <i>bla</i>
	Antibióticos Beta-Lactâmicos															
	CTX		CAZ		FEP		TZP		IPM		MEM		ATM			
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S		
≤14 ≥23		≤14 ≥18		≤14 ≥18		≤17 ≥18		≤13 ≥16		≤13 ≥16		≤15 ≥22				
PHB 1	6		6		6		6		10		8		10		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}
PHB 2	10		18		6		6		6		6		17		Negativo	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{CTX-M 2}
PHB 3	6		6		6		6		6		19		18		Positivo	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{CTX-M}
PHB 4	6		6		6		6		12		14		16		Negativo	-
PHB 5	6		6		6		19		6		6		22		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}
PHB 6	6		6		6		10		11		14		14		Negativo	-
PHB 7	6		6		6		6		6		6		16		Negativo	-
PHB 8	6		6		6		6		6		16		8		Negativo	-
PHB 10	13		6		6		13		6		6		23		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}
PHB 11	6		6		6		14		6		6		22		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}
PHB 12	6		6		6		16		6		6		19		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}
PHB 14	6		6		6		6		10		15		10		Negativo	-
PHB 17	6		17		6		16		13		17		16		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}
PHB 18	9		6		6		6		6		6		12		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}
PHB 19	6		6		6		6		6		6		14		Negativo	-
PHB 22	6		19		6		16		6		18		8		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}
PHB 24	6		6		6		6		6		6		6		Negativo	-
PHB 25	6		6		6		10		10		10		18		Negativo	-
PHB 27	6		6		6		10		10		15		8		Negativo	-
PHB 28	6		6		6		6		6		6		14		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}
PHB 29	19		23		6		17		6		22		12		Negativo	-
PHB 30	6		6		6		18		6		6		9		Negativo	-
PHB 31	6		6		6		6		6		6		19		Negativo	-
PHB 32	6		6		6		12		6		19		13		Negativo	-
PHB 33	6		6		6		6		6		6		13		Negativo	-
PHB 34	6		6		6		6		6		6		12		Negativo	-
PHB 35	6		18		6		21		6		6		6		Negativo	-
PHB 36	6		6		6		18		6		13		6		Negativo	-
PHB 37	6		6		6		14		6		6		20		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}
PHB 39	10		25		6		14		6		24		21		Negativo	-
PHB 40	6		6		6		19		6		6		9		Negativo	-
PHB 41	13		20		15		6		6		18		23		Negativo	-
PHB 42	19		6		6		25		14		16		23		Negativo	-
PHB 43	6		6		6		6		6		14		12		Negativo	-
PHB 44	6		17		6		20		10		11		15		Negativo	-
PHB 45	6		21		6		15		10		11		10		Negativo	-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2. (Continuação) Resultados do teste de sensibilidade por disco-difusão (halo de inibição em cm), do teste fenotípico para MβLs e do teste genotípico. R: Resistente; S: Sensível.

Cepas	Teste de Sensibilidade por Disco-Difusão - Halo (mm)														Teste Fenotípico MβL	Genótipo <i>bla</i>											
	Antibióticos Beta-Lactâmicos																										
	CTX		CAZ		FEP		TZP		IPM		MEM		ATM														
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S													
≤14		≥23		≤14		≥18		≤14		≥18		≤17		≥18		≤13		≥16		≤13		≥16		≤15		≥22	
PHB 47	6		6		6		10		6		6		23		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}											
PHB 49	6		6		6		27		6		6		23		Positivo	<i>bla</i> _{IMP-1}											
PHB 50	6		6		6		6		6		12		10		Negativo	-											
PHB 51	9		20		6		18		6		13		12		Negativo	<i>bla</i> _{IMP-1}											
PHB 52	6		21		6		25		6		6		17		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M like}											
PHB 53	6		20		6		18		6		6		14		Negativo	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{CTX-M 2}											
PHB 54	6		6		6		6		6		6		17		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}											
PHB 55	6		6		6		6		6		6		17		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}											
PHB 57	13		26		6		6		6		6		25		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}											
PHB 58	6		6		6		6		6		6		21		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}											
PHB 59	6		6		6		22		6		6		21		Positivo	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{GES-1}											
PHB 60	6		6		6		10		12		6		8		Negativo	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{CTX-M 2}											
PHB 61	6		6		6		6		6		6		10		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}											
PHB 62	6		6		6		6		13		6		11		Positivo	<i>bla</i> _{IMP-1}											
PHB 63	6		6		6		15		6		6		6		Negativo	-											
PHB 64	6		6		6		6		6		6		12		Negativo	<i>bla</i> _{GES-5}											
PHB 65	6		6		6		6		6		6		11		Negativo	-											
PHB 66	6		6		6		15		6		6		14		Negativo	-											
PHB 67	6		6		6		6		6		15		13		Negativo	-											
PHB 68	6		6		6		6		6		12		11		Negativo	-											
PHB 69	6		6		6		19		6		6		21		Positivo	<i>bla</i> _{SPM-1}											
PHB 70	6		6		6		6		11		11		12		Negativo	-											
PHB 71	6		6		6		6		6		6		6		Negativo	<i>bla</i> _{CTX-M 2}											
PHB 72	6		6		6		10		6		6		14		Negativo	-											

5.6 Tipagem Molecular

A tipagem molecular das cepas de *P. aeruginosa* foi realizada para determinar a relação genética entre as carreadoras de *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, e *bla*_{CTX-M-2}. A análise da similaridade entre as cepas foi realizada por comparação visual dos perfis de PFGE. Paralelamente, foram avaliadas informações como a data de isolamento e o setor de origem da amostra clínica (área de internação do paciente), para entendimento da rota de disseminação das cepas.

5.6.1 Tipagem molecular das cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1}

A figura 9 mostra o resultado da tipagem das dez cepas carreadoras do gene *bla*_{SPM-1}. Na tipagem por PFGE sete cepas (PHB5, PHB12, PHB18, PHB37, PHB54, PHB58 e PHB69) apresentaram perfis de restrição idênticos e foram agrupadas no **Pulsotipo A**. As demais cepas apresentaram perfil de restrição similar ao Pulsotipo A, com diferenças de uma banda, e foram classificadas como seus subtipos, **Pulsotipo A1** (PHB11 e PHB28) e **Pulsotipo A2** (PHB47).

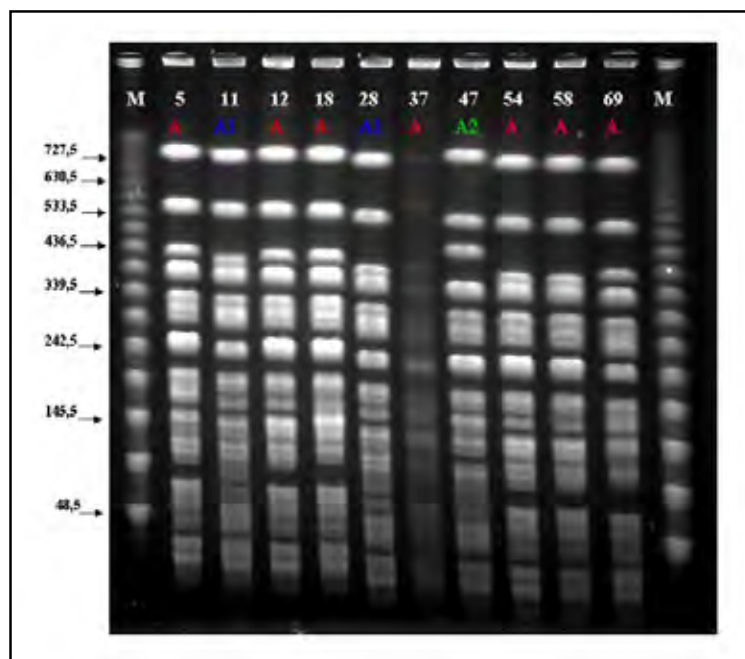


Figura 9. Eletroforese em campo elétrico pulsado das cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1}. Destacados em vermelho, azul e verde os Pulsotipos A, A1 e A2, respectivamente.

A Tabela 3 mostra a relação entre os pulsotipos das cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1}, as datas de isolamento e origem da amostra clínica. As cepas do **Pulsotipo A** foram isoladas durante um período de aproximadamente 4 meses (Julho a Novembro de 2010) e são provenientes de pacientes internados na mesma unidade de terapia intensiva (UTI - Emergência). A única exceção, PHB37, foi isolada de uma unidade de terapia semi-intensiva, localizada em outro andar do hospital, mas esse mesmo paciente esteve previamente internado na UTI-Emergência. As cepas **Pulsotipo A1** foram isoladas da mesma unidade de terapia intensiva (UTI Geral) em um intervalo de trinta e três dias. A cepa PHB47 (**Pulsotipo A2**) foi isolada do sexto andar do hospital, mas esse paciente esteve internado na UTI Convênio até dia 17/09/09 UTI que se localiza no mesmo andar que a UTI-Geral.

Os dados acima estão em acordo com outros estudos, que mostram a disseminação de um único clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 em diferentes cidades do Brasil (PELLEGRINO et al., 2002; GALES et al., 2003; MENEZES, 2005). Recentemente, foi demonstrado que variações genéticas encontradas entre cepas produtoras de SPM-1 podem ser decorrentes da variação genética do próprio clone ao longo do tempo, e que os diversos

genótipos de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 descendem de um ancestral comum (CASTRUCCI, 2008).

O isolamento de cepas do mesmo pulsotipo de pacientes internados na mesma UTI, em um período de tempo delimitado indica a ocorrência de transmissão horizontal destas cepas, carregadas provavelmente por mãos de profissionais de saúde (PITTET et al., 2006), fômites compartilhadas pelos pacientes (SÁNCHEZ-CARRILLO et al., 2009) e superfícies contaminadas (BOYCE, 2007).

Tabela 3: Distribuição das cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1} no HB.

Cepa	Origem	Data de Isolamento	Material Clínico	Pulsotipo
PHB 5	UTI-E	2/7/2009	Sangue	A
PHB 11	UTI-G	29/7/2009	Asp. Traqueal	A1
PHB 12	UTI-E	3/8/2009	Asp. Traqueal	A
PHB 18	UTI-E	7/8/2009	LBA	A
PHB 28	UTI-G	30/8/2009	Urina	A1
PHB 37	UTSI	21/9/2009	Urina	A
PHB 47	6º Andar	11/10/2009	Urina	A2
PHB 54	UTI-E	26/10/2009	Urina	A
PHB 58	UTI-E	3/11/2009	Urina	A
PHB 69	UTI-E	23/11/2009	Asp. Traqueal	A

5.6.2 Tipagem molecular das cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{CTX-M-2}

A figura 10A mostra o resultado da tipagem molecular por PFGE de sete cepas carreadoras do gene *bla*_{IMP-1}. A análise do perfil de PFGE mostrou a diversidade genética entre as cepas, indicando a ocorrência de vários clones de *P. aeruginosa* carreadores de *bla*_{IMP-1} dentro da instituição estudada.

As cepas PHB53 e PHB60 apresentaram perfil de restrição idêntico e foram consideradas indistinguíveis, sendo agrupadas no **Pulsotipo B**. A cepa PHB51 apresentou diferença de uma banda (ausência da banda de aproximadamente 339,5 pb) e foi considerada como um subtipo de B (**Pulsotipo B1**). As cepas PHB2, PHB3, PHB49 e PHB62 apresentaram perfis de restrição distintos, foram consideradas não relacionadas geneticamente e designadas aos **Pulsotipos C, D, E e F** respectivamente. A cepa PHB59 não pôde ser tipada por PFGE, provavelmente devido à degradação do DNA (SILBERT et al., 2003).

Entre as nove cepas carreadoras do gene *bla*_{CTX-M} que foram tipadas PHB1, PHB17, PHB22, PHB53, PHB60 e PHB71 foram agrupadas como **Pulsotipo B**, anteriormente descrito na análise do perfil de PFGE das cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1}. PHB53 e PHB60 (**Pulsotipo B**) são carreadoras de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{CTX-M-2}, assim como PHB2 e PHB3, que pertencem aos **Pulsotipos C e D** respectivamente. O **Pulsotipo G** foi criado para acomodar PHB57. O perfil de PFGE da cepa PHB61 é idêntico ao observado pelas cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1} agrupadas no **Pulsotipo A**. Entretanto, este gene não foi detectado em PHB61. O gene *bla*_{CTX-M} não foi detectado em nenhuma das cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1}. Três cepas não puderam ser tipadas por PFGE (PHB10, PHB52 e PHB55) (Figura 10B).

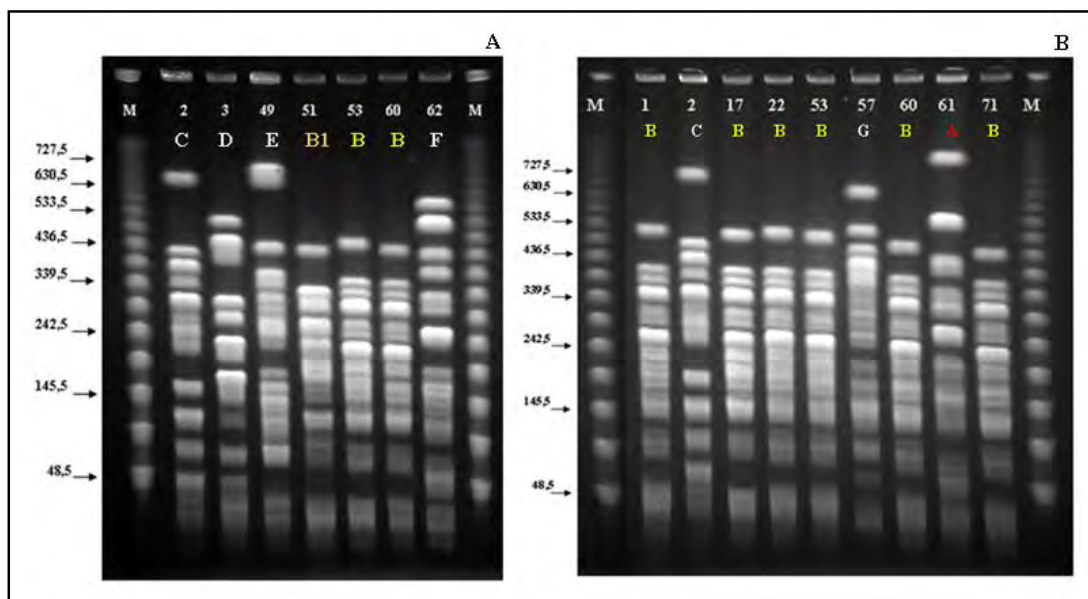


Figura 10. PFGE. A: Cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1}. B: Cepas carreadoras de *bla*_{CTX-M-2}. Destacados em amarelo os pulsotipos B e B1, em branco pulsotipos C, D, E, F, G e em vermelho pulsotipo A.

A Tabela 4 mostra a relação espaço-temporal entre os pulsotipos de *P. aeruginosa* carreadoras de *bla*_{IMP-1} e de *bla*_{CTX-M-2} isoladas no HB. O isolamento de cepas do **Pulsotipo B**, todas carreadoras de *bla*_{CTX-M-2}, em diversos setores do hospital durante um período de aproximadamente cinco meses (Junho a Novembro de 2009) sugere que este pode ser um clone endêmico na instituição, disseminado através de transmissão horizontal. As cepas PHB53 e PHB60, carregam adicionalmente *bla*_{IMP-1}, e foram isoladas em um período de 13 dias, de dois pacientes internados em diferentes UTIs. O surgimento de uma variante, com um gene adicional de resistência, dentro do mesmo clone sugere a evolução deste clone através da aquisição de um elemento genético móvel e seleção por pressão seletiva de antibioticoterapia com o imipenem, que é amplamente utilizado no HB.

A disseminação clonal verificada não somente para as amostras produtoras de SPM-1 como também para alguns pulsotipos nos isolados de IMP-1 e CTX-M-2 comprova que as medidas de prevenção de infecção hospitalar aplicadas durante o período avaliado foram insuficientes. Esse fato fica claro quando a disseminação é observada entre diversas unidades do Hospital de Base durante todo o segundo semestre de 2009, como também dentro de uma mesma unidade de terapia intensiva. Os **Pulsotipos C, D, E, F e G** são isolados eventuais, podendo ser inclusive agentes endógenos, adquiridos em internações prévias ou não, e selecionados devido à antibioticoterapia prolongada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4: Distribuição das cepas carreadoras de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{CTX-M-2} no HB

Cepa	Origem	Data de Isolamento	Material Clínico	Enzima Produzida	Pulsotipo
PHB 1	INCA	5/6/2009	Urina	CTX-M 2	B
PHB 2	UTI-G	9/6/2009	Asp. Traqueal	IMP-1 CTX-M 2	C
PHB 3	UTSI	11/6/2009	Urina	IMP-1 CTX-M like	D
PHB 10	Ambulatório	21/7/2009	Urina	CTX-M 2	-
PHB 17	UTI Pediátrica	6/8/2009	Asp. Traqueal	CTX-M 2	B
PHB 22	Centro Cirúrgico	12/8/2009	Biópsia Partes Moles	CTX-M 2	B
PHB 49	UTI-N	15/10/2009	Urina	IMP-1	E
PHB 51	3º Andar	19/10/2009	Urina	IMP-1	B1
PHB 52	UTI-P	21/10/2009	Asp. Traqueal	CTX-M like	-
PHB 53	UTI-C	21/10/2009	Asp. Traqueal	IMP-1 CTX-M 2	B
PHB 55	Emergência	1/11/2009	Urina	CTX-M 2	-
PHB 57	UTSI	2/11/2009	Urina	CTX-M 2	G
PHB 59	UTI-P	3/11/2009	Líquido Pleural	IMP-1	-
PHB 60	UTI-E	4/11/2009	Asp. Traqueal	IMP-1 CTX-M 2	B
PHB 61	3º Andar	7/11/2009	Sangue	CTX-M 2	A
PHB 62	UTI-E	11/11/2009	Asp. Traqueal	IMP-1	F
PHB 71	UTI-E	23/11/2009	Asp. Traqueal	CTX-M 2	B

A existência dois de pulsotipos predominantes (A e B) entre os isolados de *P. aeruginosa* reforça a importância de medidas de intervenção que diminua a infecção cruzada, como isolamento de contato, melhor adequação da área física das unidades de terapia intensiva e maior aderência às medidas de controle de infecção hospitalar (AGODI et al., 2007).

6. CONCLUSÕES

- As *P. aeruginosa* estudadas são carreadoras de *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES1} e *bla*_{GES-5}, sendo *bla*_{SPM-1} detectada em dez cepas, *bla*_{IMP-1} em oito, *bla*_{CTX-M-2} em treze, *bla*_{GES-1} e *bla*_{GES-5} em uma cepa cada.

- As cepas carreadoras de *bla*_{SPM-1} pertencem a um único pulsotipo, demonstrando a disseminação clonal dentro da instituição.

- A diversidade genética dos isolados carreadores de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{CTX-M-2} indica a ocorrência de vários clones dentro da instituição, apesar de a maioria das cepas carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} estarem agrupadas em um pulsotipo dominante (**Pulsotipo B**).

- O isolamento de cepas do mesmo pulsotipo a partir de diferentes pacientes indica que as medidas de prevenção de disseminação de *P. aeruginosa* carreadoras de MβLs e ESBLs no Hospital de Base foram ineficazes.

- Outros mecanismos, além da produção de MβL, parecem estar associados à resistência aos carbapenêmicos em cepas de *P. aeruginosa* isoladas no Hospital de Base, sendo necessários estudos posteriores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, J.A.; PEREGO, C.; GRAVISS, L.; DVORAK, T.; HACHEM, R.; CHEMALY, R.F.; RAAD II. **The role of interventional molecular epidemiology in controlling clonal clusters of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill cancer patients.** Am J Infect Control. n. 37. p. 442-6. 2009.

AGODI, A.; BARCHITTA, M.; CIPRESSO, R.; GIAQUINTA, L.; ROMEO, M.A.; DENARO, C. ***Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients.** Intensive Care Med. v. 33. n.7. p. 1155-61. 2007.

AL NAIEMI, N.; DUIM, B.; BART, A. **A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*.** J. Med. Microbiol. v. 55. p. 1607–1608. 2006.

ALEKSHUM, M.N.; LEVY, S.B. **The *Escherichia coli* mar locus – antibiotic resistance and more.** ASM News v. 70. n. 10. p. 451-456. 2004.

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

AMBLER, R.P.; COULSON, A.F.; FRÈRE, J.M.; GHUYSEN, J.M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R.C.; TIRABY, G.; WALEY, S.G. **A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases.** Biochem J. p. 269-70. 1991.

ANDRADE, S.S.; JONES, R.N. ; GALES, A.C. ; SADER, H.S. **Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001).** J Antimicrob. Chemother. v. 52. p. 140-141. 2003.

BARTH, A.L.; PITT, T.L.; **Microbial Pathogens Associated with Cystic Fibrosis: Special Focus on *Pseudomonas aeruginosa*.** Braz J Infec. Dis. v. 2. p. 43-61. 1998.

BEN-HAMOUDA, T.; FOULON, T.; BEN-CHEIKH, MASMOUDI, A.; FENDRI, C.; BELHADJ, O.; BEN-MAHREZ, K. **Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward.** J Med Microbiol. v. 52. n. 5. p. 427-33. 2003.

BERGERON, M.G.; OUELLETTE, M. **Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory.** J Clin Microbiol. v.36. n.8. p.2169-2172.1998.

BERTRAND S., WEILL F. X. ; CLOECKAERT, A. ; VRINTS, M. ; MAIRIAUX, E. ; PRAUD, K.; DIERICK, K.; WILDEMAUVE, C.; GODARD, C.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; GRIMONT, A.D.; COLLARD, J.M. **Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar *Virchow* isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003).** J Clin Microbiol. v. 44. n. 8. p. 2897-903. 2006.

BONNET, R.; DUTOUR, C.; SAMPAIO, J.L.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. **Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly.** Antimicrob Agents Chemother. v.45. n.8. p.2269-2275. 2001.

BONNET, R. **Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes.** Antimicrob Agents Chemother. v.48. n.1. p.1-14. 2004.

BONOMO, R.A.; SZABO, D. **Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*.** Clin Infect Dis. v. 43, n. 2, p. 49-56. 2006.

BOYCE, J.M. **Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection.** J Hosp Infect. v. 2. p. 50-4. 2007.

BRADFORD, P.A. **Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.** Clin Microbiol Rev. v.14. n.4. p.933-951. 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.** Antimicrob Agents Chemother. v.39. n.6. p.1211-33. 1995.

BUSH, K. **Metallo-beta-lactamases: a class apart.** Clin Infect Dis. v.1. p. 48-53. 1998.

BUSH, K. **New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy.** Clin Infect Dis.v.32. n.7. p.1085-1089. 2001.

- CANTÓN, R.; COQUE, T. M. **The CTX-M beta-lactamase pandemic.** *Curr Opin Microbiol.* v. 9. n. 5. p. 466–75. 2006.
- CARTELLE, M.; DEL MAR, T. M.; PERTEGA, S.; BECEIRO, A.; DOMINGUEZ, M.A.; VELASCO, D.; MOLINA, F.; VILLANUEVA, R.; BOU, G. **Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins.** *J Clin Microbiol.* v. 42. n. 9. p. 4242-9. 2004.
- CARVALHO, A.P.; ALBANO, R.M.; DE OLIVEIRA, D.N.; CIDADE, D.A.; TEIXEIRA, L.M.; MARQUES, E.D.E.A. **Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil.** *Microb Drug Resist.* v.12. n.2. p.103-8. 2006.
- CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHIMIDT, F.J; WALSH, T.R. **Molecular characterization of a β -lactamase gene, bla_{GIM-1} encoding a new sub-class of Metallo- β -lactamase.** *Antimicrob Agents Chemother.* v. 48. p. 4654-4661. 2004.
- CASTRUCCI, F.M. **Relação Ancestral do Clone Endêmico de *Pseudomonas aeruginosa* produtor de SPM-1: Análise Comparativa entre Eletroforese em Campo Pulsátil e Tipagem por Seqüenciamento de Múltiplos Loci.** Tese de Mestrado. UNIFESP-EPM. 2005.
- CELENZA, G.; PELLEGRINI, C.; CACCAMO, M.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.. **Spread of bla_{CTX-M}-type and bla_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals.** *J. Antimicrob. Chemother.* v.57. p. 975–978. 2006.
- CEZARIO, R.C.; MORAIS, L.D.; FERREIRA, J.C.; COSTA-PINTO, R.M.; DARINI, A.L.C.; GONTIJO-FILHO, P.P. **Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in na adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital.** *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v.27. n.5. p. 269-74. 2009.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19.** CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- COCKERILL, F.R. **Genetic methods for assessing antimicrobial resistance.** *Antimicrob Agents Chemother.* v. 43. n.2. p.199-212. 1999.

COLLIS, C.M.; HALL, R.M. **Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons.** Antimicrob Agents Chemother. v. 39, n.1. p. 155-162. 1995.

CORNAGLIA, G.; AKOVA, M.; AMICOSANTE, G.; CANT'ON, R.; CAUDA, R.; DOCQUIER, J.; EDELSTEIN, M.; FRÈRE, J.; FUZI, M.; GALLEN, M.; GIAMARELLOU, H.; GNIADKOWSKI, M.; KONCAN, R.; LIBISCH, B.; LUZZARO, F.; MIRIAGOU, V.; NAVARRO, F.; NORDMANN, P.; PAGANI, L.; PEIXE, L.; POIREL, L.; SOULI, M.; TACCONELLI, E.; VATOPOULOS, A.; ROSSOLINI, G.M. **Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues.** Int J of Antimicrob Agents. v. 29. p. 380–388. 2007.

CRIVARO, V.; DI POPOLO, A.; CAPRIO, A.; LAMBIASE, A.; DI RESTA, M.; BORRIELLO, T.; SCARCELLA, A.; TRIASSI, M.; ZARRILLI, R. ***Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures.** BMC Infect Dis. v. 9. p. 70. 2009.

CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. **KPC carbapenemases: What issue in clinical microbiology?** Pathol Biol (Paris). 2009.

DA FONSECA, E.L.; VIEIRA, V.V.; CIPRIANO, R.; VICENTE, A.C. **Emergence of bla_{GES-5} in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil.** J Antimicrob Chemother. v. 59. n. 3. p. 576-7. 2007.

DECOUSSER, J.W.; POIREL, L.; NORDMANN, P. **Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*.** Antimicrob Agents Chemother. v. 45. p. 3595–3598. 2001.

DEPLANO, A.; DENIS, O.; POIREL, L.; HOCQUET, D.; NONHOFF, C.; BYL, B.; NORDMANN, P.; VINCENT, J.L.; STRUELENS, M.J. **Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*.** J Clin Microbiol. v. 43. p. 1198–1204. 2005.

DOCQUIER, J.D.; LUZZARO, F.; AMICOSANTE, G.; TONIOLO, A.; ROSSOLINI, G.M. **Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine- β -lactamase and VIM-2 metallo- β -lactamase.** Emerg. Infect. Dis. n. 7. p. 910–911. 2001.

DOCQUIER, J.D.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; GALLEN, M.; AMICOSANTE, G.; FRÈRE, J.M.; ROSSOLINI, G.M. **On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases.** J Antimicrob Chemother. v. 51. p. 257–266. 2003.

ECKERT, C.; GAUTIER, V. ; ARLET, G. **DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla_{CTX-M} genes.** J Antimicrob Chemother. v. 57. n.1. p.14-23. 2006.

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L. **Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals.** Antimicrob Agents Chemother. v.47. n. 12, p.3724-3732. 2003.

FARRA, A.; ISLAM, S.; STRALFORS, A.; SORBERG, M.; WRETLIND, B. **Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem.** Int J of Antimicrob Agents. v.31. p. 427-433. 2008.

FOXMAN, B.; RILEY, L. **Molecular epidemiology: focus on infection.** Am J Epidemiol. v. 153. n.12. p. 1135-41. 2001.

FRANKLIN, C.; LIOLIOS, L.; PELEG, A.Y. **Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory.** J Clin Microbiol. v. 44. n. 9. p. 3139-44. 2006.

FREITAS, A.L.; BARTH, A.L. **Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem.** Braz J Infect Dis. v. 6 n.1. p. 1-7. 2002.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; GORDON, K. A.; SADER, H. S.; WILKE, W. W.; BEACH, M. L.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V. **SENTRY Study Group Latin America. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998).** J Antimicrob Chemother, v.45. n.3. p.295-303. 2000.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL, R. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1977-1999.** Clin Infect Dis. v.32. p.146-155. 2001.

GALES, A.C., SADER, H.S.; JONES, R.N. **Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000).** Diagn Microbiol Infect Dis. v. 44. n. 3. p. 301-11. 2002.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. **Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase.** J Antimicrob Chemother. v. 52, p. 699-702. 2003.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. **Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004).** Clin Microbiol Infect. v.12. n.4. p. 315-21. 2006.

GARAU, J. GOMEZ, L. ***Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.** Curr Opin Infect Dis. v.16, n.2, p. 135-143. 2003.

GAYNES, R.; EDWARDS, J.R. **National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli.** Clin Infect Dis. v. 41. n. 6. p. 848-54. 2005.

GIAMARELLOU, H.; KANELLAKOPOULOU, K. **Current therapies for *Pseudomonas aeruginosa*.** Crit Care Clin. v.24, p. 261-278. 2008.

GOLD, H.S.; MOELLERING, R.C. **Antimicrobial Drug Resistance.** N Engl J Med. V. 335. p.1445-1453. 1996.

HAMMAMI, S.; GHOZZI, R.; BURGHOFFER, B.; ARLET, G.; REDJEB, S. **Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital.** Pathol Biol (Paris). v. 57. n. 7. p. 530-535. 2009.

HAWKEY, P.M.; JONES, A.M. **The changing epidemiology of resistance.** J Antimicrob Chemother. v.64. n.1. p. 3-10. 2009.

HELFAND, M.S.; BONOMO, R.A. **Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens.** Current Opinion in Pharmacology. v. 5. n. 5. p. 452-58. 2005.

HOBAN, D.J.; BIEDENBACH, D.J.; MUTNICK, A.H.; JONES, R.N. **Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000).** Diagn Microbiol Infect Dis. v. 45. p.279-285. 2003.

HOLLIS, R.J.; BRUCE, J.L.; FRITSCHER, S.J.; PFALLER, M.A. **Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* v. 34. n. 4. p. 263-268. 1999.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R. **Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types.** *Antimicrob Agents Chemother.* v.46. p.3045–3049. 2002.

JONES, R.N.; MASTERSON, R. **Determining the value of antimicrobial surveillance programs.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* v. 41. p. 171-175. 2001.

KATTAN, J.N.; VILLEGAS, M.V. ; QUINN, J.P. **New developments in carbapenems.** *Clin Microbiol Infect.* v. 14. p. 1102–1111. 2008.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C. **MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003.** *Braz J Infect Dis.* v. 9. n. 3. p. 216-24. 2005.

KISKA, D.L.; GILLIGAN, P.H. ***Pseudomonas*.** In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; Tenover, R.H. *Manual of Clinical Microbiology.* 8 ed. Washington, DC, ASM press. p. 719-28. 2003.

KOTSAKIS, S.D.; PAPAGIANNITIS, C.C.; TZELEPI, E.; LEGAKIS, N.J.; MIRIAGOU, V.; TZOUVELEKIS, L.S. **GES-13, a Beta-Lactamase Variant Possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2010.

LARAKI, N.; FRANCESCHINI, N.; ROSSOLINI, G.M.; SANTUCCI, P.; MEUNIER, C.; DE PAUW, E.; AMICOSANTE, G.; FRERE, J.M.; GALLEN, M. **Biochemical Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 Metallo- β -Lactamase IMP-1 Produced by *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother.* v. 43. p. 902–906. 1999.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. **Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother.* v. 43. p. 1584-1590. 1999.

LEE, S.C.; FUNG, C.P.; LIU, P.Y.; WANG, T.C.; SEE, L.C.; LEE, N.; CHEN, S.C.; SHIEH, W.B. **Nosocomial infections with ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome.** Infect Control Hosp Epidemiol. v. 20. p. 205-207. 1999.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. **Novel Acquired Metallo- β -lactamase gene, bla_{SIM-1}, a in Class 1 integron from *Acinetobacter baumani* Clinical Isolates from Korea.** Antimicrob Agents Chemother. v.49. p. 4485-4491. 2005.

LIVERMORE, D.M. **Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?** Clin Infect Dis. v. 34. p. 634–640. 2002.

LIVERMORE, D.M. **Has the era of untreatable infections arrived?** J Antimicrob Chemother v. 64. n. 1. p. 29–36. 2009.

LOCKHART, S.R.; ABRAMSON, M.A.; BEEKMANN, S.E.; GALLAGHER, G.; RIEDEL, S.; DIEKEMA, D.J.; QUINN, J.P.; DOERN, G.V. **Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004.** J Clin Microbiol. v. 45. n. 10. p. 3352-3359. 2007.

MALTEZOU, H.C. **Metallo- β -Lactamase in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?** Int J Antimicrob Agents. 2008.

MARRA, A.R.; PEREIRA, C.A.; GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; CAL, R.G.; DE SOUZA, J.M.; EDMOND, M.B.; FARO, C.; WEY, S.B. **Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology and clinical outcomes.** Antimicrob Agents Chemother. v. 50. n.1. p. 388-390. 2006.

MARTINS, S.T. **Análise de custos de internação de pacientes em unidade de terapia intensiva com infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes.** Dissertação de Mestrado. UNIFESP-EPM. 2002.

MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; BARTH, A.L. **Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil.** Infection. v.35. n.6. p.457-60. 2007.

MCGOWAN, J.E. **Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum.** Am J Med. v. 119. n. 6. p. 29-36. 2006.

MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.A.; RIBEIRO, J.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. **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.** Antimicrob Agents Chemother. v. 48. n. 12. p. 4693-4702. 2004.

MENEZES, L.C. **Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems isoladas em hospitais brasileiros: perfil de sensibilidade, detecção de metalo- β -lactamase e análise da similaridade genética.** Tese de Mestrado. UNIFESP-EPM. 2005.

MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; VAN ELDERE, J.; GLUPCZYNSKI, Y.; VAN LAETHEM, Y.; JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P.M.; VAN BAMBEKE, F. ***Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium.** Clin Microbiol Infect. v. 13, n. 6. p. 560-78. 2007.

MICHALOPOULOS, A.; FALAGAS, M.E. **Colistin and polymyxin B in critical care.** Crit Care Clin. v. 24. n. 2. p. 377-91. 2008.

MIRIAGOU, V.; CORNAGLIA, G.; EDELSTEIN, M.; GALANI, I.; GISKE, C.G.; GNIADKOWSKI, M.; MALAMOU-LADA, E.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; NAVARRO, F.; NORDMANN, P.; PEIXE, L.; POURNARAS, S.; ROSSOLINI, G.M.; TSAKRIS, A.; VATOPOULOS, A.; CANTÓN, R. **Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues.** Clin Microbiol Infect. v.16. n. 2. p.112-22. 2010.

MOELLERING JR., R.C. **Problems with antimicrobial resistance in gram-positive cocci.** Clin. Infect. Dis. v. 26. n. 5. p. 1177-1178. 1998.

MOET, G.J.; JONES, R.N.; BIEDENBACH, D.J.; STILWELL, M.G.; FRITSCHÉ, T.R. **Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004).** Diagn Microbiol Infect Dis. v. 57. n.1. p.7-13. 2007.

MURRAY, P. R.; BACON, E. J.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 8th ed. ASM Press, Washington, DC. Cap.47, p.719-725: *Pseudomonas*. 2003.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J.P.;
NORDMANN, P. **Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla_{KPC} gene.** Antimicrob Agents Chemother. v. 52. n. 4. p. 1257-63. 2008.

NORDMANN, P. S.; MARIOTTE, T.; NAAS, R.; LABIA, M.; NICOLAS, H.
Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. Antimicrob.Agents Chemother. v. 37. p. 939–946. 1993.

NORDMANN, P.; POIREL, L. **Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes.** Clin Microbiol Infect. v. 8. p.321-331. 2002.

NORDMANN, P.; NAAS, T. ; FORTINEAU, N. ; POIREL, L. **Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010.** Curr Opin Microbiol. v. 10. n.5. p. 436-440. 2007.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. **Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance.** Antimicrob Agents Chemother. v. 38, p. 71-78. 1994.

PAGÈS, J.M.; AMARAL, L. **Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria.** Biochim Biophys Acta. v. 5 .p. 826-833. 2009

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. **Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.** Clin Microbiol Rev. v.18. n.4. p. 657-686. 2005.

PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.D.A.G.; NOUÉR, S.A.; DE OLIVEIRA, M.P.; SAMPAIO, J.L.M.; FREITAS A.D.; FERREIRA, A.L.; AMORIM, L.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. **Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** J Clin Microbiol. v. 40. n.7. p. 2420-2424. 2002.

PELLEGRINO, F.L.P.C.; CASALI, N.; NOUÉR, S.A.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. **A carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain carrying the bla_{SPM} gene.** Diagn Microbiol Infect Dis. v. 61. p. 214–216. 2008.

PICÃO, R.C.; ANDRADE, S.S.; NICOLETTI, A.G.; CAMPANA, E.H.; MORAES, G.C.; MENDES, R.E.; GALES, A.C. **Metallo- β -Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP-, GIM-, SIM- SPM-, or VIM-Producing Isolates.** J Clin Microbiol. v. 46. n. 6. p. 2028–2037. 2008.

PICÃO, R.C. ; POIREL, L. ; GALES, A.C.; NORDMANN, P. **Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*.** Antimicrob Agents Chemother. v. 53. n. 5. p. 2225-6. 2009a.

PICÃO, R.C.; POIREL, L. ; GALES, A.C.; NORDMANN, P. **Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil.** Antimicrob Agents Chemother. v.53. n.9. p. 3908-13. 2009b.

PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H.S. **Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program.** Clin Infect Dis. v. 32, n. 2, p. 156-167. 2001.

PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; SAX, H.; DHARAN, S.; PESSOA-SILVA, C.L.; DONALDSON, L.; BOYCE, J.M. **WHO Global Patient Safety Challenge, World Alliance for Patient Safety. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices.** Lancet Infect Dis. v. 6. n.10. p. 641-52. 2006.

PITOUT J. D., HOSSAIN A., HANSON N. D. **Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.** J Clin Microbiol. v. 42. n.12. p. 5715-21. 2004.

PITOUT, J.D.D.; GREGSON, D.B.; POIREL, L.; MCCLURE, J.; LE, P.; CHURCH, D.L. **Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory.** J. Clin. Microb. vol. 43. n. 7, p. 3129–3135. 2005.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. **Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern.** Lancet Infect Dis. v. 8. p. 159–66. 2008.

POIREL, L.; NAAS, T.; DELPHINE, N.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J. D.; NORDMANN, P. **Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Born Gene from a *Pseudomonas***

aeruginosa **Clinical Isolate in France**. Antimicrob Agents Chemother. v. 44, p. 891-897. 2000a.

POIREL, L.; LE THOMAS, I.; NAAS, T.; KARIM, A.; NORDMANN, P. **Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae***. Antimicrob Agents Chemother. v. 44. n.3. p. 622–632. 2000b.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G.F.; NAAS, T.; DE CHAMPS, C.; DOVE, M.G.; NORDMANN, P. **GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem**. Antimicrob Agents Chemother. v. 45 n.9. p. 2598-603. 2001a.

POIREL L., NAAS T., LE THOMAS I., KARIM A., BINGEN E., NORDMANN P. **CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop**. Antimicrob Agents Chemother. v.45. n.12. p.3355-3361. 2001b.

POIREL, L.; NORDMANN, P. **Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamases and their Genetic Support**. Cur Pharmac. Biotech. v. 3, n.22. p. 117-127. 2002.

POIREL, L.; KAMPFER, P.; NORDMANN, P. **Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases**. Antimicrob Agents Chemother. v.46. p.4038–4040. 2002a.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G. F.; DE CHAMPS, C.; NORDMANN, P. **A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extend-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa**. J Antimicrob Chemother, v.49, p.561-565. 2002b.

POIREL, L.; MAGALHAES, M.; LOPES, M.; NORDMANN, P. **Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene bla_{SPM-1} surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil**. Antimicrob Agents Chemother. v. 48. n. 4. p. 1406-9. 2004.

POIREL, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. **Characterization of bla_{DIM-1}, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands**. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2009.

POLLACK, M. *P. aeruginosa*. In: Mandell, DaB. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5. New York: Churchill Livingstone, p. 2310-2335. 2000.

POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P.T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N.J.; MANIATIS, N.A. **Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with bla_{VIM} endemicity**. J Antimicrob Chemother. v. 56, p. 761–764. 2005.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. **Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases**. Clin Microbiol Rev v. 20. p.440-458. 2007.

RAHAL, J.J. ; URBAN, C. ; HORN, D. ; FREEMAN, K.; SEGAL-MAURER, S.; MAURER, J.; MARIANO, N.; MARKS, S.; BURNS, J.M.; DOMINICK, D.; LIM, M. **Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella***. Jama. v. 280, n.14, p. 1233-1237.1998.

RICE, L.B. ; ECKSTEIN, E.C. ; DEVENTE, J. ; SHLAES, D.M. **Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center**. Clin Infect Dis. v.23. p.118-124. 1996.

RICE, L.B. **Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics**. Pharmacotherapy. v. 19. Aug. n. 8, p.120S-128S. 1999.

RODRIGUEZ, M.M.; POWER, P.; RADICE, M.; VAY, C.; FAMIGLIETTI, A. **Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases**. Antimicrob Agents Chemother. v. 48. p.4895–4897. 2004.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. **Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa***. Antimicrob Agents Chemother. v.53. n.11. p.4783-4788. 2009.

ROSSOLINI, G.M.; DOCQUIER, J.D. Class B β -Lactamases. In: BONOMO, R.A.; TOLMASKY, M. **Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics. Mechanisms, Dissemination and Prospects for Inhibition**. ASM Press. Washington DC. p. 115-144. 2007.

SADER, H.S. ; HOLLIS, R.J. ; PFALLER, M.A. **The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases.** Clin Lab Med. v. 15, n. 2. p. 407-431. 1995.

SADER, H.S.; SAMPAIO, J.L.; ZOCCOLI, C.; JONES, R.N. **Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Three Brazilian Medical Centers.** Braz J Infect Dis. v. 3. p. 63-79. 1999.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. **Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Braz J Infect Dis. v. 5 n.4, p. 200-14. 2001.

SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. **Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Int J Antimicrob Agents. v. 25. n. 1. p. 57-61. 2005a.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. **IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** Clin Microbiol Infect. v. 11, n. 1. p. 73-76. 2005b.

SANBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 8^a ed. New York, USA, CSHL Press p. 8.25 a 8.27, 2001.

SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; PADILLA, B.; MARÍN, M.; RIVERA, M.; CERCENADO, E.; VIGIL, D.; SÁNCHEZ-LUNA, M.; BOUZA, E. **Contaminated feeding bottles: the source of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a neonatal intensive care unit.** Am J Infect Control. v. 37. n. 2. p. 150-4. 2009.

SATOH, R.; TSUKADA, H.; TANABE, Y.; TAMURA, Y.; YAMAMOTO, T.; TAKANO, M.; OZAKI, K.; TAMURA, T.; GEJYO, F. **An outbreak and isolation of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Niigata University Hospital, Japan.** J Infect Chemother. v.4. p.325-9. 2008.

SLAMA, T.G. **Clinical review: balancing the therapeutic, safety, and economic issues underlying effective antipseudomonal carbapenem use.** Crit Care. v.12. n. 5. 2008.

SEKIGUCHI, J.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. **KHM-1, a novel plasmid-**

mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother, v.52, n.11, p.4194-4197. 2008.

SENDA, K.; ARAWAKA, Y.; ICHIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; OHSUKA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. **PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad spectrum β -lactams.** J Clin Microbiol. v. 34, p. 2909-2913. 1996.

SHAH, P.M.; ISAACS, R.D. **Ertapenem, the first of a new group of carbapenems.** J. Antimicrob. Chemother. v. 52. p. 538–542. 2003.

SILBERT S, BOYKEN L, HOLLIS RJ, PFALLER MA. **Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea.** Diagn Microbiol Infect Dis. v. 4. p. 619-21. 2003.

SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. **Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli.** Infect Control Hosp Epidemiol. v. 25. n. 10. p.847-851. 2004.

SILVA, F. M.; SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C. **Antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazilian medical centers: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2001-2006).** IDSA, poster 521. 2007.

SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.L.; ZERVOS, M. J. **Application of molecular techniques to the study of hospital infection.** Clin Microbiol. v. 19. n. 3. p. 512-530.2006.

SLAMA, T.G. **Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay.** Critical Care. v. 12. p. 1-7. 2008.

SPIEGEL, C.A. Organismos Gram Negativos: No Enterobacteriaceae In: **Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.** Seattle. Editora Coordinadora. p.171-82. 2005.

SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. **Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe.** Euro Surveill. v. 13. n. 47. 2008.

- STRATEVA, T.; YORDANOV, D. ***Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance.** J Med Microbiol. v. 58. p. 1133–1148. 2009.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. **Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced By Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria For Bacterial Strain Typing.** J Clin Microbiol. v. 33, p. 2233-2239.1995.
- TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T. A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. **Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme.** J Antimicrob Chemother. v. 50. p. 673-679. 2002.
- TOLENTINO, F.M. **Detecção e Identificação dos genes de beta-lactamases bla_{SHV}, bla_{TEM} e bla_{CTX-M} em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 2009.
- TURNIDGE, J.; BELL, J.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. **Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western Pacific Region: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999.** Int J Antimicrob Agents. v. 20. n.1. p. 10-7. 2002.
- VERSALOVIC, J. ; KOEUTH, T. ; LUPSKI, J.R. **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** Nucleic Acids Res. v. 19, n. 24, p. 6823-31. 1991.
- VIANA, V.V.; DA FONSECA, E. L.; VINCENTE AC. **Metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil.** Clin Microbiol Infect. v. 11. n.11. p. 73-6. 2005.
- VIEDMA, E.; JUAN, C.; ACOSTA, J.; ZAMORANO, L.; OTERO, J.R.; SANZ, F.; CHAVES, F.; OLIVER, A. **Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain.** Antimicrob Agents Chemother. v. 53. n. 11. p. 4930-3. 2009.
- VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LOPEZ, J. A.; QUINN, J. P. Colombian Nosocomial Resistance Study Group. **First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase.** Antimicrob Agents Chemother, v.51, n.4, p.1553-1555. 2007.

- VOURLI, S.; P. GIAKKOUP, V.; MIRIAGOU, E.; TZELEPI, A.C.; VATOPOULOS, TZOUVELEKIS, LS. **Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical Enterobacteria.** FEMS Microbiol. Lett. v. 234. p. 209–213. 2004.
- WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. **Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm?** Clin Microb Rev. v. 18, p. 306-325. 2005.
- WANG, C.; CAI, P.; CHANG, D.; MI, Z. **A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase.** J Antimicrob Chemother. v. 57. n. 6. p. 1261-2. 2006.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. **Class A carbapenemases.** J Antimicrob Chemother. v. 60. n.3. p.470-82. 2007.
- WIDMER, A.F.; WENZEL, R.P.; TRILLA, A.; BALE, M.J.; JONES, R.N.; DOEBBELING, B.N. **Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker.** Clin Infect.Dis. v. 16, p.372-376. 1993.
- WOODS, D.E. **Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence.** Trends Microbiol. v. 12. p. 437–39. 2004.
- YAN, J.J.; HSUEH, P.; KO, W.; LUH, W.; TSAI, S.; WU, H.; WU, J.J. **Metallo- β -Lactamases in Clinical *Pseudomonas* Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme.** Antimicrob Agents Chemother. p. 2224–2228. 2001.
- YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. **Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.** Antimicrob. Agents Chemother. v. 45. p.1151–1161. 2001.
- YONG, D.; BELL, J. M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. **A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia.** Abstr 47th Intersci Conf antimicrob Agent Chemother, abstr. C1-593. p.75. 2007.
- YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T.R. **Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a**

novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. v. 53. n.12. p. 5046-54. 2009.

XAVIER, D.E.; GALES, A.C.; MENDES, R.E.; PIGNATARI, A.A.C.; CIRILO, L.F.; SANTOS FILHO, L.; CASTANHEIRA, M. **IMP-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): Increasing Diversity of Mobile Metallo-Beta-Lactamases (MBL) in Brazil.** In: 46th Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother. San Francisco, CA, 2006.

ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; GONÇALVES, A.L.; BARTH, A.L. **Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β - lactamase in a teaching hospital in southern Brazil.** J Antimicrob Chemother. v. 56, p.1148–1151. 2005.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; LI, J.; NATION, R.L. **Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.** J Antimicrob Chemother. v. 60. n. 6. p. 1206-15. 2007.