



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Dissertação de Mestrado

Paula Regina Luna de Araújo Jácome

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
***Pseudomonas aeruginosa* PROCEDENTES DE PACIENTES INTERNADOS EM**
HOSPITAIS DE RECIFE-PE

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

RECIFE - PE

2011

PAULA REGINA LUNA DE ARAÚJO JÁCOME

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Pseudomonas aeruginosa PROCEDENTES DE PACIENTES INTERNADOS EM
HOSPITAIS DE RECIFE-PE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Recife
2011

Jácome, Paula Regina Luna de Araújo

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife-PE / Paula Regina Luna de Araújo Jácome. – Recife : O Autor, 2011.
109 folhas; il., fig., tab.; 30 cm.

Orientador: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Carbapenemase. 3. Multirresistência. I. Maciel, Maria Amélia Vieira. I. Título.

UFPE

589.95

.CDD (20.ed.)

CCS2011-26



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

PAULA REGINA LUNA DE ARAÚJO JÁCOME

No dia 25 de fevereiro de 2011, às 09h00, na Sala de Aula da Sede do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a **Prof^ª. Dra. Vera Magalhães da Silveira** (Presidente da Banca - UFPE), a **Prof^ª. Dra. Janete Magali de Araújo** (UFPE) e a **Prof^ª. Dra. Nilma Cintra Leal** (CPqAM), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **PAULA REGINA LUNA DE ARAÚJO JÁCOME** sobre a sua Dissertação intitulada “**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROCEDENTES DE HOSPITAIS PÚBLICOS DO RECIFE-PE**”, a qual foi orientada pela **Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel** (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Nilma Cintra Leal

APROVADA

Vera Magalhães da Silveira
Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira

Janete Magali de Araújo
Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

Nilma Cintra Leal
Prof^ª. Dr^ª. Nilma Cintra Leal

Dedico esta dissertação ao meu marido Agenor Tavares Jácome Júnior, pelo companheirismo em todos os momentos, e por ser para mim um exemplo de profissional que ama o que faz e busca dar sempre o melhor de si.

Agradecimentos

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, cuidando de mim e me abençoando nos caminhos que Ele me faz trilhar.

Aos meus pais, Edna e Lustosa, pelo amor, carinho e compreensão, e por terem sido um exemplo em minha vida de retidão de caráter e honestidade.

Ao meu marido Agenor, por cada momento de companheiro exemplar, por todo incentivo, sabedoria, amor e por tornar a minha vida mais feliz e plena.

A minha orientadora Amélia Maciel, pela oportunidade que me foi confiada, mesmo quando ainda não me conhecia, e pela sensibilidade na condução deste trabalho. Sua generosidade me fortaleceu e me fez buscar cada vez mais o melhor de mim para alcançar os nossos objetivos.

A minha co-orientadora Ana Catarina Lopes, pelo conhecimento transmitido e pelas contribuições científicas deste trabalho, principalmente na parte molecular. Suas opiniões e seu preciosismo enriqueceram o processo construtivo desta dissertação.

A Adriane Borges, pela dedicação em me ensinar a prática da biologia molecular, não medindo esforços para dar o melhor de si. Sua generosidade é inspiradora, e sua amizade foi fundamental durante todo o período de mestrado, mesmo quando não nos encontrávamos mais, estávamos sempre em contato, apoiando e dando força sempre que a outra precisava.

A Lillian Rodrigues, pelo empenho nos experimentos, me ajudando sempre que possível, e pelos momentos de descontração fora do laboratório. Você foi para mim mais que uma aluna de iniciação científica, foi uma amiga.

A dona Dijanira, por ser uma mãe para todos nós que passamos pelo departamento de microbiologia da UFPE, cuidando com carinho e compreensão em todos os momentos, mesmo aqueles em que precisávamos de um tempinho maior para terminar os experimentos e ela pacientemente aguardava.

Aos amigos da Pós Graduação em Medicina Tropical, Veridiana Sales, Natália Moraes, Thacianna Costa, Rafaela Fernandes, Adriane Borges, Humberto Melo, Claudinha Abreu, Luciana Romagueira, Conceição Falcão, Moacir Jucá, Thomas Albuquerque, Heberton Teixeira, Carolina Matias, Cláudia Vidal, Ulisses Montaroyos, Rita Santos, Thaís Gelenske, Érico Higino, Liana Macedo, Jefferson Valença, Jéfferson Almeida, Patrícia Emery e outros que pagaram disciplina conosco. Pela troca de experiências dentro e fora das salas de aula, tornando o período das disciplinas momentos agradáveis e de crescimento coletivo.

Aos funcionários da Pós Graduação em Medicina Tropical pelo suporte, em especial a Walter Leite, por toda sua atenção e empenho em nos ajudar, até mesmo com ensinamentos que talvez nem fossem uma atribuição dele.

A todos os professores pelo conhecimento transmitido e em especial ao Professor Ricardo Ximenes por seu exemplo de competência e humildade, compartilhando de forma simples e clara, conhecimentos muitas vezes estigmatizados como complexos, além de sua dedicação na disciplina de Seminários Integrados, onde podemos perceber melhor sua sensibilidade em perceber o potencial de cada aluno e contribuir pertinentemente nos trabalhos, mesmo quando o assunto foge de sua área técnica.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	13
2. Revisão de Literatura	14
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.2 Patogenicidade e Fatores de Virulência	15
2.3 Resistência a Antimicrobianos	19
2.4 Carbapenêmicos	23
2.5 Mecanismos de Resistência aos Carbapenêmicos	24
2.5.1 Carbapenemases	25
2.5.1.1 Oxacilinases (Carbapenemases de Classe D)	26
2.5.1.2 Carbapenemases de Classe A	28
2.5.1.3 Metalo- β -lactamases (Carbapenemases de Classe B)	33
A) Metalo- β -lactamase da Subclasse IMP	35
B) Metalo- β -lactamase da Subclasse VIM	36
C) Metalo- β -lactamase da Subclasse SPM	38
D) Outras Metalo- β -lactamases	39
E) Metalo- β -lactamases no Brasil	40
2.6 Tipagem Molecular	43

3. Objetivos	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. Metodologia	48
4.1 Desenho do Estudo	48
4.2 Local do Estudo	48
4.3 Amostras Bacterianas	48
4.4 Análise dos Aspectos Microbiológicos	49
4.4.1 Avaliação da Produção de Pigmentos e Aspecto das Colônias	49
4.4.2 Avaliação da Produção de Gelatinase	49
4.4.3 Avaliação da Produção de Hemolisina	50
4.4.4 Avaliação do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos	50
4.4.5 Análise da Produção de MBL (Metallo- β -lactamases)	51
4.5 Análise Molecular das Amostras Bacterianas	52
4.5.1 Extração de DNA total	52
4.5.2 ERIC-PCR	53
4.5.3 Detecção dos Genes <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM}	53
4.5.4 Detecção dos Genes <i>bla</i> _{KPC}	54
5. Artigo 2: Caracterização fenotípica e molecular de fatores de resistência e virulência de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedentes de Recife, PE	55
6. Artigo 1: Primeiro relato de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora de KPC no Brasil	75
7. Considerações Éticas	81
8. Conclusões	81
9. Referências	82
ANEXO 1: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (Instruções aos autores)	100
ANEXO 2: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Instruções aos autores)	104

LISTA DE ABREVIATURAS

2-MPA	Ácido 2-Mercaptopropiônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
Bla	Genes de codificam de β -lactamases
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DHP-1	Desidropeptidase 1
ISCR	Insertion Sequence Common Region
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR
ESBL	Extended Spectrum β -lactamases
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
HBL	Hospital Barão de Lucena
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HR	Hospital da Restauração
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metalo- β -lactamase
MS	Ministério da Saúde
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
AIM-1	Australian imipenemase
DIM-1	Dutch imipenemase
GIM-1	German imipenemase
IMP	Imipenemase
KHM-1	Kyorin Hospital metalo- β -lactamase
NDM-1	New Delhi metallo- β lactamase
SIM-1	Seoul imipenemase
SPM-1	São Paulo Metalo- β -lactamase
VIM	Verona imipenemase
AMI	Amicacina
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacin
COM	Cefepime
GEN	Gentamicina
IPM	Imipenem
MPM	Meropenem
POL	Polimixina B
TAC	Ticarcilina/Ácido Clavulânico

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO:

Figura 1.	Fatores de Virulência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998)	16
Figura 2.	Representação da distribuição global de KPC β -lactamases (WALSH, 2010)	30
Figura 3.	Representação da distribuição global das metalo- β -lactamases móveis (WALSH, 2010)	35
Figura 4.	Representação da distribuição das metalo- β -lactamase no Brasil	40
Figura 5.	Representação esquemática do teste fenotípico para detecção da produção de enzimas metalo- β -lactamase	51
Figura 6.	Representação esquemática da técnica de extração de DNA utilizando o Kit de Extração Brazol (LGC Biotecnologia)	52

FIGURAS DO ARTIGO 1:

Figura 1.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de cinco hospitais públicos de Recife-PE, no período de 2006 a 2010.	62
Figura 2.	Frequência de isolados <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes provenientes de cinco hospitais públicos de Recife-PE, Brasil.	62
Figura 3.	Dendrograma de similaridade genética entre 61 isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de cinco hospitais públicos de Recife-PE entre 2006 e 2010, estimado pela técnica de ERIC-PCR.	64

FIGURA DO ARTIGO 2:

Figura 1.	Eletroforese dos produtos de PCR, a. Tipagem molecular por ERIC-PCR; b. Pesquisa do gene <i>bla</i> _{KPC} .	77
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO:

Tabela 1.	Sistema de Classificação das Carbapemenases	26
Tabela 2.	Novos critérios de ponto de corte para os carbapenêmicos, segundo CLSI (2010)	32
Tabela 3.	Dados dos primeiros exemplares de cada subclasse de MBL descritas até o momento	34
Tabela 4.	Relação dos iniciadores e controles positivos para a pesquisa de genes de MBL	54

TABELAS DO ARTIGO 1:

Tabela 1.	Frequência das características microbiológicas dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> de hospitais do Recife, no período de 2006 a 2010.	61
Tabela 2.	Frequência de antimicrobianos degradados por isolados multirresistentes	63

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista frequentemente associado a infecções nosocomiais e resistência a diversos antimicrobianos. O surgimento de mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, como a produção das enzimas carbapenemases MBL (metalo- β -lactamase) e KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), tem se destacado devido ao amplo espectro de degradação de antibióticos, levando à redução das opções terapêuticas. Este trabalho teve por objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* procedentes de cinco hospitais públicos do Recife coletados no período de 2006 a 2010. Características fenotípicas como morfologia da colônia, produção de pigmento, gelatinase e hemolisina, assim como o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram avaliados pelo crescimento em meios específicos e pelo método de disco difusão padronizado pelo CLSI (2008), respectivamente. Os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram submetidos à pesquisa de genes *bla*_{KPC}, e os resistentes a ceftazidima (CAZ) e/ou imipenem (IPM) foram investigados quanto à produção de MBL utilizando o método de disco aproximação com o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA), seguido pela pesquisa de genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} dentre os isolados MBL positivos no teste fenotípico. A investigação da relação clonal das amostras de *P. aeruginosa* foi realizada utilizando o método de sequências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC PCR). Durante o período da pesquisa foram obtidos 61 isolados de *P. aeruginosa*, dos quais 36,96% eram mucoides; 69,81% eram produtores de piocianina; 92,86% eram gelatinase positivos e 71,70% hemolisina positivo. A sensibilidade aos antimicrobianos variou entre 44,26% e 81,97%, para o aztreonam e polimixina B, respectivamente. Observou-se também que 4,92% dos isolados eram panresistentes e 54,09% multirresistentes, dos quais 34,14% eram sensíveis apenas a polimixina B. Dentre os 26 isolados resistentes aos carbapenêmicos, 7,65% foram positivos para o gene *bla*_{KPC}, enquanto que dentre os 29 isolados resistentes ao IPM e/ou CAZ, 44,83% foram positivos para pesquisa de MBL, e destes, 46,15% foram positivos para o gene *bla*_{SPM-1}, não havendo detecção dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. A tipagem molecular dos isolados revelou 21 perfis genéticos distintos. Os isolados KPC positivos pertenciam a um mesmo clone e dos isolados SPM-1 positivos, três apresentaram o mesmo perfil clonal e eram procedentes do mesmo hospital, enquanto os outros três isolados SPM-1 positivos apresentaram perfis clonais distintos. A capacidade de produção de MBL por *P. aeruginosa* tem sido detectada com elevada prevalência em hospitais da cidade do Recife nos últimos anos, porém a detecção de *P. aeruginosa* KPC positivas ainda é rara em todo o mundo, sendo esse o primeiro relato no Brasil.

Palavras Chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenemase, Multirresistência, Fatores de virulência.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen often associated with nosocomial infections and resistance to various antibiotics. The emergence of carbapenem resistance mechanisms such as production of enzymes MBL (metallo- β -lactamase) and KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), has been outstanding due to the wide spectrum of antibiotics degradation, leading to reduction of therapeutic options. This study aimed to characterize phenotypically and genotypically nosocomial isolates of *P. aeruginosa* from five public hospitals in Recife collected in the period 2006 to 2010. Phenotypic characteristics as colony morphology, pigment production, gelatinase and hemolysin as well as the profile of antimicrobial susceptibility were evaluated by growth in specific media and by the disk diffusion method standardized by the CLSI (2008), respectively. The carbapenem-resistant isolates were tested for *bla*_{KPC} genes, and resistant to ceftazidime (CAZ) and/or imipenem (IPM) were investigated for MBL production using the disk approximation method with 2-mercaptopropionic acid (2 - MPA), followed by research *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} among MBL positive isolates in the phenotypic test. The investigation of the clonal relationship of *P. aeruginosa* strains was performed using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC PCR). During the research period were obtained from 61 strains of *P. aeruginosa*, of which 36.96% were mucoid, 69.81% were pyocyanine producers, 92.86% were gelatinase positive and 71.70% hemolysin positive. The antimicrobial susceptibility varied between 44.26% and 81.97% for polymyxin B and aztreonam, respectively. We also observed that 4.92% of the isolates were panresistant, 54.09% multiresistant, and 34.14% of which were sensitive only to polymyxin B. Among the 26 isolates resistant to carbapenems, 7.65% were positive for *bla*_{KPC} genes, whereas among the 29 strains IPM and/or CAZ resistant, 44.83% were positive for MBL research, and of these, 46.15 % were positive for the *bla*_{SPM-1} gene, with no detection of genes *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}. Molecular typing of isolates revealed 21 distinct genetic profiles. KPC positive isolates belonged to one clone and the isolated SPM-1 positive, three had the same clonal profile and were from the same hospital, while the other three strains SPM-1 positive profiles were distinct clonal. The ability of MBL production by *P. aeruginosa* has been detected with high prevalence in hospitals in Recife in recent years, but the detection of *P. aeruginosa* positive KPC is still a rare throughout the world and this is the first report in Brazil.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenemase, Multidrug resistance, Virulence factors.

1. Introdução

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais patógenos causadores de infecções nosocomiais, responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos (TODAR, 2009; GAYNES; EDWARDS, 2005). Esta bactéria tornou-se um problema em potencial devido à capacidade de desenvolver mecanismos de resistência a diferentes classes de agentes antimicrobianos, podendo tornar-se resistente a todos os antibióticos utilizados no tratamento de rotina, o que representa um grande desafio para a terapia antimicrobiana (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2005; PICOLI, 2008; FUENTEFRIA *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009).

Os carbapenêmicos constituem uma importante classe de agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções graves causadas por *P. aeruginosa*, por serem eficazes contra isolados que apresentam resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (HUANG *et al.*, 2007; KHOSRAVI; MIHANIA, 2008). No entanto, a utilização indiscriminada de carbapenêmicos no ambiente hospitalar promove uma pressão seletiva sobre os microrganismos nosocomiais, o que favorece a seleção de subpopulações de isolados com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos (GALES *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2006).

Um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a síntese de enzimas capazes de hidrolisar esta classe de antimicrobianos, como as metalo- β -lactamases (MBL) e as enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; GRÄF *et al.*, 2008). Atualmente, a produção de enzimas carbapenemases é o mecanismo de maior relevância devido à crescente diversidade enzimática que tem sido observada nos últimos anos (FRITSCHÉ *et al.*, 2005; GRÄF *et al.*, 2008).

Com o intuito de aprimorar as ações de controle de infecção hospitalar, estudos têm sido realizados associando a identificação de genes de resistência aos antimicrobianos à utilização de métodos de genotipagem para identificação de semelhança genética entre os isolados.

Devido à escassez de estudos de tipagem bacteriana que conciliam a investigação da produção de enzimas carbapenemases como o estudo do perfil clonal de isolados de *P. aeruginosa* em hospitais do Recife, o presente estudo tem por finalidade caracterizar, fenotipicamente e genotipicamente, isolados de *P. aeruginosa* provenientes de hospitais públicos do Recife, a fim de identificar marcadores de resistência para guiar melhor a conduta terapêutica, bem como as medidas de vigilância de infecções hospitalares.

2. Revisão de Literatura

2.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Bactéria pertencente à família *Pseudomonadaceae*, que se caracterizam como bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com tamanho de 0,5-1,0µm por 1,5-4,0µm, não fermentadores de carboidratos, aeróbios estritos, móveis (apresentam um ou mais flagelos polares, dependentes de oxigênio molecular) e não produtor de esporos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; PITT; SIMPSON, 2006).

Seu diagnóstico de rotina é baseado no isolamento e identificação através da morfologia da colônia, produção de pigmentos e testes bioquímicos. Essa bactéria é comumente isolada em meios de cultivo enriquecido, como ágar sangue ou meio seletivo e diferencial como o ágar eosina azul de metileno (EMB) e cetiltrimetil cloreto de amônio (cetrímide), sendo este último específico para a *P. aeruginosa*, devido à particularidade deste microrganismo resistir aos compostos de amônia quaternária, como o cetrímide. A identificação da espécie pode ser feita inicialmente pelo exame macroscópico das colônias, avaliação da produção de pigmentos e odor peculiar de uva produzido pela piocianina. Em seguida, realiza-se a coloração de Gram, e uma bateria de testes bioquímicos que tem como resultado: fermentação de açúcares negativa, oxidação da glicose em meio basal (oxidase positivo), utilização de citrato como única fonte de carbono (citrato positivo), inabilidade de descarboxilar a lisina (lisina negativo) e incapacidade de utilização do aminoácido triptofano (indol negativo) (WINN *et al.*, 2008).

Suas colônias podem apresentar diversos morfotipos, até mesmo quando isoladas de um único paciente, sendo as colônias planas com bordas rugosas e com brilho metálico as mais frequentemente isoladas, embora também possam se apresentar pequenas e lisas, ou ainda colônias grandes e mucóides, estando esta última mais associada a pacientes com fibrose cística e outras infecções respiratórias crônicas (HÄUSSLER *et al.*, 1999; MARTÍNEZ; GOMES; GARAU, 2006; HOGARDT *et al.*, 2007; MENA *et al.*, 2008).

A *P. aeruginosa* é capaz de sintetizar diversos pigmentos hidrossolúveis, entre os quais inclui a pioverdina, piocianina, piorrubina e piomelanina. A pioverdina é um composto fluorescente também produzido por *P. fluorescens* e *P. putida*, já a piocianina é um pigmento azul fenazínico específico da *P. aeruginosa*, que quando combinado com a pioverdina gera uma coloração verde brilhante característica. Os outros dois pigmentos citados são mais raros, sendo a piorrubina de cor vermelha e a piomelanina de coloração marrom (KISKA; GILLIGAN, 2003;

FREITAS; BARTH, 2004). Essas substâncias, cuja produção é favorecida por temperaturas abaixo de 37° C e na presença de ferro no meio, têm demonstrado possuir atividade antibacteriana e efeito sobre a integridade do epitélio respiratório (TODAR, 2009; IWALOKUN *et al.*, 2006; KONG *et al.*, 2006).

2.2 PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua, de vida livre, encontrada naturalmente em ambientes úmidos como no solo, em vegetações e na água (PITT; SIMPSON, 2006). Raramente provoca doenças em indivíduos saudáveis, por isso é considerada um patógeno essencialmente oportunista, que acometem principalmente pacientes hospitalizados, causando infecções urinárias, dermatites, infecções respiratórias, sepse, além de outras consequências em pacientes imunocomprometidos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; WINN *et al.*, 2008).

As infecções também costumam ocorrer em locais onde existe tendência de acúmulo de umidade, como em queimaduras, orelha externa (“ouvido de nadador”), traqueostomia, cateter de demora e feridas cutâneas exsudativas, que se caracterizam pela apresentação de pus azulado com odor de uva característico, devido à produção de piocianina (WINN *et al.*, 2008).

Em crianças e neonatos, esta bactéria tem sido relacionada como um importante agente causador de infecções graves, levando a diversas consequências como sepse, infecções do trato urinário, pneumonia associada à ventilação, infecções de pele e mucosas, queimaduras e trauma, além de estar significativamente associada a casos crônicos de otite média supurativa e infecções respiratórias associadas à fibrose cística (WHO, 2008).

No Brasil, *P. aeruginosa* é uma importante causa de infecção nosocomial, sendo considerada a primeira causa de pneumonia nosocomial, principalmente nas unidades de terapia intensivas (UTIs) (SADER *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2004; FIGUEREDO-MENDES *et al.*, 2005; ZAVASKI *et al.*, 2006). A pesquisa de agentes prioritários de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes de terapia intensiva, realizada no período de julho de 2006 a junho de 2008 pela Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM, revelou que, em âmbito nacional, os isolados de *P. aeruginosa* representaram 11% do total de notificações, perdendo apenas para os *Staphylococcus* sp. e *Klebsiella pneumoniae*, no entanto, se considerarmos as notificações feitas nos seis hospitais de

Pernambuco estudados, as *P. aeruginosa* representaram 13%, perdendo apenas para o gênero *Staphylococcus* (ANVISA, 2009). Adicionalmente, em um estudo epidemiológico realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco revelou que, no período de janeiro a julho de 2008, a *P. aeruginosa* consistiu na primeira causa de infecção detectada neste hospital (26%), especialmente associado a infecções respiratórias (PIRES *et al.*, 2009).

O processo de infecção provocado pela *P. aeruginosa* se inicia com uma alteração ou a neutralização das defesas naturais do hospedeiro. A patogênese das infecções por *Pseudomonas* é multifatorial, causada por uma variedade de fatores de virulência que estão implicados nas três fases da infecção por esta bactéria, que são: (1) adesão e colonização bacteriana, (2) invasão local e (3) disseminação sistêmica da infecção, no entanto este processo pode ser interrompido em qualquer uma das etapas (TODAR, 2009).

O próprio epitélio lesionado predispõe a fixação e colonização de bactérias como a *P. aeruginosa*, que crescem naturalmente como um biofilme tanto em superfície tecidual, quanto associado a grandes glicoproteínas como as encontradas no muco do trato respiratório. No entanto, a forma como elas se aderem ao tecido pode variar de isolado para isolado ou depender da superfície aonde a bactéria irá se ligar (PITT; SIMPSON, 2006).

Fatores de superfície bacteriana, como flagelos, *pili*, e lipopolissacarídeo, bem como os processos ativos, tais como a formação de alginato/biofilme, quorum sensing e a secreção de produtos extracelulares como protease, elastase, fosfolipase, piocianina, exotoxina A, exotoxina S, exoenzimas, hemolisinas (ramnolipídios) e sideróforos, são determinantes importantes para o processo de infecção por *P. aeruginosa* (Figura 1) (MATHESON; POTEMPAM; TRAVIS, 2006; YATES *et al.*, 2006; ZULIANELLO *et al.*, 2006).

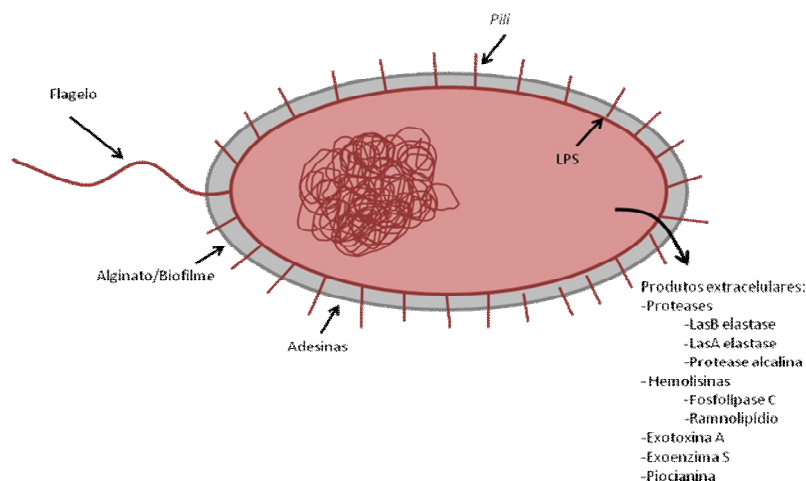


Figura1. Fatores de Virulência da *Pseudomonas aeruginosa* (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998).

Em *P. aeruginosa* existem cinco principais grupos de adesinas capazes de fixá-la aos diversos tecidos presentes no nosso organismo, são eles, o *pili*, a membrana externa que se liga ao muco, proteína F, lectinas de superfície e o alginato (PITT; SIMPSON, 2006).

Um dos mais importantes processos de adesão tecidual ocasionado por *P. aeruginosa* é a formação de biofilme, que confere a consistência mucoide a isolados desta espécie. O biofilme consiste em um polissacarídeo extracelular composto por um polímero acetilado de ácido beta-1,4-D-manurônico e ácido L-glicurônico, conhecido como alginato. A quantidade de cada uma destas moléculas confere a amostra maior ou menor viscosidade alterando as características macro e microscópicas das colônias (LINKER; JONES, 1964; PITT; SIMPSON, 2006). A característica mucoide apresentada por alguns isolados está intimamente associada a um mau prognóstico da infecção, pois o muco ajuda o microrganismo a crescer formando um biofilme, que serve como nicho protetor da bactéria contra o reconhecimento do sistema imune e a ação dos antibióticos, podendo induzir a cronificação da infecção (PEDERSEN, 1992; CIOFU *et al.*, 2008).

Outro fator de virulência importante consiste nos lipolissacarídeos (LPS) da parede celular, cuja grande diversidade de imunotipos permite subdividi-los em sorogrupos, podendo a identificação dos mesmos, ser um método de tipagem bacteriana. Os LPSs são também responsáveis pelas propriedades endotóxicas do microrganismo, sendo considerados a causa da síndrome séptica caracterizada por febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada e anomalias metabólicas (WINN *et al.*, 2008).

Outro componente importante para a instalação e cronificação da infecção é a produção de exotoxina A. Este fator de virulência, codificado pelo gene *toxA* e regulado por outros dois genes em um operon (WICK *et al.*, 1990), é considerado o fator mais tóxico secretado pela *P. aeruginosa* (SCHÜMANN *et al.*, 1998; SCHÜMANN; BLUETHMANN; TIEGS, 2000; WOLF; ELSÄSSER-BEILE, 2009). Seu mecanismo de ação ocorre através do bloqueio da síntese de proteínas por meio da ribosilação do ADP do fator de elongação 2 (PERENTESIS; MILLER; BODLEY, 1992), porém, a inibição da síntese protéica por toxinas não é suficiente para induzir a lise da célula alvo (MORIMOTO; BONAVIDA, 1992). Outra exotoxina produzida pela *P. aeruginosa* é a exotoxina S codificada pelo gene *exoS*. Isolados que carecem unicamente desse gene são menos virulentas em modelos animais, porém mais de 80% dos isolados possuem o gene *exoS* (LANOTTE *et al.*, 2004).

Mais um fator que contribui para a aderência e para a virulência desse microrganismo é a síntese de proteases extracelulares, como a elastase e a protease alcalina. Pesquisas com estas

enzimas mostram que em extratos purificados elas causam a necrose de tecidos conectivos por degradarem elastina, laminina e colágeno (HECK *et al.*, 1986). Estas enzimas também apresentam a capacidade de inativar componentes do complemento, clivar IgG e IgA, particularmente em pacientes com fibrose cística (DORING *et al.*, 1984; FICK *et al.*, 1985) e degradar citocinas, incluindo interleucina 2 (IL2), interferon γ (INF γ) e fator de necrose tumoral α (TNF α) (PARMELY *et al.*, 1990).

Conforme já mencionado, outro importante fator de virulência é a piocianina, pigmento fenazina azul produzido exclusivamente pela *P. aeruginosa*, que atua juntamente com o sideróforo ferripyochelin como um agente redutor, catalisando a formação de radicais hidroxila reativos e superóxidos, podendo causar lesão tecidual (PEDERSEN, 1992; BRITIGAN, 1993).

Mais um fator que contribui para a virulência em humanos, associada à inflamação, é a produção de gelatinase, classificada como uma proteinase capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos (KANEMITSU, *et al.*, 2001). A produção de gelatinase em isolados de *Enterococcus faecalis* tem se mostrado como um fator que contribui para a virulência em endocardites em modelo animal (VERGIS *et al.*, 2002). Isso pode ser vantajoso aos enterococos na hidrólise do colágeno do tecido subcutâneo no processo de infecção de ferida (KANEMITSU, *et al.*, 2001). Sechi *et al.* não detectaram atividade em isolados de *Acinetobacter baumannii* (SECHI *et al.*, 2004) em contraste, atividade gelatinase ocorreu em 12 isolados (14%) no estudo de Cevahir *et al.* 2008. Em *P. aeruginosa* a gelatinase contribui para a quebra de barreiras físicas das células hospedeiras, provocando lise celular (BRITIGAN *et al.*, 1993; CEVAHIR *et al.* 2008).

Por fim, outros dois fatores de virulência extracelulares que facilitam o rompimento da integridade epitelial, produzidos pela *P. aeruginosa*, são as hemolisinas fosfolipase C (termolábil) e o ramnolípídeo (termoestável). A primeira degrada principalmente fosfolípídeos que compõem o surfactante pulmonar, sendo um importante fator de virulência, particularmente para pacientes com infecções no trato respiratório causadas por esse microrganismo. Já o ramnolípídeo age como um detergente degradando fosfolípídeos e em altas concentrações, atrai e destrói leucócitos e ainda é capaz de inibir os movimentos ciliares do trato respiratório (WOODS; VASIL, 1994; TODAR, 2009).

Outra hemolisina com atividade citotóxica é a lecitinase, que junto com a fosfolipase C contribui para a invasão tecidual, através de seus efeitos citotóxicos sobre os eritrócitos, neutrófilos, linfócitos e outras células eucarióticas, provocando necrose através da lise celular (BERKA; VASIL, 1982; TODAR, 2009). Com o intuito de estimar a produção *in vitro* de

hemolisina entre 100 amostras de *P. aeruginosa* fenotipicamente diferentes isoladas de uma variedade de sítios de infecção, Vrane, Brkiê e Horonitz (2001) detectaram que 88% dos isolados eram produtores de hemolisina e que os sorotipos O1, O2, O3 e O16 produziam uma grande quantidade de hemolisina, enquanto a o sorotipo O11 produziu uma pequena quantidade (VRANE; BRKIÊ; HORONITZ, 2001). Já Stehling *et al.* (2008), buscaram avaliar se existe associação entre a consistência do isolado (mucoide e não mucoide) e a produção de hemolisina e outros fatores de virulência, e não observaram diferença significativa entre os dois grupos.

2.3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Frequentemente, isolados de *P. aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem). Por estas razões, infecções causadas por isolados de *P. aeruginosa* estabelecem um desafio para a terapia antimicrobiana (TODAR, 2009; FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

Este amplo espectro de resistência aos antimicrobianos apresentado pela *P. aeruginosa* se deve ao fato da mesma poder apresentar diversos mecanismos distintos de resistência a antimicrobianos ao mesmo tempo. Por ser uma bactéria que tem origem do solo, o convívio com outros microrganismos produtores naturais de antibióticos, como os actinomicetos, induz o desenvolvimento de uma resistência natural (TODAR, 2009).

O primeiro mecanismo de resistência apresentado pela *P. aeruginosa* é a baixa permeabilidade da parede celular e da membrana lipopolissacarídica externa que funcionam de barreira seletiva. A redução da permeabilidade celular pode ocorrer devido a mutações que bloqueiam a expressão das porinas OprD, impedindo a entrada de agentes nocivos na célula bacteriana, como alguns β -lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol e outros (LIVERMORE, 2002; TODAR, 2009). Além disso, a tendência desta bactéria de formar biofilmes protege as colônias contra concentrações terapêuticas dos antibióticos (CIOFU *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de resistência bacteriano envolve as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), moléculas de superfície responsáveis pela ligação cruzada de duas cadeias peptídicas unidas ao glicano, constituindo uma etapa importante na síntese da parede celular. No entanto, estas proteínas possuem forte afinidade por β -lactâmicos, antibióticos que bloqueiam a função das PBPs e estimulam a liberação de autolisinas, digerindo assim a parede celular existente

(MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; WINN *et al.*, 2008). Para impedir a ligação dos β -lactâmicos às PBPs, a *P. aeruginosa* promove a modificação destas proteínas, resultando no bloqueio do efeito antimicrobiano (SONG *et al.*, 1998).

Um terceiro mecanismo de resistência a antimicrobianos é hiper-expressão de bombas de efluxo, sendo a MexAB-OprM a bomba mais comumente sintetizada pela *P. aeruginosa*. Esta bomba é capaz de reduzir a concentração intracelular de diversos antimicrobianos através da ejeção ativa destes para fora da célula, incluindo os β -lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas, macrolídeos, além de vários corantes e detergentes nocivos a vida do microrganismo (POOLE; SRIKUMAR, 2001; LAMBERT, 2002; LIVERMORE, 2002).

Um quarto mecanismo de resistência bacteriana é a hidrólise de antimicrobianos através da produção de enzimas que se ligam irreversivelmente às moléculas antimicrobianas, inutilizando-as ou hidrolisando-as. As enzimas produzidas por esta bactéria são β -lactamases, cefalosporinases, carbapenemases e aminoglicosidasas, sintetizada a partir da expressão de genes cromossômicos e plasmidiais (LIVERMORE, 2002). A mobilidade genética pode ser ampliada através de transposons, que transportam os respectivos genes dos plasmídeos para os cromossomas; podendo ocorrer o inverso com menor frequência (TENOVER *et al.*, 1995; PITT, 1998). Nos últimos anos uma grande variedade de β -lactamases plasmidiais tem sido detectada em *P. aeruginosa*, incluindo β -lactamases de amplo espectro (ESBLs – Extended Spectrum β -Lactamases) e enzimas que hidrolisam carbenicilina. As ESBLs pertencem à classe A de Ambler (TEM, SHV, PER-1 e VEB-1) (NORDMAN; GUIBERT, 1998), enquanto as oxacilinases (OXA 2 a 19) e carbenicilinasas (CARB 3 e 4) pertencem à classe D de Ambler (POIREL; COLLET; NORDMANN, 2000).

Mais recentemente tem sido descrita a presença de um grupo particular de β -lactamases com um largo espectro de atividade, incluindo a hidrólise de carbapenênicos, droga considerada terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas disponíveis (GALES *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2005). Estas enzimas pertencem à classe B de Ambler, são codificadas por genes plasmidiais e ficaram conhecidas como metalo- β -lactamases (MBL) por fazerem parte do único grupo entre as β -lactamases que necessita de cátions divalentes (Zn^{++}) no seu sítio ativo, para servirem como co-fatores enzimáticos no mecanismo de inibição destes antibióticos (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005; LAGATOLLA *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2006; GANTA *et al.*, 2009; BUSH; JACOBY, 2010).

De fato, a combinação dos mecanismos de resistência descritos acima pode conferir à *P. aeruginosa* resistência a vários antimicrobianos, dando origem a um isolado multirresistente ou mesmo resistência a todos antimicrobianos anti-*Pseudomonas* conhecidos, dando origem a um isolado panresistente (LIVERMORE, 2002; LAYEUX *et al.*, 2010). Até o presente momento, não existe um consenso quanto à definição de *P. aeruginosa* multirresistente, foi estabelecida como isolados intermediários ou resistentes a três ou mais classes dos agentes anti-*Pseudomonas*: penicilinas/cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (TAM, *et al.*, 2010).

A emergência de bactérias multirresistentes é um problema que vem se ampliando e requer ações contínuas e mais eficazes para o controle das infecções nosocomiais. Relatórios do Programa de Vigilância Antimicrobiana na América Latina e Brasil (SENTRY Antimicrobial Surveillance Program) referem que entre as bactérias mais preocupantes em relação à multirresistência estão os bacilos gram-negativos não fermentadores – BGNNF – (*Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*) e as enterobactérias produtoras das ESBLs (SADER *et al.*, 2001).

Figueiredo *et al.* (2007) determinaram o padrão de susceptibilidade antimicrobiana, frequência de resistência a múltiplos fármacos e de resistência cruzada entre antimicrobianos de 304 isolados de *P. aeruginosa*, no período de setembro de 2004 a janeiro de 2006, em um estudo retrospectivo com coleta de informações em registros dos laboratórios de análises clínicas de dois hospitais públicos do Recife, o Hospital das Clínicas (HC) e o Hospital Agamenon Magalhães (HAM). Neste estudo, observou-se que no HC os antimicrobianos mais ativos contra os isolados foram os carbapenêmicos (imipenem: 62,7% e meropenem: 62,1% de susceptibilidade), já no HAM o composto mais ativo foi a piperacilina-tazobactam (66,1%), antibiótico testado apenas neste hospital. Considerando a análise agrupada dos dois hospitais, os antibióticos mais ativos contra *P. aeruginosa* foram respectivamente: aztreonam (59,8%), amicacina (59,4%), meropenem (58,2%) e imipenem (57,7%). Já a cefotaxima apresentou baixíssima sensibilidade contra os isolados dos dois hospitais (9,8%). Foi também observado que as taxas de resistência cruzada entre a amicacina e os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) variaram entre 32,4% e 33,3% em ambos os hospitais, enquanto que a resistência cruzada entre amicacina e os mesmos carbapenêmicos variou entre 37, % e 38,1%. Observou-se também que a frequência de isolados multirresistentes foi de 49,7%, dos quais 8,9% apresentou resistência a três antibióticos; 7,2% a quatro antibióticos; 5,6% a cinco antibióticos; 13,5% a seis antibióticos e 14,5% a sete ou mais antibióticos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Devido à elevada prevalência de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes e ao fato do tratamento com antibiótico inadequado ou demora no início da terapia anti-*Pseudomonas* estar intimamente associado a um pior prognóstico da infecção, vários estudos têm sugerido que o uso combinado de um aminoglicosídeo com um β -lactâmico (cefalosporinas de terceira geração, monobactâmico ou um carbapenêmico) leva a melhores resultados no tratamento, quando comparado com a monoterapia β -lactâmica, baseados no potencial sinergismo gerado por estas drogas “*in vitro*”, bem como na prevenção do desenvolvimento de resistência (HOLLANDER *et al.*, 1997; MOUTON, 1999; WU *et al.*, 1999). Em contrapartida, Leibovici *et al.* (1997), em estudo observacional prospectivo que comparava a monoterapia com a terapia combinada β -lactâmico-aminoglicosídeo para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*, observaram que o tratamento combinado não mostrou nenhuma vantagem sobre o tratamento com monoterapia β -lactâmico apropriada em pacientes não neutropênicos, com bacteriemia provocada por bactérias gram-negativas, porém, em pacientes neutropênicos o uso do tratamento combinado mostrou vantagens sobre o tratamento com um medicamento β -lactâmico (OR 0,2; IC_{95%} 0,05 a 0,07).

Devido às controvérsias apresentadas por diversos autores, Bodí e Garnacho (2007), realizaram uma meta-análise incluindo vários estudos randomizados que avaliavam o uso da monoterapia comparada à terapia combinada com dois ou mais antibióticos. Os pesquisadores concluíram que parece razoável a indicação da antibioticoterapia empírica utilizando dois antibióticos ativos contra *P. aeruginosa* em pacientes com risco de infecção por este patógeno, durante os primeiros três a cinco dias, enquanto se aguarda os resultados dos estudos microbiológicos. Caso a evolução clínica seja favorável e a etiologia do patógeno esteja esclarecida, é preferível passar para uma monoterapia adequada, porém caso a evolução não seja favorável e não haja disponibilidade dos resultados microbiológicos, parece aconselhável continuar com a terapia de combinação, além de descartar outras causas de má evolução. No entanto, os autores afirmam que existe a necessidade de novos estudos prospectivos, randomizados em pacientes em estado crítico para avaliar quais as combinações de antibióticos podem melhorar a evolução das infecções por *P. aeruginosa*.

2.4 CARBAPENÊMICOS

Os carbapenêmicos são agentes antimicrobianos β -lactâmicos com amplo espectro de atividade, considerados os mais potentes usados no tratamento de infecções por bactérias gram-negativas devido ao seu amplo espectro de atividade, estabilidade à hidrólise ocasionada pela maioria das β -lactamases, incluindo as de espectro ampliado (ESBLs), e por apresentar boa penetração na maioria dos sítios de infecção (LIVERMORE, 1995; YAN *et al.*, 2001; ANVISA, 2007).

O primeiro carbapenêmico introduzido na prática clínica a partir de 1980 foi o imipenem. Também conhecido como N-formamidoil tienamicina monohidratado, o imipenem é um derivado semissintético das tienamicinas (composto produzido pela bactéria filamentosa *Streptomyces cattleya*), com substituições de grupos metila para dar maior estabilidade contra as enzimas β -lactamases e aumentar sua atividade bactericida (BONFIGLIO; RUSSO; NICOLETTI, 2002; NAMVAR *et al.*, 2010). No entanto, o imipenem é suscetível à degradação pela enzima desidropeptidase-1 (DHP-1) localizada nos túbulos renais, tornando necessária sua administração concomitante com um inibidor da DHP-1 como cilastatina. Mais tarde, outros carbapenêmicos como meropenem, ertapenem e doripenem demonstraram maior estabilidade ao DHP-1, sendo estes administrados sem a cilastatina (ZHANEL *et al.*; 2007).

As principais proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) inibidas pelos carbapenêmicos são as enzimas de alto peso molecular 1a, 1b, 2 e 3 (SUMITA; FUKASAWA, 1995; BONFIGLIO; RUSSO; NICOLETTI, 2002). A inibição da PBP 1A e 1B resulta na formação de esferoplastos e mata as bactérias de forma rápida; a inibição da PBP 2 faz com que os organismos cilíndricos se tornem esféricos; já a inibição da PBP 3 resulta na formação de filamentos (CURTIS *et al.*, 1979; HAYES; ORR, 1983). Em *P. aeruginosa*, o imipenem e o meropenem apresentam maior afinidade pelas PBPs tipo 2 e tipo 3, respectivamente (CORNAGLIA *et al.*, 1995). Já o doripenem pode se ligar às PBPs 1a, 1b, 2 e 3, no entanto, apresentam maior afinidade às duas últimas (DAVIES *et al.*, 2008).

No que se refere à atividade antimicrobiana, o imipenem e o meropenem possuem um amplo espectro de ação *in vitro*, incluindo atividade contra cocos Gram-positivos, bacilos gram-negativos e bactérias anaeróbias, com exceção de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e *Stenotrophomonas maltophilia*, sendo o meropenem um pouco mais ativo contra bactérias gram-negativas, ao passo que o imipenem apresenta atividade um pouco superior contra Gram-positivos. Já o ertapenem apresenta um espectro de ação mais limitado,

não exibindo atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *A.baumannii* (ANVISA, 2007; ZHANEL *et al.*; 2007; MOHR, 2008).

A partir de 2007, o doripenem se tornou o mais novo dos antibióticos carbapenêmicos aprovado pela Food and Drug EUA Administration (FDA), para o manejo de pacientes com infecções complicadas intra-abdominais e infecções complicadas do trato urinário, incluindo pielonefrite. É considerado um antibiótico de amplo espectro com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas aeróbicas, incluindo isolados multirresistentes, bem como contra uma variedade de anaeróbios (MATTHEWS; LANCASTER, 2009).

Apesar de seu amplo espectro de atuação, os carbapenêmicos devem ser utilizados apenas no tratamento de infecções em que exista uma forte suspeita de microbiota aeróbia e anaeróbia ou infecções causadas por organismos multirresistentes, não sendo indicados como primeira escolha no tratamento empírico de infecções comunitárias ou hospitalares (ANVISA, 2007). Isso se deve ao fato de que a utilização indiscriminada de carbapenêmicos no ambiente hospitalar promove uma pressão seletiva sobre os microrganismos nosocomiais, favorecendo a seleção de subpopulações de isolados com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos (GALES *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2006).

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

Diferentes mecanismos de resistência aos carbapenêmicos têm sido descritos na literatura (LIVERMORE *et al.*, 2002). Segundo Pai *et al.* (2001), o principal determinante da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* ocorre por um mecanismo dependente da expressão continuada da β -lactamase AmpC, enzima que induz a baixa expressão de porinas OprD, reduzindo a permeabilidade da membrana externa a estes antibióticos. A β -lactamase do tipo AmpC, é produzida por todos os isolados de *P. aeruginosa*, cuja expressão de genes cromossômicos é induzida por agentes como benzilpenicilinas, ampicilina e a maioria das cefalosporinas de 1ª geração, que são hidrolisados rapidamente por ação desta enzima (LIVERMORE, 1989).

Outro mecanismo de resistência à carbapenêmicos importante, que está mais associado à resistência ao meropenem e não ao imipenem é a superexpressão do sistema de efluxo MexAB-OprM, que promove a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da bactéria (POOLE *et al.*, 1993; LIVERMORE, 1995; PAI *et al.*, 2001).

A hidrólise do anel β -lactâmico constitui um mecanismo de resistência adicional, que aumenta seus efeitos na resistência à ação dos sistemas de efluxo e da baixa permeabilidade celular (FERREIRA, 2005). As β -lactamases responsáveis pela hidrólise dos carbapenêmicos são conhecidas como carbapenemases. Nos últimos 10 anos tem havido um aumento substancial de relatos de carbapenemases, principalmente de MBLs e, em menor grau, enzimas pertencentes à classe A (HAWKEY; JONES, 2009; LIVERMORE, 2009; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

Devido a discretas diferenças, com relação ao mecanismo de resistência entre os carbapenêmicos, é possível encontrar isolados sensíveis a um carbapenêmico resistentes ao outro. Esse fenômeno é relativamente raro e está relacionado a mecanismo de resistência que envolve as porinas, mas tem sido descrito principalmente em isolados de *P. aeruginosa* (ANVISA, 2007).

Nos últimos 15 anos, tanto a indústria como o meio acadêmico vêm tentando desenvolver novos inibidores da MBL, todavia, estas tentativas ainda não produziram nada que, nem remotamente se aproximasse da fase 1 de ensaios clínicos. Desta forma, a perspectiva de lançamento de um novo fármaco de utilização clínica é que pelo menos oito anos (MURPHY *et al.*, 2006; HIRAIWA *et al.*, 2009; MINOND *et al.*, 2009; SHAHID *et al.*, 2009).

2.5.1 CARBAPENEMASES

Desde a descoberta das carbapenemases em bactérias clinicamente importantes no início de 1990 no Japão, estas enzimas tem atraído atenção crescente dentre as β -lactamases, por apresentarem a elevada versatilidade e ampla atividade hidrolítica, podendo hidrolizar todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, as cefalosporinas de 3º e 4º geração e os monobactâmicos (MINAMI *et al.*, 1996; QUEENAN; BUSH, 2007).

As carbapenemases pertencem a três classes moleculares, distinguíveis pela conformação de seu sítio ativo, classificadas em carbapenemases de classe A, as de classe B ou metalo- β -lactamase e as de classe D ou oxacilinases (BUSH; JACOBY, 2010), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas de Classificação das Carbapenemases

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Grupo Bush-Jacoby (1995)	Classe molecular (subclasse)	Inibido por		Característica definidora	Enzimas representativas
			CA ou TZB	EDTA		
2df	NI	D	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23 e OXA-48
2f	2f	A	Variável	Não	Hidrólise aumentada de carbapenêmicos, oxyimino β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	3	B (B1)	Não	Sim	Largo espectro de hidrólise, incluindo carbapenêmicos, mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, SPM-1, IND-1

Nota: CA (ácido clavulânico); TZB (tazobactam); NI (não incluído).
 Fonte: BUSH; JACOBY, 2010.

2.5.1.1 OXACILINASES (CARBAPENEMASES DE CLASSE D)

As oxacillinases são β -lactamases pertencentes à classe D, a qual se subdivide em três subclasses: 2d, que confere resistência a cloxacilina; 2de que confere resistência às cefalosporinas de espectro estendido e 2df, que confere resistência aos carbapenêmicos (BUSH; JACOBY 2010).

As que exibem atividade carbapenemase são frequentemente encontradas em *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, embora haja crescentes relatos de *Enterobacteriaceae*, em particular, *Klebsiella pneumoniae* (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006; HIGGINS *et al.*, 2010; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Curiosamente, a propagação de *Acinetobacter* spp. carbapenemase-positiva parece ser devido à difusão de determinados clones de bactérias (ZHOU *et al.*, 2007; STOEVA *et al.*, 2008), diferente das carbapenemases de classe D em *Enterobacteriaceae*, que são disseminadas de cepa para cepa a partir de plasmídeos (CARRER *et al.*, 2010).

O nível de atividade carbapenemase exibida pelas oxacillinases é consideravelmente mais fraco, quando comparado à atividade hidrolítica das MBL, e isolados que exibem as oxacillinases requerem mecanismos adicionais de resistência para causar um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos (TOWNER; LVI; VLASSIADI, 2008).

Baseado apenas na homologia de sequência gênica, carbapenemases de classe D podem ser divididas nos seguintes grupos: OXA-23 (inclui OXA-27 e OXA-49), OXA-24 (inclui OXA-25, OXA-26 e OXA-40) e OXA-58 (WALSH, 2008; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006; POIREL; NORDMANN, 2006; MUGNIER *et al.*, 2010). Outros grupos menores, como a OXA-72 e OXA-143, agora estão surgindo e se tornando cada vez mais clinicamente importantes (HIGGINS *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2009). O grupo OXA-23 tem sido relatado em todo o mundo e é particularmente importante em determinadas regiões geográficas, incluindo a China, onde tem sido relatada recentemente uma rápida disseminação clonal (STOEVA *et al.*, 2008; ZONG *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2010). Os resultados de Poirel *et al.*, mostrando que o gene *bla*_{OXA-23} em isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de *Acinetobacter radioresistens*, juntamente com o fato de que o gene *bla*_{OXA-23} foi encontrado em *A. baumannii* ambientais, sugere possíveis nichos de transferência de genes (POIREL *et al.*, 2008; GIRLICH ; POIREL; NORDMANN, 2010).

O grupo OXA-24 pode ser cromossômico ou plasmidial e aparece menos difundido do que OXA-23, geralmente com relatos restritos à Europa e Estados Unidos (MENDES *et al.*, 2009). Recentemente, o ambiente genético de *bla*_{OXA-24} tem sido pesquisado, apresentando como resultados a existência de um número de sítios de recombinação significativamente diferente do *bla*_{OXA-23} (LIN *et al.*, 2010; MERINO *et al.*, 2010). O terceiro grupo, OXA-58, é geneticamente diferente e têm sido relatados em muitos países ao redor do mundo, com surtos esporádicos (POIREL *et al.*, 2006; CASTANHEIRA *et al.*, 2008; HIGGINS *et al.*, 2010).

Enquanto que o grupo OXA-48 não é um carbapenemase forte e, um pouco mais evidenciado como carbapenemase entre as *Enterobacteriaceae*, pois depende de outros mecanismos sinérgicos para mediar a resistência contra os carbapenêmicos (por exemplo, mutações membrana externa e bombas de efluxo) (GULMEZ *et al.*, 2008).

Em *P. aeruginosa*, várias enzimas OXA-tipo têm sido descritas, no entanto, poucos trabalhos relatam enzimas OXA-tipo com atividade carbapenemase. Até pouco tempo, apenas a oxacillinase OXA-50 havia sido descrita como uma enzima com propriedades carbapenemase, expressa constitutivamente por isolados de *P. aeruginosa*, com uma homologia de 44% a OXA-23 e 43% a OXA-27, carbapenemases de *A. baumannii* (SEVILLANO; GALLEGOS; GARCÍA-LOBO, 2009). Apesar da OXA-50 conferir sensibilidade diminuída à ampicilina, ticarcilina, moxalactam e meropenem, esta enzima não contribui significativamente para o padrão global de suscetibilidade a β -lactâmicos em *P. aeruginosa* (GIRLICH; NAAS; NORDMANN, 2004).

Em 2009, na Espanha, foi feito o primeiro relato da carbapenemase OXA-40 carbapenemase presente em isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e localizado seu gene de codificação em um plasmídeo também encontrado em *A. baumannii*, possibilitando assim, disseminação entre outras espécies clinicamente importantes (SEVILLANO; GALLEGO; GARCÍA-LOBO, 2009).

2.5.1.2 CARBAPENEMASES DE CLASSE A

As carbapenemases pertencentes à classe A, também classificadas como β -lactamases do grupo funcional 2, subgrupo 2f (BUSH; JACOBY 2010), podem ser divididas em cinco grandes grupos, baseado principalmente na filogenia: GES, KPC, SME, IMI e NMC-A (QUEENAN; BUSH, 2007, WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007).

As carbapenemases de classe A tipo SME, IMI e NMC são enzimas codificadas por genes de localização cromossômica, capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, porém, não hidrolisam as cefalosporinas. Estas enzimas podem ser induzidas em resposta ao uso de imipenem e cefoxitina, porém, raramente são encontrados, sendo mais comuns em espécies de *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae* (POTTUMARTHY *et al.*, 2003; QUEENAN *et al.*, 2006; QUEENAN; BUSH, 2007). Embora os relatos destas enzimas tenham crescido nos últimos anos, não há dados recentes destas carbapenemases em isolados de *P. aeruginosa* (WALSH, 2008).

O grupo de β -lactamases tipo GES compreende onze enzimas, das quais apenas quatro (GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6) apresentam alguma atividade mensurável para os carbapenêmicos (PICÃO; GALES, 2008; LAHEY, 2011). A enzima GES-2 possui uma única alteração de aminoácido quando comparada a GES- 1; no entanto, essa alteração ampliou o espectro de atividade da enzima, que passou a hidrolisar imipenem, além das cefalosporinas de amplo espectro (PICÃO; GALES, 2008). Assim como as enzimas tipo SME, IMI e NMC, as carbapenemases tipo GES têm sido relatadas de forma esporádica, tendo sido identificadas amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas no Japão, GES-4 (WACHINO *et al.*, 2004); e na China, GES-5 (WANG *et al.*, 2006).

Atualmente, o subgrupo clinicamente mais importante dentre as carbapenemases do grupo A é o da enzima KPC, que compreende 11 variantes identificadas até o momento (NORDMANN;

CUZON; NAAS, 2009; LAHEY, 2011). A KPC está envolvida em surtos endêmicos e pseudo-endêmicos em regiões dos Estados Unidos da América (EUA) e Israel, que em alguns casos foram causados por clones relacionados (WOODFORD *et al.*, 2004; LEAVITT *et al.*, 2007; NAVON-VEENZIA *et al.*, 2009; HIRSCH; TAM, 2010). Outra área com altas taxas de prevalência é a província de Zhejiang, da China continental, embora isto ocorra provavelmente devido a sistemas de vigilância inconsistentes em diferentes regiões e, portanto, pode se prever que as taxas de outras províncias, são mais elevadas do que as estimadas (ZHANG *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010). O mesmo vem acontecendo na Europa, onde as enzimas KPC vêm sendo cada vez mais detectadas, porém, é impossível determinar se este crescimento é devido ao aumento na prevalência ou maior conscientização da notificação dos casos (WALSH, 2010). A Figura 2 apresenta a distribuição de isolados KPC-positivo, detectados em diversas espécies.

Isolados KPC-positivos são capazes de hidrolisar diversos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, no entanto, são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (GOREN *et al.*, 2010; PEIRANO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2008). Observa-se também que o CIM dos carbapenêmicos diminui na presença de ácido clavulânico, devido à inibição da enzima (QUEENAN; BUSH, 2007).

Diversos estudos demonstram que isolados de *Klebsiella pneumoniae* KPC-positivos apresentam redução da susceptibilidade ou resistência a todos os β -lactâmicos, além de serem resistentes a ciprofloxacina, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (BRATU *et al.*, 2005; ROCHE *et al.*, 2009; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007) e sensíveis a polimixina B e tigeciclina (LEAVITT *et al.*, 2007; URBAN *et al.*, 2008). Este perfil de resistência limita as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves, restringindo ao uso de tigeciclina e polimixinas (MONTEIRO *et al.*, 2009).

Perfil de susceptibilidade semelhante tem sido observado em isolados de *P. aeruginosa* KPC-positivos, sendo frequente a ocorrência de isolados resistentes a todos os β -lactâmicos e sensíveis apenas aos polipeptídeos (polimixina B e colistina) ou a um polipeptídeo concomitante aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) (VILLEGAS *et al.*, 2007; AKPAKA *et al.*, 2009; POIREL *et al.*, 2010a). Em uma amostra de 37 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de hospitais de Porto Rico, Wolter *et al.* (2009) detectaram que 64,86% (24/37) eram KPC-positivos e que estes apresentavam elevadas CIM para imipenem, meropenem, ceftazidima e piperacilina-tazobactam.

Até o momento, a mobilização do gene *bla*_{KPC} ocorreu através de uma combinação de transferência de plasmídeos e do transposon Tn4401, sempre associados ao gene carbapenemase, embora os elementos adicionais de inserção de outros transposons possam alterar seu ambiente genético imediato (GOOTZ *et al.*, 2009; ROBLEDO *et al.*, 2010). A disseminação das enzimas KPC para além dos Estados Unidos tem ocorrido através da dinâmica da população humana, como mostrado o estudo de Dortet *et al.* (2008) que relataram isolados KPC-positivo (KPC-2) oriundos da França após o paciente ter sido admitido e ter recebido tratamento em um hospital de Nova York (WALSH *et al.*, 2010).

Ao contrário das enzimas GES, todas as enzimas KPC demonstram atividades carbapenemase, e só tinham sido encontradas em *Enterobacteriaceae*, todavia, as KPC foram recentemente identificadas e caracterizadas a partir de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* na Colômbia – KPC-2 (VILLEGAS *et al.*, 2007), Porto Rico – KPC-5 (WOLTER *et al.*, 2009) e nos Estados Unidos – KPC-2 (POIREL *et al.*, 2010a), assim como também no complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* isolados em Porto Rico (ROBLEDO *et al.*, 2010).

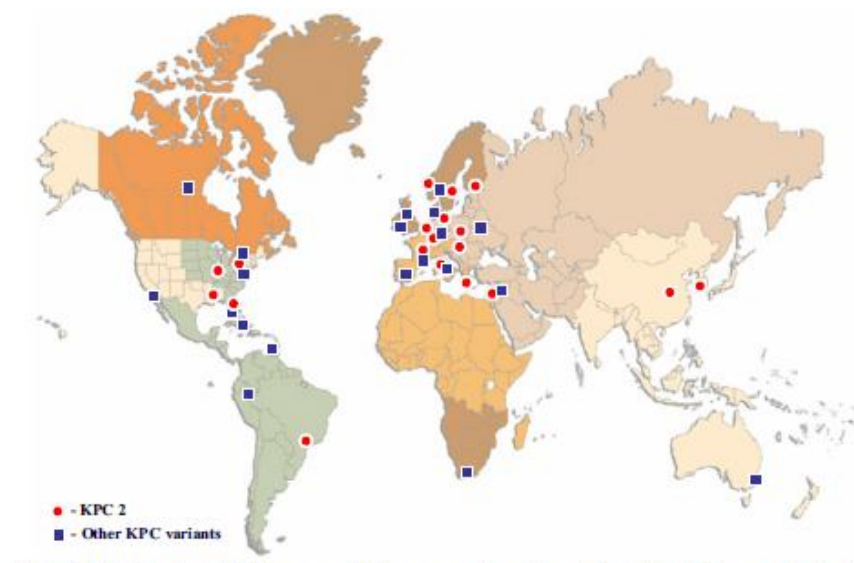


Figura 2. Representação da distribuição global de KPC β -lactamases (WALSH, 2010).

Na *P. aeruginosa* colombiana, observou-se que o gene KPC-2 isolado era codificado cromossomicamente, no entanto, no isolado dos Estados Unidos o mesmo gene está presente em um pequeno plasmídeo de 66 kb, que foi transferido para uma cepa de laboratório de *Escherichia coli*. Este fenômeno não é comum e sugere que a propagação deste plasmídeo ocorrendo naturalmente para espécies de *Enterobacteriaceae* prosseguirão (VILLEGAS *et al.*, 2007).

No complexo *A. calcoaceticus-baumannii* a KPC foi revelada através da análise de 274 isolados de *Acinetobacter* multi-resistentes em 2009, onde 10 (3,4%) foram identificados como KPC-positivos (ROBLEDO *et al.*, 2010). Curiosamente, os dados do sequenciamento mostraram que KPC-3 estava presente em sete isolados; KPC-4, KPC-2 e uma KPC-10 em um isolado de cada (ROBLEDO *et al.*, 2010). Este resultado revela um grande contraste com os dados apresentados para a família *Enterobacteriaceae*, onde, particularmente na Europa, KPC-2 é a variante dominante (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; MIRIAGOU *et al.*, 2010).

No Brasil, o primeiro relato de detecção da enzima KPC foi o isolamento de cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, a partir de amostras clínicas de sangue e urina coletadas de quatro pacientes distintos, internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital terciário da cidade do Recife, no período de setembro a novembro de 2006, onde foram observados dois perfis genéticos distintos, através de eletroforese de campo pulsado (MONTEIRO *et al.*, 2009). Também foram publicados casos de infecção por *K. pneumoniae* KPC-positiva no Rio de Janeiro ocorridos no período entre 2007 e 2008 (PEIRANO *et al.*, 2009) e um caso de *Serratia marcescens* KPC-positiva, também no Rio de Janeiro em 2010 (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010). No entanto, até o presente momento, ainda não há relato, publicado na literatura científica, do isolamento de *P. aeruginosa* KPC-positiva no Brasil.

Em 2010, diversos surtos de infecção por isolados KPC-positivos foram noticiados em jornais e revistas em todo o Brasil, porém ainda não há publicação científica destes casos. Segundo dados do Ministério da Saúde MS, publicados no Portal da Saúde, de janeiro a outubro de 2010 ocorreram 12 casos confirmados em Minas Gerais, 03 casos confirmados no Espírito Santo, 04 casos confirmados em Goiás, 03 casos confirmados em Santa Catarina, 70 casos confirmados e 24 mortes em São Paulo, 183 casos confirmados e 18 mortes no Distrito Federal, 18 casos confirmados na Paraíba, e 24 casos confirmados no Paraná, todos restritos a pacientes hospitalizados e com baixa imunidade (MS, 2010a). Em novembro de 2010, o MS divulgou o surgimento de dois casos confirmados e uma morte em São Luís do Maranhão e publicou também que o número de casos confirmados no Distrito federal aumentou para 246, dos quais 63 pacientes desenvolveram infecção grave e 22 foram a óbito (MS, 2010b; MS, 2010c). E em janeiro de 2011 a Secretaria de Saúde de Pernambuco noticiou que, do final de outubro a dezembro de 2010, o número de casos suspeitos de infecção por isolados KPC foi de 58 casos, dos quais apenas 35 foram confirmados, afirmou ainda que o número de mortes suspeitas de infecção por KPC foi de 12 óbitos, no entanto apenas cinco foram confirmados (MS, 2011).

A prevenção e o controle da emergência de isolados KPC-positivos são de complexa execução, tendo em vista que estes isolados produzem um baixo nível de resistência aos carbapenêmicos, dificultando a detecção laboratorial desta resistência nos laboratório de microbiologia clínica (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). A identificação de isolados produtores de carbapenemase, porém com testes fenotípicos sensíveis aos carbapenêmicos, gera um conflito na emissão dos resultados de susceptibilidade, tendo em vista que, até o momento, não existem dados suficientes sobre os resultados terapêuticos para recomendar que estes isolados sejam relatados como resistentes aos carbapenêmicos. Sendo assim, com o intuito de prevenir falhas terapêuticas potenciais algumas instituições de saúde optaram internamente por considerar os isolados produtores de carbapenemase como resistentes no resultado do antibiograma, independente do resultado dos testes de susceptibilidade, (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009).

Com base nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos carbapenêmicos, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), modificou os critérios de interpretação dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos para amostras de *Enterobacteriaceae*, conforme descrito na Tabela 2. Adicionalmente, o mesmo documento orienta que não será mais necessária a realização do teste modificado de Hodge para a detecção fenotípica de isolados produtoras de carbapenemases, nos laboratórios de microbiologia clínica que passarem a utilizar os novos critérios de interpretação dos carbapenêmicos, passando este a ser realizado somente com finalidades epidemiológicas a pedido do serviço de controle de infecção hospitalar (CLSI, 2010). Apesar do surgimento de isolados KPC-positivos em espécies de BGNMF, esta alteração ficou restrita aos organismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Tabela 2. Novos critérios de ponto de corte para os carbapenêmicos, segundo CLSI (2010).

Carbapenêmico	Critério Novo						Critério Antigo					
	CIM (µg/mL)			Halo de inibição (mm)			CIM (µg/mL)			Halo de inibição (mm)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4	≤ 23	20-22	≥ 19	≤ 4	8	≥ 16	≤ 16	14-15	≥ 13
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4	≤ 23	20-22	≥ 19	≤ 4	8	≥ 16	≤ 16	14-15	≥ 13
Ertapenem	≤ 0,25	0,5	≥ 1	≤ 23	20-22	≥ 19	≤ 2	4	≥ 8	≤ 19	16-18	≥ 15
Doripenem	≤ 1	2	≥ 4	≤ 23	20-22	≥ 19	-	-	-	-	-	-

Nota: os critérios de interpretação para o Doripenem foram acrescidos a partir do documento suplementar CLSI (M100-S20-U).

2.5.1.3 METALO- β -LACTAMASE (CARPABEMENASE DE CLASSE B)

As MBLs são as carbapenemases de maior diversidade molecular e consiste em uma maior ameaça clínica (WALSH, 2010). Estas enzimas apresentam dois íons de zinco em seu sítio ativo, que coordenam íons de água polarizada para o ataque oxianion sobre o anel β -lactâmico (GANTA *et al.*, 2009). Esse método de ataque e hidrólise é exclusivo, entre as β -lactamases e é clinicamente crítico, uma vez que as MBLs não formam uma ligação covalente intermediária estável ou pseudo-estável, logo, não se liga fisicamente ao substrato β -lactâmico e, portanto, escapa a ação de inibidores de β -lactamase, como ácido clavulânico e sulbactam (WALSH *et al.*, 2005b, GANTA *et al.*, 2009).

As MBLs podem hidrolisar todos os β -lactâmicos, exceto monobactâmicos, como o aztreonam, porém, atualmente muitos isolados clínicos estão apresentando uma série de β -lactamases de tal forma que a panresistência aos β -lactâmicos é um fenômeno comum em alguns países como a Índia e a Grécia (WALSH, 2010).

A primeira MBL foi descrita em 1966 em isolado de *Bacillus cereus*, estando seu gene localizado no cromossomo bacteriano (SABATH; ABRAHAM, 1966, KUWABARA; ABRAHAM, 1967; HUSSAIN *et al.*, 1985) e apenas 25 anos depois, em 1991, foi isolada a primeira MBL em um isolado clínico de *P. aeruginosa*, codificada por genes plasmidiais, ficando esta conhecida como IMP-1 (WATANABE *et al.*, 1991; OSANO *et al.*, 1994). Com o surgimento das MBL mediadas por plasmídeos em patógenos de importante relevância clínica, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* em vários países, este mecanismo de resistência tornou-se um sério problema, uma vez que limita as opções terapêuticas para infecções causadas por estes patógenos (BUSH, 2001; JONES *et al.*, 2005; ROSSOLINI, 2005b; WALSH *et al.*, 2005a).

Estas enzimas pertencem à classe molecular B segundo a classificação de Ambler (1980). Outras classificações para as MBL foram surgindo com o tempo, como a de Bush (1989) que classificou as mesmas no grupo 3, segundo as suas propriedades bioquímicas, característica que foi reforçada em 1995 com a classificação funcional de Bush-Jacobi-Medeiros (1995). Com o surgimento de novas MBL, Rasmussen e Bush (1997) propuseram a divisão do grupo 3, de acordo com o perfil de hidrólise para os carbapenêmicos e outros β -lactâmicos, em três novos

subgrupos: o subgrupo 3a, que inclui as MBL com amplo espectro de atividade, o subgrupo 3b, que compreende as enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenêmicos e o subgrupo 3c, composto pelas enzimas que hidrolisam fracamente os carbapenêmicos e com elevada capacidade de hidrolisar as cefalosporinas. Contudo, o sequenciamento genético das MBL levou Galleni *et al.* (2001) a proporem um novo esquema de classificação numérico e subdividiram o grupo 3 em 3 subclasses: B1, B2, e B3, esquema este que foi atualizado por Garau *et al.* (2004) após a elucidação da estrutura tridimensional de algumas MBL, representantes de cada subclasse, porém, este esquema de classificação, segundo Walsh *et al.* (2005b), não é adequado para classificar todas as MBL. Desta forma, em 2009 e 2010, Bush e Jacoby revisaram a classificação dos mesmos de 1995, mantendo a subdivisão por perfil de hidrólise das MBLs (3a, 3b e 3c), porém ampliando o arsenal de enzimas inseridas em cada subclasse.

Atualmente nove subclasses de MBLs clinicamente importantes foram identificadas (SAMUELSEN *et al.*, 2010). A Tabela 3 descreve os primeiros casos de cada MBL, identificados em patógenos clinicamente importantes.

Tabela 3. Dados dos primeiros exemplares de cada subclasse de MBL descritas até o momento.

Enzima MBL	Microorganismo (1º isolamento)	Cidade/País	Ano ^a	Referências
IMP-1 (Imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Okasaki/ Japão	1991	WATANABE <i>et al.</i> , 1991
VIM-1 (Verona imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Verona/ Itália	1997	LAURETTI <i>et al.</i> , 1999
SPM-1 (São Paulo metalo-β-lactamase)	<i>P. aeruginosa</i>	São Paulo/ Brasil	2001	TOLEMAN <i>et al.</i> , 2002
GIM-1 (German imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Dusseldorf/ Alemanha	2004	CASTANHEIRA <i>et al.</i> , 2004
SIM-1 (Seoul imipenemase)	<i>A. baumannii</i>	Seul/ Coréia	2003/ 2004	LEE <i>et al.</i> , 2005
AIM-1 (Australian imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i>	Adelaide/ Austrália	2002	YONG <i>et al.</i> , 2007
KHM-1 (Kyorin Hospital metalo-β-lactamase)	<i>C. freundii</i>	Tokyo/ Japan	1997	SEKIGUCHI <i>et al.</i> , 2008
NDM-1 (New Delhi metallo-β lactamase)	<i>K. pneumoniae</i>	Nova Deli/ Índia	2008	YONG <i>et al.</i> , 2009
DIM-1 (Dutch imipenemase)	<i>P. stutzeri</i>	Amsterdam/ Holanda	2007	POIREL <i>et al.</i> , 2010b

Nota: ^aAno = ano do primeiro isolamento; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*,
A. baumannii = *Acinetobacter baumannii*; *C. freundii* = *Citrobacter freundii*
K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*; *P. stutzeri* = *Pseudomonas stutzeri*

Atualmente as MBL constituem problema mundial e sua ocorrência já foi descrita na Ásia, Europa, América, Oceania e na África, conforme representado na Figura 3.

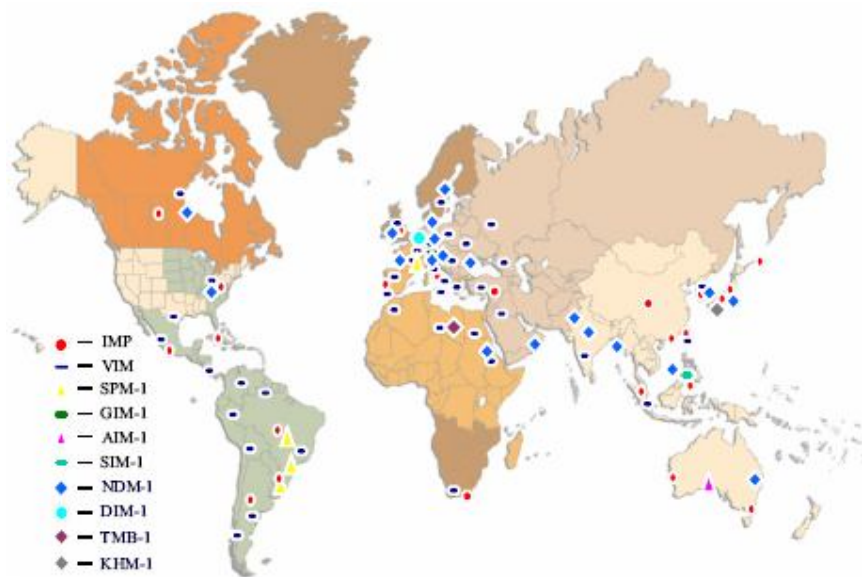


Figura 3. Representação da distribuição global das metalo-β-lactamases móveis (WALSH, 2010).

A) METALO-β-LACTAMASE DA SUBCLASSE IMP

Três anos após Watanabe *et al.* (1991) descreverem a primeira MBL adquirida em *P. aeruginosa*, Osano *et al.* (1994) caracterizaram uma MBL, que foi denominada de IMP-1 em amostra de *Serratia marcescens*, a qual foi isolada em 1991 de um paciente com infecção do trato urinário no Hospital de Aichi, Okazaki, Japão. Seu gene, *bla*_{IMP}, disseminou inicialmente entre as *P. aeruginosa* e outros bastonetes gram-negativos no Japão (SENDA *et al.*, 1996; KOHLER, 1999), possivelmente devido ao intenso uso de carbapenênicos associado ao surgimento de genes *bla*_{IMP} em elementos do integron (SENDA *et al.*, 1996).

Apesar de haver 29 derivados IMP-tipo, que nunca dominaram o cenário global das MBL, com apenas surtos esporádicos, IMP-1 continua a ser um elemento dominante de resistência no Japão, 20 anos após a sua primeira descoberta (ODE *et al.*, 2009; LAHEY, 2011).

Na China, IMP-4 parece ser a MBL dominante, mas sem os dados de um sistema de vigilância sistemática nacional, é difícil determinar a importância desses casos (CHEN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010). No entanto, estudos recentes sugerem uma composição mais heterogênea de MBLs da China, composta por IMP-1, IMP-7, IMP-10 e VIM-2, todas em *P. aeruginosa* (ZHAO *et al.*, 2009). IMP-4 também tem sido relatada em *P. aeruginosa* e diversas

espécies de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em Melbourne e Sidney, na Austrália, provavelmente importada do sudeste da Ásia (ESPEDIDO; PARTRIDGE; IREDELL, 2008).

Todos os genes de MBL IMP-tipo encontram-se inseridos em integron de classe 1 ou integrons tipo 3, no entanto, não há consenso se estes integrons são mediados por plasmídeo ou cromossomo, uma vez que muitos estudos não fornecem esses dados. O contexto que envolve genética de integrons IMP-transportador foi analisado em alguns estudos e demonstrou ser ladeado por Tn21 funcional e Tn5051 transposons, que estão quase certamente envolvidos no movimento de transferência de DNA (TOLEMAN *et al.*, 2005, WALSH, 2010).

No Brasil, os primeiros casos de isolados produtores de IMP foram relatados no Hospital Universitário do Rio de Janeiro (PELLEGRINO *et al.*, 2001), havendo registros também em Brasília (MENDES *et al.*, 2004), João Pessoa (SANTOS-FILHO *et al.*, 2003), São Paulo (TOLLEMAN *et al.*, 2002; SADER *et al.*, 2005), Porto Alegre (MARTINS *et al.*, 2007) e Santa Catarina (SCHEFFER *et al.*, 2010).

B) METALO- β -LACTAMASE DA SUBCLASSE VIM

O segundo grupo dominante de MBLs adquiridas é a subclasse VIM, também conhecida como MBL européia, devido à prevalência desta enzima nos países do continente europeu (WALSH *et al.*, 2005a). A primeira enzima tipo VIM descrita foi a VIM-1, que apresenta menos de 40% de homologia na sequência de aminoácidos quando comparadas ao grupo IMP (LAURETTI *et al.*, 1999). Outra variante de VIM, a VIM-2, foi descrita em um isolado de *P. aeruginosa* isolada na França em 1996, revelando 90% de homologia na sequência de aminoácidos quando comparada com a enzima VIM-1 (POIREL *et al.*, 2000).

O primeiro relato de identificação da enzima VIM-1 ocorreu em uma amostra de *P. aeruginosa*, isolada de ferida cirúrgica de um paciente da UTI do Hospital Universitário de Verona na Itália, em 1997 (LAURETTI *et al.*, 1999). Três anos depois, Cornaglia *et al.* (2000) relataram um surto de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e produtora de VIM-1, nesta mesma instituição. Neste estudo, dos 541 isolados de *P. aeruginosa* obtidos entre 1997 e 1998, 35 foram suspeitos de produzir MBL e essa suspeita foi confirmada em oito isolados que possuíam o gene *bla*_{VIM-1}.

A segunda variante desta subclasse, a VIM-2, também foi isolada de *P. aeruginosa* em amostra de hemocultura de uma paciente do sexo feminino de 39 anos, com leucemia em Marseilles, França, em 1996 (POIREL; COLLET; NORDMANN, 2000). VIM-2 é a variante

predominante das MBL do tipo VIM e, já foi relatada em várias regiões geográficas em diferentes espécies bacterianas, sendo responsável por surtos como o que ocorreu em um hospital grego (MAVROIDI *et al.*, 2000).

Dentre as 27 enzimas VIM-tipo conhecidas até o momento, VIM-2 tornou-se dominante e disseminada nos cinco continentes (WALSH *et al.*, 2005b; LAHEY, 2011). A grande maioria dos casos de VIM-2 ocorre em *P. aeruginosa*, muitas vezes causando infecções hospitalares, tais como pneumonia associada à ventilação (WALSH, 2010). VIM-2 está presente em *P. aeruginosa* na população com fibrose cística, associada à rápida propagação clonal e longos períodos de tratamento (CARDOSO; ALVES; LEITAO, 2008). Estes isolados continham o integron In58, relatado na França em 2002, e embora o gene *bla*_{VIM-2} tenha sido encontrado apenas em *P. aeruginosa* de um paciente com fibrose cística, não deixa de ser outra indicação de que o arsenal de antimicrobianos antipseudomonas é insuficiente para lidar com *P. aeruginosa* em infecções graves (LIVERMORE, 2009; PROJAN, 2008; BOUCHER *et al.*, 2009).

O gene codificante de VIM-2 geralmente estar localizado no cromossomo e não em plasmídeos (WALSH, 2010). Se mediada cromossomicamente ou por plasmídeos, todas as variantes VIM são transportadas para o gene em cassetes inseridos em integrons de classe 1 ou transferido através de elementos *ISCR* ou complexos de integrons de classe 1 (TOLEMAN; BENNETT; WALSH, 2006; BUSH *et al.*, 2009). Curiosamente, de todas as variantes de VIM, VIM-2 é altamente associado aos transposons Tn402-tipo ou Tn5090, ancestral do integron classe 1 antes da adição do gene de fusão *qac/sul* no final do 3'CS e do integron (TOLEMAN *et al.*, 2007; SAMUELSEN *et al.*, 2009; MARCHIARO *et al.*, 2010). No entanto, é importante observar que há relatos do gene *bla*_{VIM-1} sendo transportado por Tn402 tanto nas *Enterobacteriaceae* como em *Pseudomonas* spp. (TATO *et al.*, 2010). O transposon Tn5090 é caracterizado por *tniC* como parte de um quarteto de gene funcional (ROSEWARNE *et al.*, 2010). É interessante notar que Tn5090 foi provavelmente a região original 5'CS do integron de classe 1 antes do uso de antibióticos sulfonamidas e detergentes de amônio terciário na década de 1920, quando então *tniC* foi substituído pela região *qac/sul* (TOLEMAN *et al.*, 2007). Dados de estudos de vigilância global indicam que versões ancestrais do integron de classe 1 transportado pelo gene *bla*_{VIM-2} são globais e provavelmente sua prevalência foi subestimada pelo fato de VIM-2 ter sido sempre associada a integrons 1 de classe (*ISCR1*) normal ou complexo (WALSH, 2010).

No Brasil, apenas dois estudos identificaram produção de MBL tipo VIM-2, ambos realizados em São Paulo (SADER *et al.* 2005; FRANCO *et al.*, 2010).

C) METALO- β -LACTAMASE DA SUBCLASSE SPM

A terceira subclasse de MBL adquirida foi descrita em amostra de *P. aeruginosa* em janeiro de 2001, em uma paciente pediátrica com quadro de neutropenia com episódios de febre alta, internada no Complexo Hospitalar São Paulo, São Paulo, Brasil. Uma cultura pura de *P. aeruginosa* suscetível apenas a polimixina B foi isolada da urina da paciente e após cinco dias do primeiro isolamento, um segundo isolado de *P. aeruginosa* foi obtido a partir de hemocultura, com o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, que provocou um choque séptico, levando a paciente ao óbito (TOLEMAN *et al.*, 2002). Essa nova MBL foi denominada de SPM-1 (São Paulo metalo- β -lactamase), por ter sido isolada na cidade de São Paulo/Brasil e por apresentar perfil genético e hidrolítico diferente de IMP e VIM. A SPM-1 hidrolisa a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, principalmente as cefalosporinas, sendo incapaz de hidrolisar aztreonam, ticarcilina e ácido clavulânico (MURPHY, 2003).

Diferente dos outros países cujas MBLs predominantes são IMP e VIM, no Brasil a enzima mais prevalente é a SPM-1 (PICOLI, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009), cuja disseminação epidêmica foi evidenciada por Gales *et al.* (2003), que identificou genes *bla*_{SPM-1} em isolados de *P. aeruginosa* provenientes de municípios de diferentes regiões do país (São Paulo e Santo Andre (SP), Curitiba, Londrina e Maringa (PR), Brasília (DF), Salvador (BA) e Fortaleza (CE)).

Outros estudos também identificaram o gene *bla*_{SPM-1} em outros estados como em Pernambuco (POIREL *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2005), Paraíba (SANTOS-FILHO, 2003), Rio de Janeiro (RJ) (CARVALHO *et al.*, 2006), São Paulo (SADER *et al.* 2005; DOI *et al.* 2007; FRANCO *et al.*, 2010), Rio Grande do Sul (ZAVASCKI *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2007; GRÄF *et al.*, 2008; WIRTH *et al.*, 2009; LARANJEIRA *et al.*, 2010), Minas Gerais (CEZÁRIO *et al.*, 2009), Goiás (GONÇALVES *et al.*, 2009) e Santa Catarina (SCHEFFER *et al.*, 2010).

Até recentemente, a enzima SPM-1 só havia sido encontrada em *P. aeruginosa* e parecia estar restrita ao Brasil, entretanto, em 2010, foi publicado o primeiro relato de infecção causada por *P. aeruginosa* SPM-1-positiva fora do Brasil, isolada em 2007 de uma paciente suíço quem que havia recebido atendimento em um hospital universitário do Recife. Foi observado através de tipagem bacteriana por eletroforese de campo pulsado que este isolado identificado na Europa tinha um padrão de restrição do DNA quase idêntico ao das outras linhagens brasileiras,

diferindo em apenas três ou quatro bandas, indicando que todos os isolados de *P. aeruginosa* são parentes distantes (SALABI *et al.*, 2010).

D) OUTRAS METALO- β -LACTAMASES

Outras enzimas MBL (GIM-1, SIM-1, AIM-1, KHM-1 DIM-1), tiveram suas identificações restritas aos casos índice, não apresentando importância clínica significativa. Em contrapartida, o surgimento de novas MBLs na Índia e Paquistão é, possivelmente, o episódio mais preocupante desde que Fleming descobriu a penicilina em 1929, devido a grande densidade demográfica destes países (WALSH, 2010). Quando o gene *bla*_{NDM-1} foi caracterizado em 2008, poucos poderiam prever a enormidade de sua disseminação e prevalência atual, cerca de 2 anos mais tarde (YONG *et al.*, 2009). Por uma série de razões, por vezes uso inadequado de antibióticos (particularmente na comunidade), o clima quente, abastecimento público de água contaminada e falta de políticas de controle de infecção hospitalar, têm contribuído para a disseminação sem precedentes de isolados NDM-1 positivo (WALSH, 2010).

A enzima NDM-1 se propaga através de um plasmídeo que transporta o gene *bla*_{NDM-1} em conjunto com outros genes de resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, rifampicina, sulfametoxazol e aztreonam (não hidrolisado por NDM-1) (YONG *et al.*, 2009). Outra característica importante é que, diferente das enzimas KPC e OXA-48, isolados de *Enterobacteriaceae* NDM-1-positivos possuem alta CIM aos carbapenêmicos. Além disso, alguns indianos também apresentaram infecção por isolados resistentes a colistina e tigeciclina, tornando panresistente (WALSH, 2010).

NDM-1 é encontrada principalmente em *K. pneumoniae*, mas também pode ser encontrado em uma ampla gama de outras *Enterobacteriaceae* e foi recentemente isolado de *A. baumannii*, uma prova da destreza genética do plasmídeo, que o transporta (WALSH, 2010). Isolados NDM-1-positivos já foram também isolados no Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Europa continental, a Europa Oriental, Oriente Médio, África e diversos países do Sudeste Asiático, resultado tanto da globalização econômica e da plasticidade genética do o plasmídeo (YONG *et al.*, 2009; CDC, 2010). Não é surpreendente que estes isolados internacionais NDM-1-positivos sejam de pacientes que visitaram a Índia, no entanto, o mais preocupante é que muitos dos pacientes indianos optaram por uma cirurgia corretiva no exterior (CDC, 2010). Os dados de prevalência na Índia sugerem que NDM-1 está presente em uma taxa de 2-8% dos pacientes internados, no entanto, como é quase certa a perpetuação destes isolados

resistentes na comunidade, o nível de infecção verificado em hospitais pode ser apenas a ponta do iceberg (dados não publicados) (WALSH, 2010).

E) METALO- β -LACTAMASES NO BRASIL

As três subclasses de MBL já identificadas no Brasil são a SPM, IMP e VIM, conforme representado na Figura 4.

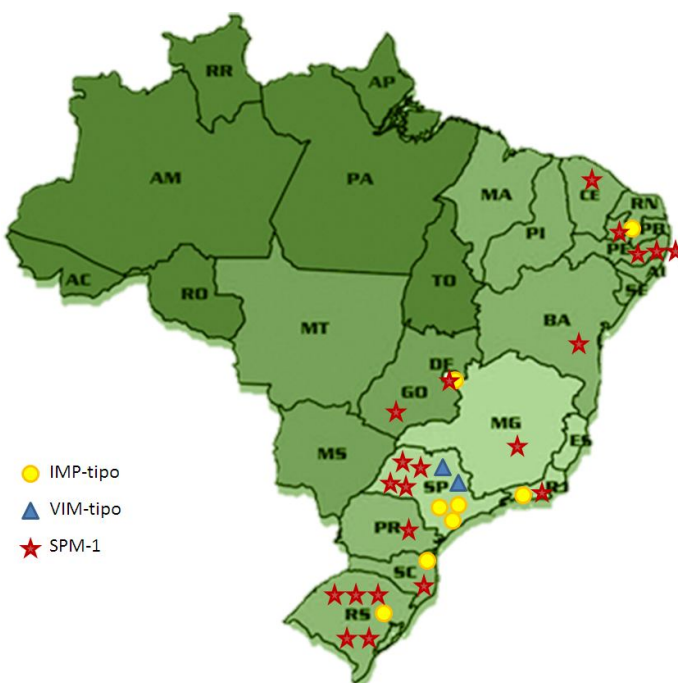


Figura 4. Representação da distribuição das metalo- β -lactamase no Brasil.

Nota: IMP-1 = Imipemenase; VIM-1 = Verona imipenemase; SPM-1 = São Paulo metalo- β -lactamase

Após a descoberta de um novo subtipo de MBL, descrito por Tolenam *et al.*, em 2002, diversos outros estudos foram realizados no Brasil, buscando identificar as subclasses de enzimas MBL em isolados de *P. aeruginosa*.

No nordeste brasileiro, Santos-Filho *et al.* (2003) pesquisaram a produção de MBL em uma amostra de 250 isolados não repetitivos de *P. aeruginosa* identificados por métodos de rotina em João Pessoa (PB). Foram considerados para análise os isolados multirresistentes, com diminuição de sensibilidade ao imipenem (halo<16mm) e a ceftazidima (halo<18mm). Estes foram submetidos aos testes fenotípicos de dupla difusão com discos em superfície de ágar e ao método E-test padronizado para a detecção de MBLs, que foram confirmadas pelo método

molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction). Como resultado, observou-se 14,8% de resistência cruzada ao imipenem/ceftazidima com identificação de 3,2% de amostras produtoras de MBLs, das quais 75% foram positivas para o gene *bla*_{SPM-1} e 25% para o gene *bla*_{IMP-1}.

Em Pernambuco, Poirel *et al.*(2004) descreveram uma propagação clonal de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e imipenem em uma amostra de 19 isolados clínicos coletados de pacientes provenientes de enfermarias neurológicas, UTI, ou internados em unidades semelhantes, no período de novembro de 2002 a janeiro de 2003 em diferentes hospitais de Recife (PE). Neste estudo foi observado que 11 isolados eram produtores de MBL, todas do tipo SPM-1. No ano seguinte, Magalhães *et al.* (2005) publicaram um estudo com uma amostra maior (48 isolados de *P. aeruginosa*), procedentes de cinco hospitais do Recife, dentre públicos e privados, onde foi observado que 50% dos isolados eram resistentes ao imipenem, e destes, 62,5% eram produtores de MBL do tipo SPM-1.

Ainda no nordeste, Cipriano *et al.* (2007) avaliaram se os surtos de *P. aeruginosa* multirresistente ocorridos em diferentes hospitais foram ocasionados por um único clone, ou por isolados independentes. Para isso, 108 isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados de pacientes colonizados/infectados em hospitais de São Luís, Maranhão, no período entre 2000 a 2003. Além da susceptibilidade aos antimicrobianos anti-pseudomonas e da pesquisa de genes relacionados à produção de MBLs, os isolados foram genotipados por eletroforese em campo pulsado. A amostra revelou 54 pulstipos distintos, com predominância de três clones (A, C e E) coexistindo em diferentes momentos e hospitais, e observaram ainda que um clone abrigava o gene *bla*_{SPM-1}.

Em Brasília, foi descrito o primeiro relato da enzima IMP-16, no mundo (MENDES *et al.*, 2004). Este isolado fazia parte da pesquisa do Programa SENTRY de Vigilância de antimicrobianos, que monitorava rotineiramente cepas de *Pseudomonas* sp. resistentes aos carbapenêmicos e ceftazidima, no período entre 2002 e 2004. A *P. aeruginosa* que abrigava uma variante do gene *bla*_{IMP} classificado como *bla*_{IMP-16}, foi isolada em abril de 2002 de um homem de 60 anos de idade em Brasília, Brasil. Trata-se de um gene cromossômico, cuja sequência de aminoácidos (IMP-16) apresentou o maior identidade com IMP-11 (90,3%) e IMP-8 (89,5%). A análise do sequenciamento do gene *bla*_{IMP-16} foi associada com uma integron de classe 1, que também codifica enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Uma análise da cinética da enzima revelou que a mesma apresenta preferência a cefalosporinas e carbapenêmicos, em relação às penicilinas (MENDES *et al.*, 2004).

Em Porto Alegre, vários estudos já foram realizados, e todos identificaram apenas a presença da enzima SPM-1, com frequências que variaram de 3,1% a 77,1%, dentre os isolados resistentes aos carbapenêmicos, positivos para MBL nos testes fenotípicos (ZAVASCKI *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2007; GRÄF *et al.*, 2008; WIRTH *et al.*, 2009). O primeiro trabalho publicado em Porto Alegre investigou uma amostra de 135 isolados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, e selecionou 35 isolados para estudar a produção de MBL, dos quais 77,1% (27/35) foram positivos no teste fenotípico, mas só 88,9% (24/27) destes portavam o gene *bla*_{SPM-1}, não havendo a detecção dos demais genes estudados (*bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}) (ZAVASCKI *et al.*, 2005). Um percentual superior de isolados MBL positivos no teste fenotípico, sem identificação do gene responsável por este fenômeno foi encontrada no estudo de Gräf *et al.* (2008), onde, dentre 46 isolados de *P. aeruginosa* estudados, 80,4% (37/46) tiveram teste fenotípico positivo para MBL, no entanto, apenas em cinco isolados foi detectado o gene *bla*_{SPM-1}, e não houve detecção dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. Mais recentemente, Wirth *et al.* (2009) estudaram 31 isolados de *P. aeruginosa* em dois hospitais localizados no Rio Grande Sul, Brasil (23 de um hospital em Porto Alegre e oito isolados de um hospital do Vale dos Sinos). As amostras positivas nos testes fenotípicos foram confirmadas através de técnicas moleculares para *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM-1}. Neste estudo observou-se que a prevalência de MBLs a partir de amostras de doentes internados em um hospital localizado em Porto Alegre foi de 30,4% e de pacientes internados em hospital do Vale dos Sinos foi de apenas 3,1%, onde o gene responsável por este mecanismo de resistência era o *bla*_{SPM-1} em todos os casos (WIRTH *et al.*, 2009).

Semelhante aos resultados encontrados por Gräf *et al.* (2008), em Minas Gerais Cezário *et al.* (2009), observaram um percentual de 26,7% (4/15) de positividade para o gene *bla*_{SPM-1} em 15 isolados MBL positivos no teste fenotípico, restando 73,3% (11/15) dos isolados sem identificação do gene responsável por este fenômeno (negativos para os genes *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{IMP-1}).

Também na região sudeste, alguns estudos realizados em São Paulo revelaram a detecção dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}. Sader *et al.* (2005), em uma amostra de 183 isolados de *P. aeruginosa* de paciente com bacteriemia, internados no Hospital São Paulo (Brasil) no período entre 2000 e 2001, obtiveram como resultado a detecção de produção de MBL em 36 isolados (19,7% de toda a coleção e 43,9% dos isolados resistentes a imipenem), classificados como SPM-1 (55,6%), VIM-2 (30,6%) e IMP-1 (8,3%), sendo considerado o primeiro relato da enzima VIM-2 publicado no Brasil. Por outro lado, Franco *et al.* (2010), selecionaram 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e observaram que 53 (76,8%) destes eram positivos para a

detecção fenotípica de MBL, porém apenas 21 (39,62%) isolados tiveram seus genes amplificados por PCR, sendo 17 portadores do gene *bla*_{SPM-1} e 4 portadores do gene *bla*_{VIM-2}, não havendo amplificação dos genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-1}.

Enquanto que no Rio de Janeiro, foi observada a ocorrência de isolados de *P. aeruginosa* SPM-1 positivos em um surto ocorrido em um hospital de ensino. Os genes *bla*_{SPM-1} e um gene integron classe 1 foram detectados em 13 isolados, representando 20% das 65 *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas no período de janeiro de 2000 a agosto de 2001. Sequenciamento de DNA revelou que este integron carrega três cassetes de genes que conferem resistência aos antimicrobianos, *aacA4*, *bla*_{OXA-56}, e *aadA7*, e uma codificação orf1 uma provável transposase. Todos os 13 isolados de *P. aeruginosa* SPM-1 positivas tiveram pulsotipos relacionados, designado como grupo clonal A, sugerindo disseminação nosocomial da cepa. Este grupo clonal foi o mesmo observado em outras *P. aeruginosa* SPM-1 positivos isoladas de diferentes estados brasileiros em anos anteriores (GALES *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006).

Por fim, Scheffer *et al.* (2010), avaliaram a propagação clonal de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de SPM-1, do Hospital Universitário de Florianópolis, Santa Catarina, comparado ao clone epidêmico relatado anteriormente, bem como com cepas coletadas em outros três estados brasileiros. Entre os isolados, 17 (62%) foram clones altamente relacionados às cepas de outras regiões do Brasil. Seis linhagens clonais abrigavam o gene *bla*_{SPM-1}. A descoberta de um clone único produtor de SPM-1 sugere que a sua disseminação tem contribuído para a alta resistência aos carbapenêmicos em hospitais brasileiros (SCHEFFER *et al.*, 2010).

2.6 TIPAGEM BACTERIANA

Do ponto de vista epidemiológico, a utilização de métodos de tipagem bacteriana é essencial para o desenvolvimento de políticas sólidas em controle de infecção, uma vez que os métodos de fenotipagem são úteis na comparação da epidemiologia de infecções na fase aguda e auxiliam no monitoramento da resistência a antimicrobianos (OLGE, *et al.*, 1987; OJENIYI, *et al.*, 1994), enquanto que os métodos de genotipagem são empregados para identificação de semelhança genética entre os isolados, permitindo assim o mapeamento da dinâmica de

transmissão da infecção (SPEERT, 2002; SPACOV, *et al.*, 2006; HAFIANE; RAVAOARINORO, 2008).

Frequentemente, investigações de surtos de doenças infecciosas demonstram relação com a exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados, sendo conhecidos como isolados relacionados clonalmente, conseqüentemente, estes pertencem a uma mesma espécie e apresentam fatores de virulência e características bioquímicas semelhantes entre si (PFALLER *et al.*, 2001). Entretanto, durante as replicações bacterianas podem ocorrer mutações aleatórias não letais que levam ao surgimento de uma diversidade de características dentro de uma mesma espécie (subtipos ou linhagens) (OLIVE; BEAN, 1999; ARBEIT, 1999). Com isso, os métodos de fenotipagem perdem seu poder discriminatório para a identificação de linhagens geneticamente semelhantes, favorecendo assim a aplicação de métodos de tipagem molecular, que são caracterizados pelo seu elevado poder discriminatório e de reprodutibilidade (OLGE, *et al.*, 1987; OJENIYI, *et al.*, 1994, SPEERT, 2002, HAFIANE; RAVAOARINORO, 2008).

Os métodos de tipagem molecular são divididos em dois grandes grupos, o primeiro deles é baseado na utilização de enzimas de restrição sem amplificação do ácido nucléico, como a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE), Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) e a ribotipagem; e o segundo grupo é baseado na amplificação de ácidos nucléicos pela PCR, como o Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente (Random-Amplified Polymorphic DNA - RAPD), PCR Baseada em Elementos de Repetição (Repetitive Element-Based PCR - REP-PCR), Tipagem de Sequência Multilocus (Multilocus-Sequence Typing - MLST), a PCR-Ribotipagem e a Consenso Intergênico Repetitivo de Enterobactérias Baseado em PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR - ERIC-PCR) (HAFIANE; RAVAOARINORO, 2008).

Segundo Sener *et al.* (2001), os métodos de tipagem molecular são caros, laboriosos e sua aplicação é geralmente possível apenas em laboratórios especializados. Em contrapartida, alguns autores afirmam que a técnica de ERIC-PCR apresenta boa eficácia e efetividade para fins de vigilância epidemiológica por seu alto poder discriminatório e boa reprodutibilidade, além de ser um método rápido e de menor custo quando comparado com a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (SYRMIS *et al.*, 2004; AGARWAL *et al.*, 2005; HAFIANE; RAVAOARINORO, 2008; PINNA *et al.*, 2008a).

Para garantir a aplicabilidade da técnica de ERIC2-PCR na identificação de isolados de *P. aeruginosa* em surtos hospitalares, Motta (2006) realizou um estudo de validação da técnica para este patógeno, em isolados de *P. aeruginosa* resistentes à carbapenêmicos, coletados de pacientes colonizados e/ou infectados por essa bactéria, em dois hospitais escola de Curitiba. Para a análise comparativa entre os dois métodos foram calculados o poder discriminatório (D) dos testes, além do cálculo de sensibilidade (S) e especificidade (E) do ERIC-PCR tendo o PFGE como referência (padrão ouro). Um total de 62 isolados foram avaliados pelos dois métodos. O valor de D para o PFGE foi de 0,98 para o ERIC-PCR foi de 0,97, enquanto que a sensibilidade e especificidade do ERIC-PCR foi de 75% e 57% respectivamente. Estes resultados confirmam o uso da metodologia ERIC-PCR como uma ferramenta de triagem para tipagem de *P. aeruginosa*. Corroborando com o estudo de Motta (2006), Wolska e Szveda (2008), testaram as técnicas de ribotipagem-PCR e ERIC-PCR em 62 isolados clínicos de *P. aeruginosa* para avaliar a utilidade das mesmas como ferramentas para o estudo da diversidade bacteriana dentro deste complexo grupo e concluíram que a análise ERIC-PCR é um método mais discriminatório quando comparado com a ribotipagem.

Utilizando ERIC-PCR, a fim de avaliar a distribuição dos clones em diferentes unidades hospitalares, Fortaleza *et al.* (2000) reuniram 71 isolados de infecção nosocomial e 23 de infecções adquiridas na comunidade no período de agosto a outubro de 1998, em um hospital de Botucatu, São Paulo, Brasil. Neste estudo, quarenta padrões de ERIC-PCR foram identificados, sendo observada a coexistência de diversos clones de *P. aeruginosa* na maioria das unidades, com exceção da neurologia, neonatologia e duas unidades cirúrgicas, onde um mesmo clone foi encontrado em mais de um paciente. Na comunidade, verificou-se que cada isolado apresentou um padrão de ERIC-PCR único, indicando que a fonte de infecção provavelmente era distinta.

Também empregando ERIC-PCR, Agarwal *et al.* (2005) estudaram 56 crianças com fibrose cística que foram regularmente acompanhadas no ambulatório de pneumologia pediátrica do All India Institute of Medical Sciences, Nova Deli, Índia entre agosto de 1998 e agosto de 2001. Dos 56 pacientes, 27 tiveram cultura positiva para *P. aeruginosa*, dos quais oito foram cronicamente infectados (grupo 1) e 19 foram colonizados intermitentemente pelo patógeno (grupo 2). Como resultado, os pesquisadores observaram que pacientes do grupo 1 tiveram taxas de internação, morte e colonização significativamente maiores, além de apresentarem colônias com morfotipos diferentes ($p < 0,05$). Quanto à caracterização molecular, foram identificados 33 padrões de ERIC-PCR, onde quatro pacientes cronicamente infectados foram colonizados por 2-4 genótipos distintos e os outros 23 pacientes colonizados com um único genótipo. Estes

resultados sugerem que infecção cruzada entre os pacientes com fibrose cística era incomum no grupo de pacientes estudados, porém, a cronificação da infecção tende ao surgimento de linhagens distintas genotipicamente em um mesmo paciente, repercutindo no manejo clínico dos pacientes, uma vez que os padrões de resistência antimicrobiana entre as linhagens de um mesmo paciente eram distintas.

Três anos mais tarde, aplicando a mesma técnica de genotipagem, Pinna *et al.* (2008b) estabeleceram relação clonal em um surto de *P. aeruginosa* isoladas de 24 pacientes com endoftalmite pós-operatória em um hospital da Índia. Os resultados deste estudo indicaram que o surto foi causado predominantemente por isolados idênticos ou com padrões genéticos muito semelhantes, sugerindo uma fonte comum de infecção na maioria dos casos. Em outro estudo, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa em pacientes que apresentavam úlcera corneana associada ao uso de lentes de contato, foram coletados oito isolados de *P. aeruginosa* com padrões de ERIC-PCR distintos, indicando que as infecções tiveram fontes distintas e que esta técnica parece ser eficaz para a vigilância epidemiológica deste patógeno entre doentes com infecções oculares (PINNA *et al.*, 2008a).

Por outro lado, Lee *et al.* (2008) em Taiwan, conciliaram o uso de uma técnica de tipagem para identificação de clones com a identificação de genes de resistência a carbapenêmicos e em 260 isolados de bactérias gram-negativas resistentes ao imipenem coletadas no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2006, das quais 49 eram *P. aeruginosa* e 27 (55%) delas eram produtoras de MBL (44% VIM-2, 33% VIM-3, 11% VIM-11 e 11% não foi identificado o gene). O Estudo da relação genética entre os isolados utilizando a técnica de ERIC-PCR revelou que os isolados não eram clones, logo o surto ocorrido não esteve associado com infecção cruzada entre pacientes. Enquanto que Mansour *et al.* (2009), na Tunísia, isolaram 75 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem no período novembro de 2003 a maio de 2007, e obtiveram uma prevalência de isolados produtoras de MBL bastante inferior a encontrada por Lee *et al.* (2008), correspondendo a apenas 7% dos isolados, todos portadores do gene *bla*_{VIM-2}, e esses isolados apresentaram um único perfil genotípico de acordo com ERIC-PCR e PFGE, indicando surto provocado por uma mesma fonte de infecção.

Desta forma, vários pesquisadores que utilizaram a técnica de ERIC-PCR para investigação de surto de infecção por *P. aeruginosa* em diversos sítios de infecção, concluíram que esta técnica pode ser uma boa ferramenta a ser empregada na vigilância epidemiológica deste patógeno em hospitais e na comunidade.

3. Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* procedentes de cinco hospitais públicos do Recife coletados no período entre 2006 a 2010.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar características microbiológicas e de virulência nos isolados hospitalares de *P. aeruginosa* (morfologia das colônias, produção de pigmento, de gelatinase e de hemolisina).
2. Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos na amostra do estudo.
3. Pesquisar fenotipicamente a produção de enzimas metalo- β -lactamase, dentre os isolados resistentes a ceftazidima e/ou imipenem e/ou meropenem.
4. Pesquisar a ocorrência de genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} nos isolados de *P. aeruginosa* positivos na pesquisa fenotípica de enzimas metalo- β -lactamase.
5. Pesquisar a ocorrência de genes *bla*_{KPC} nos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.
6. Investigar a relação genética entre amostras de *P. aeruginosa*.

4. Metodologia

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo do tipo série de casos, que busca identificar marcadores fenotípicos e moleculares de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência, onde serão incluídos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* coletados em pacientes internados em cinco hospitais públicos do Recife no período de 2006 a 2010.

4.2. LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado em cinco hospitais públicos do Recife, o Hospital Agamenon Magalhães (HAM), Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Hospital da Restauração (HR), Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e Hospital Barão de Lucena (HBL). Todos os hospitais inseridos na pesquisa são considerados hospitais escola, estando estes aptos para realização de pesquisas científicas voltadas para o melhoramento da qualidade dos serviços ofertados à população do Estado de Pernambuco. Também foi utilizado o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, para a análise fenotípica e genotípica de resistência nos isolados coletados durante o período da pesquisa.

4.3 AMOSTRAS BACTERIANAS

A amostra deste estudo foi constituída por 61 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* coletados de pacientes internados nos cinco hospitais supracitados, no período entre 2006 e 2010. Estes foram previamente identificados e testados quanto à susceptibilidade antimicrobiana nos laboratórios de análises clínicas dos respectivos hospitais.

Os isolados coletados no período entre 2006 e 2008, foram procedentes HAM, HC-UFPE, IMIP e HR. Estes estavam guardados em estoque congelado com glicerol 20% a

-20°C, no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Tropical da UFPE. Para as análises do presente estudo, os mesmos foram cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 48 horas e em seguida, plaquedados em ágar cetrímide.

Já os isolados referentes ao período entre 2009 e 2010, provenientes do HAM, HBL e HR, foram imediatamente plaqueados em ágar cetrímide para dar início ao estudo, bem como, foram semeados em caldo BHI, para conservação dos mesmos em estoque congelado com glicerol 20% a -20°C, para garantir a manutenção do cultivo por longo prazo.

4.4 ANÁLISE DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

4.4.1 Avaliação da Produção de Pigmentos e Aspecto das Colônias

As amostras semeadas no meio ágar cetrímide foram incubadas durante 24 horas a 37°C, para análise da produção de pigmentos (piocianina, pioverdina, piorubina e piomelanina) através da colocação apresentada no meio de cultivo após crescimento, e análise do aspecto das colônias (mucoides e mucoides e não mucoides). Por se tratar de um meio seletivo e diferencial, o ágar cetrímide permite também analisar a pureza da amostra, bem como confirmar que o microrganismo isolado pertence à espécie *P. aeruginosa* (WINN *et al.*, 2008).

4.4.2 Avaliação da Produção de Gelatinase

Para avaliação da produção de gelatinase, os isolados foram semeados em caldo nutritivo acrescido de 4% de gelatina, e incubados em estufa 37°C por 24 horas, utilizando como controle positivo um isolado de *Proteus* sp. e como controle negativo o meio sem inoculação de microrganismos, segundo metodologia descrito no Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (GARRITY, 2005). Após período de incubação as amostras foram colocadas na geladeira por no mínimo uma hora para posterior leitura dos resultados. Os cultivos que solidificaram foram considerados gelatinase negativos, pois a gelatina do meio permaneceu intacta após crescimento bacteriano, enquanto que os cultivos que permaneceram líquidos foram considerados gelatinase positivos, uma vez que degradaram a gelatina do meio.

4.4.3 Avaliação da Produção de Hemolisina

Para avaliação da produção de hemolisina, os isolados foram semeados em meio ágar sangue e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Foram considerados hemolisina positivos os isolados que formaram um halo translúcido ao redor das colónias, indicando hemólise dos eritrócitos presentes no meio de cultivo (WINN *et al.*, 2008).

4.4.4 Avaliação do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através do teste de difusão em ágar, conforme recomendações do CLSI (2010). Todos os isolados foram testados frente aos seguintes antimicrobianos: amicacina (AMI), aztreonam (ATM), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IPM), meropenem (MPM), ticarcilina/ácido clavulânico (TAC), polimixina (POL). Para o controle de qualidade dos testes, foi utilizado um isolado de *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

Para realização do teste de disco difusão, os isolados foram inoculados em caldo BHI e incubados por cerca de 4 horas a 37°C. Após crescimento, as suspensões foram ajustadas ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland, para padronização do inóculo (10^8 unidades formadoras de colônia/mL). Em seguida, as suspensões foram semeadas em toda a superfície do meio ágar Mueller Hinton, com o auxílio de um swab. Após este procedimento, os discos de antimicrobiano foram dispensados por sobre a superfície semeada do meio de cultivo, com o auxílio de uma pinça estéril, fazendo uma leve pressão sobre os mesmos para fixá-los ao meio. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a leitura dos resultados foi realizada, seguindo os critérios de interpretação recomendados pelo CLSI, 2010.

4.4.5 Análise da Produção de MBLs (Metallo- β -Lactamases)

Os isolados resistentes ao imipenem e/ou ceftazidima foram submetidos à pesquisa de enzimas metallo- β -lactamases (MBLs), utilizando a técnica de aproximação de disco descrita por Arakawa *et al.* (2000), que consiste na deposição de dois discos de ceftazidima (CAZ) a uma distância de 5 cm um do outro, por sobre a superfície do meio ágar Mueller Hinton semeada com uma suspensão bacteriana ajustada ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, conforme realizado no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Ao lado de um dos discos de CAZ, foi depositado um disco de papel filtro estéril embebido por 2 μ l de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA), a uma distância de 2,5cm. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

O aparecimento de uma distorção e/ou ampliação do halo de inibição de crescimento da amostra testada entre o disco de CAZ e o papel de filtro adicionado de 2-MPA, foi considerado resultado positivo para a produção de MBL, enquanto que a não alteração do halo de inibição de crescimento da amostra, foi considerada teste negativo, conforme esquema representado na Figura 5.

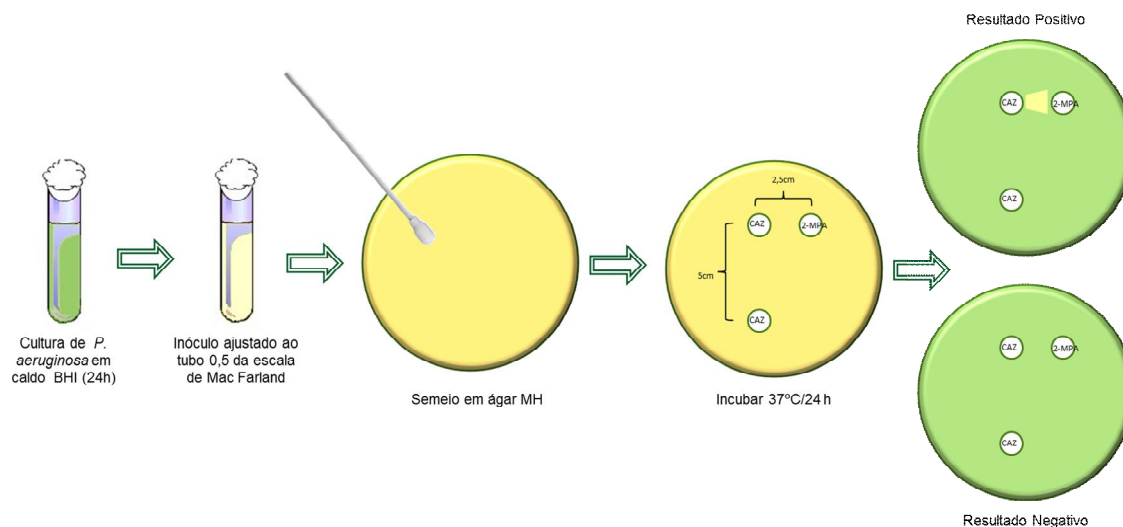


Figura 5. Representação esquemática do teste fenotípico para detecção da produção de enzimas metallo- β -lactamase.

Nota: BHI = Brain Heart Infusion; MH = Mueller Hinton; CAZ = Ceftazidima; 2-MPA: ácido 2-mercaptopropiônico

Os testes foram realizados em duplicata, para confirmação dos resultados.

4.5 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

4.5.1 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia), através do protocolo fornecido pelo fabricante, conforme esquema abaixo (Figura 6):

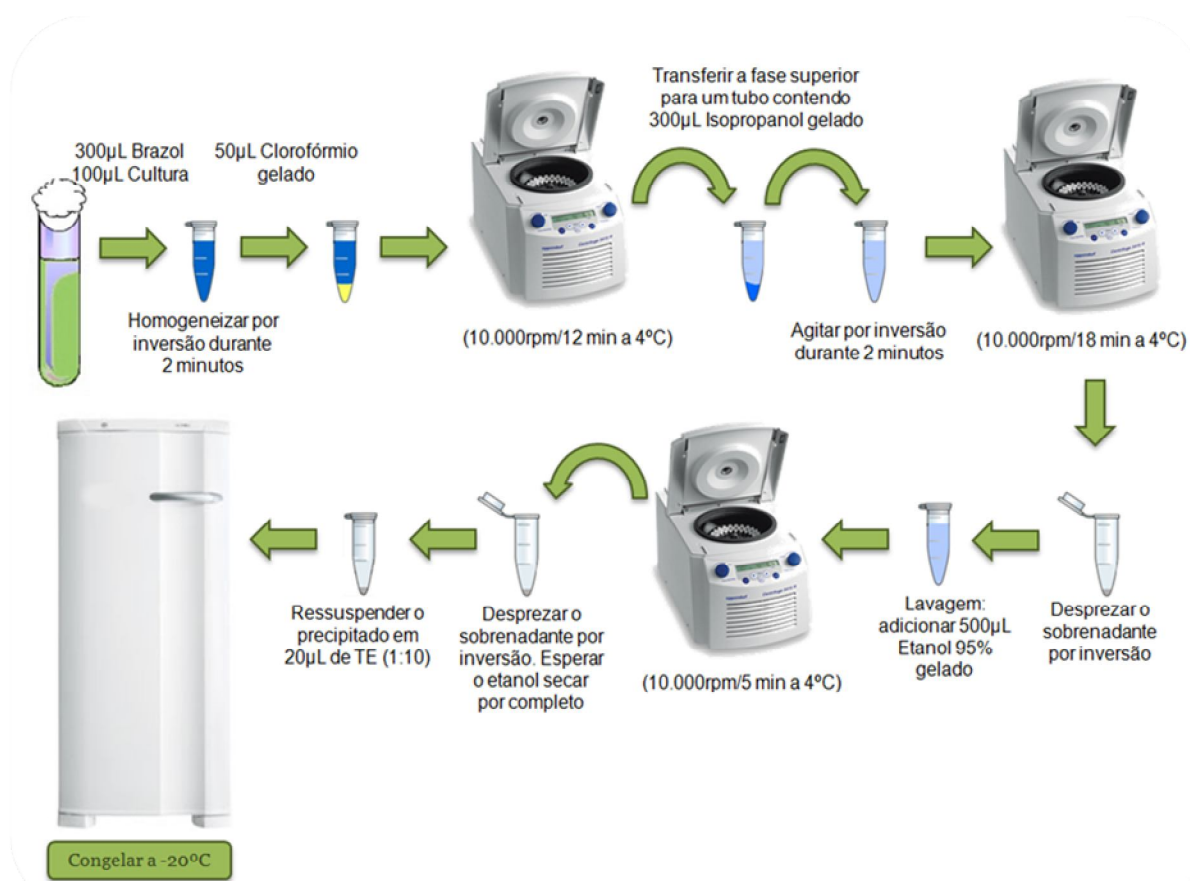


Figura 6. Representação esquemática da técnica de extração de DNA utilizando o Kit de Extração Brazol (LGC Biotecnologia)

Após a extração do DNA bacteriano, os mesmos foram quantificados por espectrofotometria (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) em uma faixa de comprimento de onda entre 260 a 280nm.

4.5.2 ERIC-PCR

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'- ATG TAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega). Os parâmetros de amplificação utilizado na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos, seguido de uma extensão final de 16 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram corados com blue-green e submetidos à eletroforese a 1,5% em géis de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (DUAN *et al.*, 2009).

4.5.3 Detecção dos Genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}

As amostras positivas no teste fenotípico para a pesquisa de MBLs foram submetidas a PCR para a detecção dos gene *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 25ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (Tabela 4), Tampão 1x, 100µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega). Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo para os genes *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319) e *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48–1997A), cedidos pela pesquisadora A.C. Gales (UNIFESP). As amplificações dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento segundo temperatura descrita na Tabela 4 por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e por fim uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram corados com blue-green e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentado para posteriores análises (GALES *et al.*, 2003).

Tabela 4. Relação dos iniciadores e controles positivos para a pesquisa de genes de MBL

Gene	Iniciadores (Primers)	Temperatura de anelamento
<i>bla</i> _{IMP-DIA} ^a	F(5' GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC 3') R(5' GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT 3')	50,6°C
<i>bla</i> _{VIM-DIA} ^a	F (5'CAGATTGCCGATGGTGTTTGG 3') R (5'AGGTGGGCCATTCAGCCAGA 3')	56,8°C
<i>bla</i> _{SPM-1} ^b	F(5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3') R(5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3')	55,3°C

Fontes: ^a DONG *et al.*, 2008; ^b GALES *et al.*, 2003

4.5.4 Detecção dos Genes *bla*_{KPC}

As amostras resistentes aos carbapenêmicos foram submetidas à pesquisa de genes de resistência *bla*_{KPC} segundo metodologia descrita por Yigit *et al.* (2001). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 5ng DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores ([5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'] e [5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3']); 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec) e 1,5 mM de MgCl₂. Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo (*K. pneumoniae* 10P), cedido pela pesquisadora A.C.S. Lopes (UFPE). Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 30 segundo e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 10 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram corados com blue-green e submetidos à eletroforese a 1,0% em géis de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (YIGIT *et al.*, 2001).

5. ARTIGO 1

Título resumido: Caracterização de *Pseudomonas aeruginosa*

Título: Caracterização fenotípica e molecular de fatores de resistência e virulência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife, PE

Autores:

- (1) Paula Regina Luna de Araújo Jácome – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Mestranda em Medicina Tropical.
- (2) Lílían Rodrigues Alves - Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas. Bacharel em Biomedicina.
- (3) Adriane Borges Cabral – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Mestranda em Medicina Tropical.
- (4) Ana Catarina de Souza Lopes – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco.
- (5) Maria Amélia Vieira Maciel – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco.

Endereços para Correspondência:

Paula Regina Luna de Araújo Jácome
Av. Norte, 3533, Apto 106/Bl P2 – Tamarineira, Recife-PE / Brasil
52051-000
Tel. 30720472
e-mail: paulajacome@ibest.com.br

Maria Amélia Vieira Maciel
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Medicina Tropical.
Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil
50670-901
Tel. 21268526
e-mail: amelia57@gmail.com

Revista:

A estruturação do artigo procura estar de acordo com os requisitos de publicação das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, no formato artigo original.

RESUMO

Analisou-se sessenta e um isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de cinco hospitais públicos de Recife-PE, entre 2006 e 2010, com o objetivo de avaliar o perfil de virulência, resistência a antimicrobianos, presença de genes metalo- β -lactamase (MBL) e a relação clonal entre os isolados. Foi observada uma elevada produção de fatores de virulência na amostra (36,96% colônias mucoides; 69,81% piocianina; 92,86% gelatinase positivos e 71,70% hemolisina positivo), bem como um elevado percentual de resistência (4,92% isolados panresistentes e 54,09% multirresistentes). Dentre os 29 isolados resistentes ao imipenem e/ou ceftazidima, 44,83% foram MBL positivos na pesquisa fenotípica, e destes, 46,15% positivos para o gene *bla*_{SPM-1}, não havendo detecção dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. A tipagem molecular utilizando o método de PCR de sequências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) revelou 21 perfis genéticos dos quais sete foram detectados em hospitais e períodos distintos, e dos isolados *bla*_{SPM-1} positivos, três apresentaram o mesmo perfil clonal e eram procedentes do mesmo hospital, enquanto que os outros três isolados *bla*_{SPM-1} positivos apresentaram perfis clonais distintos. Os resultados deste estudo revelam que a *P. aeruginosa* é um patógeno capaz de acumular diferentes fatores de virulência e resistência, dificultando o tratamento de infecções causadas por essa bactéria. A identificação de genes *bla*_{SPM-1} e disseminação de clones sugere a necessidade de aplicação mais rigorosa de medidas de controle de infecção nos hospitais de Recife, visando reduzir os custos e os danos provocados por este tipo de infecção.

Palavras Chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenemase, Multirresistência, Fatores de Virulência.

Órgãos de financiamento:

Primeiros Projetos de Pesquisa (PPP/CNPq/Fapepe) 2007 (Processo: APQ 0579-2.12/06)

Edital de Multiusuários/PROPESQ-2007 (Processo: 23076.014616/2007)

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria de origem ambiental, considerada um patógeno essencialmente oportunista, por acometer, principalmente, pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (Madigan et al. 2004, Pitt & Simpson, 2006, Winn et al. 2008). No Brasil, *P. aeruginosa* é uma importante causa de infecção nosocomial, sendo considerada a primeira causa de pneumonia nosocomial e a terceira causa de infecção primária de corrente sanguínea em unidades de terapia intensiva (UTI) (Zavaski et al. 2006, Pires et al. 2009, Anvisa 2009).

Alguns fatores de virulência favorecem a infecção por este patógeno, como a formação de piocianina, hemolisina, gelatinase e biofilme, que atuam aumentando a lesão tecidual e protegendo a *P. aeruginosa* contra o reconhecimento do sistema imune e a ação dos antibióticos (Todar 2009, Pedersen 1992, Ciofu et al. 2008, Cevahir et al. 2008).

Outra característica importante da *P. aeruginosa* é a capacidade de albergar diversos mecanismos de resistência, podendo dar origem a isolados multirresistentes, quando desenvolvem resistência a três ou mais classes de agentes anti-*Pseudomonas*, ou mesmo panresistência, quando apresentam resistência a todos os antimicrobianos clinicamente utilizados (Livermore 2002, Tam et al. 2010, Layeux et al. 2010).

Uma alternativa para tratamento de infecções causadas por organismos multirresistentes é a utilização de carbapenêmicos, como o imipenem, o meropenem e mais recentemente o doripenem, não sendo indicados como primeira escolha no tratamento empírico de infecções comunitárias ou hospitalares (Anvisa 2007). No entanto a utilização indiscriminada de carbapenêmicos no ambiente hospitalar leva a uma seleção de cepas resistente a essa classe de antimicrobianos (Gales et al. 2003, Mendes et al. 2006).

Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de enzimas carbapenemases se tornou o mecanismo de maior relevância devido à crescente diversidade

enzimática que tem sido observada nos últimos anos, com destaque para as metalo- β -lactamases (MBL). Estas enzimas apresentam elevada versatilidade e ampla atividade hidrolítica, podendo hidrolizar quase todos os antibióticos β -lactâmicos, com exceção apenas dos monobactâmicos (Fritsche et al. 2005, Gräf et al. 2008, Queenan & Bush 2007, Walsh, 2010).

Nove subclasses de MBL foram descritas até o momento, IMP-1 (Imipenemase), VIM-1 (Verona imipenemase), SPM-1 (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM-1 (German imipenemase), SIM-1 (Seoul imipenemase), AIM-1 (Australian imipenemase), KHM-1 (Kyorin Hospital metalo- β -lactamase), NDM-1 (New Delhi metallo- β lactamase), DIM-1 (Dutch imipenemase) (Samuelson et al. 2010), das quais apenas as três primeiras foram identificadas em diferentes estados no Brasil.

Além da pesquisa de genes de resistência, outra ferramenta imprescindível no controle de infecção é a aplicação de métodos de genotipagem para identificação de semelhança genética entre microrganismos, permitindo assim o mapeamento da dinâmica de transmissão da infecção (Spacov et al. 2006, Hafiane & Ravaoarino 2008). A utilização da técnica de amplificação por PCR de sequências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) tem se mostrado uma boa técnica para fins de vigilância epidemiológica, por apresentar boa eficácia e eficiência (Pinna et. al. 2008).

O presente estudo tem por finalidade caracterizar, fenotipicamente e genotipicamente, isolados de *P. aeruginosa* provenientes de hospitais públicos do Recife, a fim de identificar marcadores de resistência e virulência.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 61 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de diversos sítios de infecção (sangue, urina, secreção traqueal, ferida cirúrgica, secreção ocular, ulcera) de pacientes internados nos cinco hospitais de ensino do Recife, no período entre 2006 e 2010.

Dentre as características microbiológicas, foram pesquisados o aspecto da colônia, produção de pigmento, produção de hemolisina (Winn et al. 2008) e produção de gelatinase (Garrrity 2005).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliado através do teste de difusão em ágar, utilizando amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, ticarcilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefepime, ceftazidima, imipenem, meropenem e polimixina, conforme recomendações do CLSI (2010). Os isolados resistentes ao imipenem e/ou ceftazidima foram submetidos à pesquisa de enzimas metalo- β -lactamases (MBLs), utilizando a técnica de aproximação de disco descrita por Arakawa et al. (2000), realizada em duplicata para cada isolado.

Para pesquisa de genes relacionados à produção de carbapenemases, foi extraído o DNA total dos isolados utilizando o kit Brazol (LGC Biotecnologia), conforme instruções do fabricante, e quantificado por espectrofotometria (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) em uma faixa de comprimento de onda entre 260 a 280nm. Os genes MBL pesquisados foram *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, utilizando os seguintes iniciadores: *bla*_{SPM-1} F (5'CCTACAATCTAACGGCGACC-3'), *bla*_{SPM-1} R (5'TCG CCGTGTCCAGGTATAAC3') (Gales et al. 2003), *bla*_{IMP} F (5'GGAATAGAGTGG CTTAATTCTC3'), *bla*_{IMP} R (5'GTGATGCGTCYCCAAYTT CACT3') (Dong et al. 2008), *bla*_{VIM} F (5'CAGATTGCCGATG GTGTTTGG3') e *bla*_{VIM} R (5'AGGTGGGCCATTCAGCCAGA3') (Dong et al. 2008). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ l por tubo, compreendendo: 25ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores, Tampão 1x,

100µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega). Em cada partida de amplificação foi incluído um controle negativo e um controle positivo para os genes *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319) e *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* 48–1997A). Os ciclos de amplificações dos genes foram realizados nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto a 50,6°C, 56,8°C e 55,3°C, respectivamente para *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM}; extensão a 68°C por 1 minuto, e por fim uma extensão final de 10 minutos a 68°C. Os produtos de PCR foram corados com blue-green e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) sob voltagem constante de 100V (Gales et al. 2003).

A pesquisa da relação genética entre os isolados foi realizada através da técnica de ERIC-PCR. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'-ATGTAA GCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), Tampão 1x, 200µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), 1,5 mM de MgCl₂ e 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega). Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos, seguido de uma extensão final de 16 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram corados com blue-green e submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,5% em tampão TBE sob voltagem constante de 100V (Duan et al. 2009). A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 5.0.

RESULTADOS

A pesquisa de fatores de virulência revelou que dos 61 isolados de *P. aeruginosa* estudados 34,43% apresentava colônias mucoides, 70,49% eram produtores de piocianina, 93,44% produtores de hemolisina e 72,13% produtores de gelatinase, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência das características microbiológicas dos isolados de *P. aeruginosa* de hospitais do Recife, no período de 2006 a 2010.

Característica	n /Amostra	Percentual (%)
Colônia Lisa	40/61	65,57
Colônia Mucoide	21/61	34,43
Produção de Piocianina	43/61	70,49
Produção de Pioverdina	17/61	27,87
Produção de Piorubina	0/61	0,00
Produção de Piomelanina	1/61	1,64
Produção de Hemolisina	57/61	93,44
Produção de Gelatinase	44/61	72,13
Produção de Metallo- β -lactamase	13/29	44,83

Nota: n = número de isolados que apresentam determinada característica, Amostra = tamanho da amostra pesquisada para tal característica.

Os dados de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos estão apresentados na Figura 1. Os maiores percentuais de resistência foram observados frente à gentamicina e ciprofloxacina, ambos com 40,98% (25/61), enquanto que a polimixina B e o aztreonam apresentaram a menor frequência de isolados resistentes, com 13,11% (8/61) e 29,51% (18/61) respectivamente.

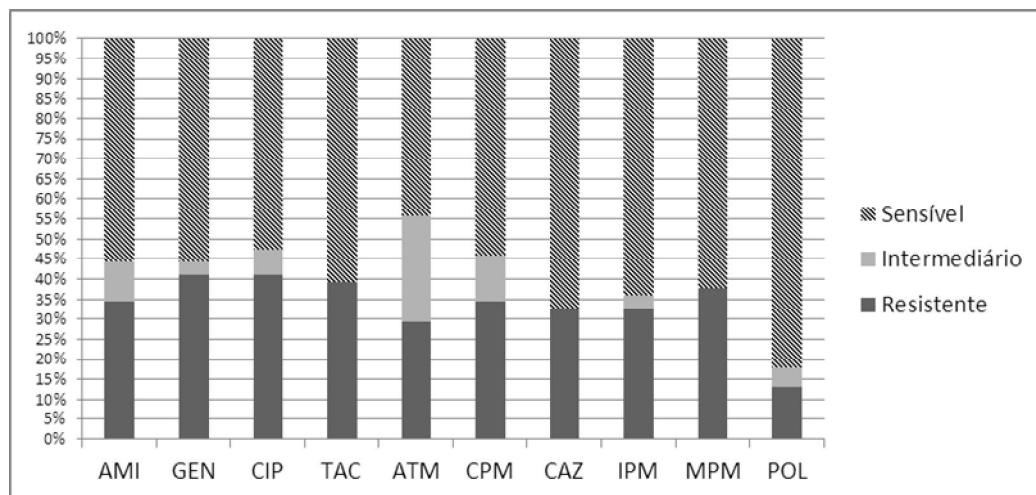


Figura 1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de cinco hospitais públicos de Recife-PE, no período de 2006 a 2010.

Nota: amicacina (AMI), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), ticarcilina/ácido clavulânico (TAC), aztreonam (ATM), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM), meropenem (MPM), polimixina (POL).

Observou-se também que 54,10% dos isolados eram multirresistentes, dos quais, 27,27% eram sensíveis apenas a polimixina B e 9,09% eram panresistentes, conforme descrito na Figura 2 e Tabela 2.

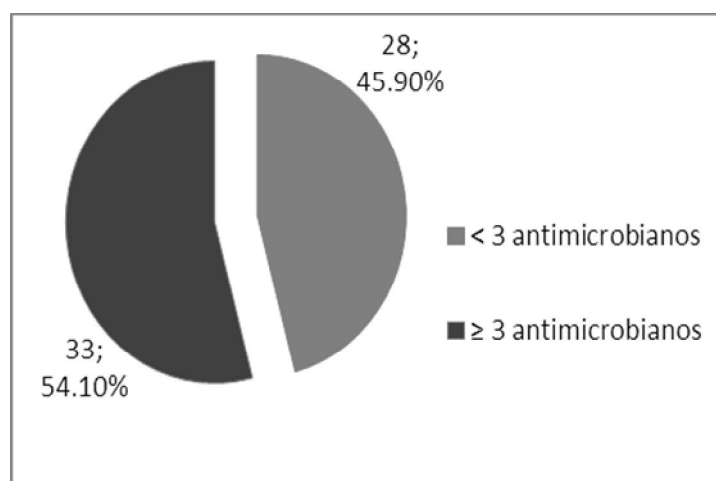


Figura 2. Frequência de isolados *P. aeruginosa* multirresistentes provenientes de cinco hospitais públicos de Recife-PE, Brasil.

Tabela 2. Frequência de antimicrobianos degradados por isolados multirresistentes.

	n	%
3 antimicrobianos	5	15,15
4 antimicrobianos	4	12,12
5 antimicrobianos	3	9,09
7 antimicrobianos	5	15,15
8 antimicrobianos	4	12,12
9 antimicrobianos	9	27,27
10 antimicrobianos	3	9,09
Total	33	100

Nota: n = número de isolados resistentes; % = Percentual de isolados resistentes.

Entre os 29 isolados resistentes ao imipenem e/ou a ceftazidima 44,83% (13/29) foram positivos na pesquisa fenotípica de MBL, e destes, 46,15% (6/13) tiveram o gene *bla*_{SPM-1} amplificado por PCR, sendo dois procedentes do HAM (P7A, P15A) coletada no ano de 2006, e os demais coletados em 2010 procedentes do HBL (P6BL) e HR (P3R, P4R, P7R). Não houve detecção dos genes *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}.

A tipagem molecular dos isolados revelou 21 perfis genéticos, com predominância dos clones A, B e C, conforme apresentado no dendrograma (Figura 3). Dentre os isolados SPM-1 positivos, três apresentaram o mesmo perfil clonal (clone D) e outros três isolados SPM-1 positivos apresentaram perfis clonais distintos (clones C, G e P). Observou-se também que sete clones foram disseminados em mais de um hospital e foram detectados em períodos distintos (A, B, C, D, E, J e K).

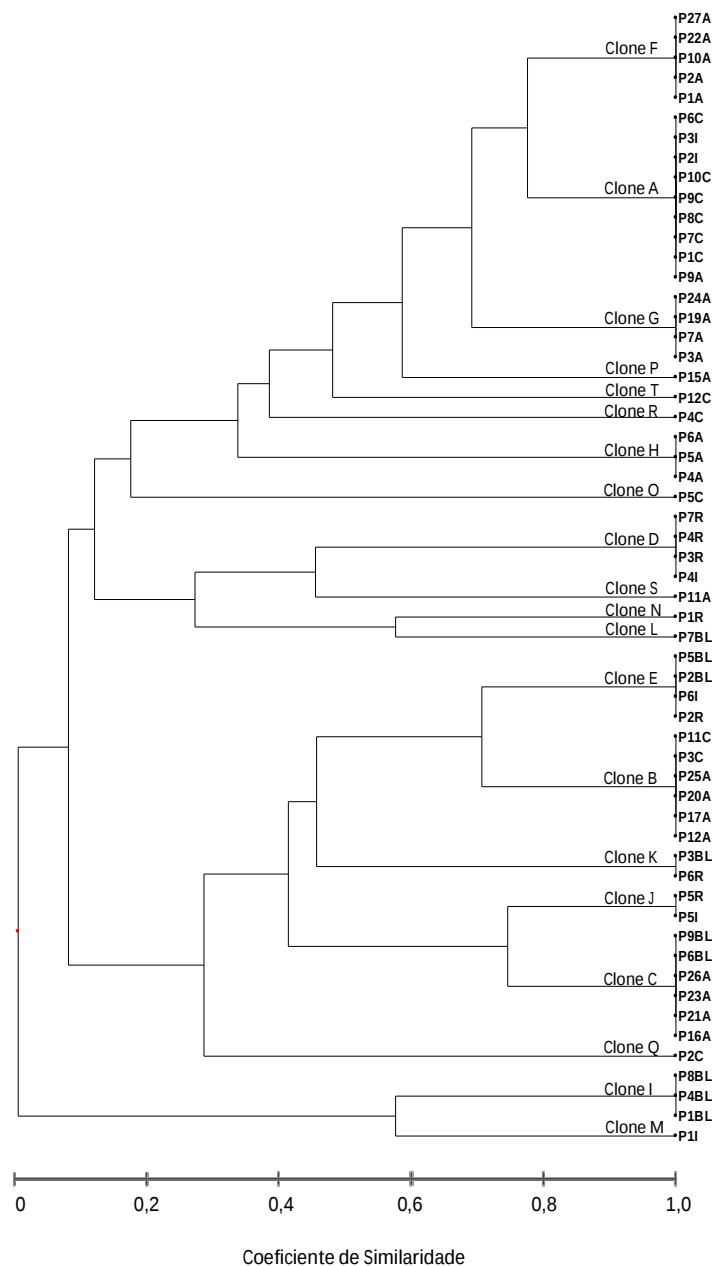


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética entre 61 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de cinco hospitais públicos de Recife-PE entre 2006 e 2010, estimado pela técnica de ERIC-PCR.

DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica realizada neste estudo revelou um elevado percentual de fatores de virulência dentre os isolados de *P. aeruginosa* pesquisados, com exceção do aspecto mucoide das colônias, característica associada a formação de biofilme, que esteve presente em apenas 34,43% das colônias. Frequências ainda menores foram observadas por Deptula e Gospodarek (2010), ao compararem a frequência de fatores de virulência entre isolados multidroga sensíveis e multirresistentes, com formação de biofilme em 9,3% e 8,0% respectivamente.

O biofilme é composto por alginato e confere a consistência mucoide a isolados desta espécie, servindo como um nicho protetor da bactéria contra o reconhecimento do sistema imune e a ação dos antibióticos, podendo induzir a cronificação da infecção (Pedersen 1992, Ciofu et al. 2008). A produção de biofilme tem sido bastante estudada em pacientes portadores de fibrose cística, por ser uma infecção pulmonar crônica, permitindo verificar a transformação de isolados não mucoides em mucoides, durante o processo de evolução da doença (Lee et al. 2005, Ciofu et al. 2008).

Observou-se também a produção de piocianina em 70,49% dos isolados deste estudo. Este fator de virulência consiste em um pigmento fenazínico azul produzido exclusivamente por *P. aeruginosa*, relacionado à lesão tecidual através da formação de radicais hidroxila reativos e superóxidos, que age principalmente no epitélio respiratório (Pedersen 1992, Kong et al. 2006, Todar 2009). Alguns estudos que avaliaram a produção de piocianina em isolados de *P. aeruginosa* apresentaram frequências variando entre 41,3% e 81,5% (Fothergill et al 2007, Iwalokun et al. 2006), bem como estimaram se a produção deste pigmento estava associado a produção de biofilme (Lee et al. 2005) e à multirresistência (Deptula & Gospodarek 2010), não havendo diferença significativa em nenhum dos dois casos.

Outros fatores de virulência associados à lesão tecidual são a produção de hemolisina e de gelatinase, que representaram 93,44% e 72,13%, respectivamente. As hemolisinas são responsáveis por lesão no tecido respiratório pela degradação do ramnolípídeo que compõe o surfactante pulmonar (Todar 2009, Kong et al. 2006). Já a gelatinase está mais associada à quebra de barreiras físicas das células hospedeiras, provocando hidrólise de gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, levando a necrose através da lise celular (Kanemitsu et al. 2001, Cevahir et al. 2008, Todar 2009). Em um estudo analítico que avaliou a produção de fatores de virulência entre isolados mucoides e não mucoides, Stehling et al. (2008) não observaram diferença significativa para a produção de hemolisina ($p = 0,5911$) e gelatinase ($p = 0,5542$), com frequência média de 53,57% e 37,50%, respectivamente.

O resultado do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos obtidos neste estudo revelou que o fármaco mais ativo contra *P. aeruginosa* foi a polimixina B (81,97%), seguido pelo ceftazidima (67,21%), o imipenem (63,93%) e o meropenem (62,30%), respectivamente. Em anos anteriores, dois estudos retrospectivos baseados em dados microbiológicos de registros laboratoriais, foram realizados em Recife-PE, Brasil. Pires et al. (2009) observaram que os antimicrobianos mais ativos contra *P. aeruginosa* no período de janeiro a junho de 2009 no HC-UFPE foram amicacina (84,62%), imipenem (81,82%), meropenem (79,31%) e aztreonam (74,39%), no entanto, neste estudo não houve padronização dos antibióticos testados para cada isolado, logo a avaliação comparativas entre os antimicrobianos fica prejudicada. Enquanto que Figueiredo et al. (2007) investigaram uma amostra de 304 isolados de *P. aeruginosa*, proveniente de dois hospitais públicos do Recife (HC-UFPE e HAM), no período de Setembro de 2004 a Janeiro de 2006 e observaram que dentre os antibióticos testados nos dois hospitais, aztreonam (56,45%), amicacina (55,95%), meropenem (55,7%) e imipenem (51,7%) apresentaram maior atividade. Nos três estudos os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) estiveram entre os quatro antimicrobianos mais ativos, com

percentuais de susceptibilidade variando entre 51,45% e 79,31%. Por outro lado, tanto Pires et al. (2009) como Figueiredo et al. (2007) verificaram maior ação antimicrobiana do aztreonam em comparação ao nosso estudo, onde o mesmo foi considerado o antimicrobiano de menor atividade, com taxas de resistência mais expressivas nos dois últimos anos da pesquisa.

Um elevado percentual de isolados multirresistentes também foi observado neste estudo, corroborando com achados anteriores de multirresistência em *P. aeruginosa* observados neste mesmo município (Figueiredo et al. 2007). Em contrapartida, estudos realizados em outros locais, incluindo países desenvolvidos e em desenvolvimento, têm sido observados percentuais de multirresistência bem inferiores (Olayinka et al. 2004, McGowan 2006, Raja & Singh 2007, Tam et al. 2010).

Observou-se também que dentre isolados resistentes ao imipenem e/ou ceftazidima, 44,83% foram positivos na pesquisa fenotípica de MBL, dos quais 46,15% positivos para o gene *bla_{SPM-1}*, não havendo detecção dos genes *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*. A detecção de *P. aeruginosa* produtora de MBL tem sido descrita em todo o mundo, com predominância dos tipos IMP e VIM (Walsh 2010). No Brasil a enzima mais prevalente é a SPM-1 (Picoli 2008, Figueiredo et al. 2009), cuja descrição permaneceu restrita ao território brasileiro até 2010, quando foi publicado o primeiro relato de SPM-1 na Europa, isolada em 2007 de um paciente suíço que havia sido atendido em um hospital universitário do Recife-PE, Brasil (Salabi et al. 2010).

Em *P. aeruginosa*, o gene *bla_{SPM-1}* já foi descrito em estados da região nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, com prevalência variando de 3,1% a 77,1% entre isolados resistentes a ceftazidima e/ou imipenem (Santos-Filho et al. 2003, Poirel et al. 2004, Magalhães et al. 2005, Cipriano et al. 2007, Mendes et al. 2004, Zavascki et al. 2005, Martins et al. 2007; Gräf et al. 2008, Wirth et al. 2009, Cezário et al. 2009, Sader et al. 2005, Franco et al. 2010, Gales et al. 2003, Carvalho et al. 2006; Scheffer et al. 2010). Apesar de não terem sido identificados no presente estudo, genes *bla_{IMP-tipo}* já foram detectados no Rio de Janeiro,

Brasília, João Pessoa, São Paulo, Porto Alegre e Santa Catarina (Pellegrino et al. 2001, Mendes et al. 2004, Santos-Filho et al. 2003, Tolleman et al. 2002, Sader et al. 2005, Martins et al. 2007, Shcheffer et al. 2010). Já o gene *bla*_{VIM-2} foi relatado apenas em São Paulo (Sader et al. 2005, Franco et al. 2010).

A conciliação de pesquisa de genes para produção de MBL e tipagem molecular para pesquisa de relação clonal entre os isolados de *P. aeruginosa* tem sido bastante frequente nos últimos anos, sendo considerada uma ferramenta importante por permitir verificar a transmissão cruzada em casos de surto (Mansour et al. 2009). Em Taiwan, Lee et al. (2008) observaram produção de MBL em 55% dos isolados resistentes ao impenem, onde os isolados envolvido no surto não estavam relacionados, já Mansour et al. (2009), na Tunísia, detectaram produção de MBL em apenas 7% dos isolados resistentes ao imipenem, com prevalência de um único perfil genético, indicando que o surto foi provocado a partir de uma mesma fonte de infecção. Em nosso estudo, verificou-se que houve disseminação clonal de um isolado de *P. aeruginosa* portador do gene *bla*_{SMP-1} entre 3 pacientes internados no HR no segundo semestre de 2010. Observou-se também que estes clones eram mucoides, produtores piocianina, gelatinase positivos e hemolisina positivos, além de terem apresentado o mesmo perfil de resistência, sendo sensíveis apenas à polimixina B, dentre os antimicrobianos testados. Os outros isolados *bla*_{SMP-1} positivos deste estudo não estavam relacionados geneticamente, bem como apresentaram perfis de fatores de virulência e de resistência distintos.

Na amostra total (61 isolados) foram identificados 21 perfis genéticos, com disseminação de sete clones (A, B, C, D, E, J e K) em mais de um hospital e em períodos distintos. Resultados semelhantes são frequentes, principalmente em estudos que envolvem pacientes graves e infecção crônica, condições estas, favoráveis a ocorrência de mutações

genéticas aleatórias não letais (Olive & Bean 1999, Arbeit 1999, Freitas et al. 2004, Argawal et al. 2005).

Concluímos então que a *P. aeruginosa* é um patógeno capaz de acumular diversos fatores de virulência e está muitas vezes associada à multirresistência e panresistência, dificultando o tratamento de infecções causadas por essa bactéria. A identificação de genes *bla_{SPM-1}* e disseminação de clones sugere a necessidade de aplicação mais rigorosa de medidas de controle de infecção nos hospitais de Recife, visando reduzir os custos e os danos provocados por este tipo de infecção, principalmente em pacientes graves.

REFERÊNCIAS

- Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico [serial on the Internet]. 2007. [cited 2009 oct 10]. Available from: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/carbapenens.htm.
- Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM- Ano III - Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008, Edição nº 1, de 10 de julho de 2009 [serial on the Internet]. 2009. [cited 2010 dez 14]. Available from: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm.
- Arakawa Y, Shibata S, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 38: 40–43.
- Arbeit RD 1999. Laboratory producer for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R, BARON, E. J, PFALLER, M. A, TENOVER, F. C, YOLKEN, R. H. *Manual of Clinical Microbiology* 7 ed, p. 116-137.
- Agarwal G, Kapil A, Kabra SK, Kumar B, Dwivedi SN 2005. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. *BMC Microbiol*, 5:1-11.
- Carvalho APDA, Albano RM, Oliveira DN, Cidade DAP, Teixeira LM, Marques EA 2006. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing *spm-1* metallo- β -lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* 12:103-108.
- Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S 2008. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination *Acinetobacter baumannii* strains. *J Microbiol Immunol Infect* 41: 513-518.

Cezário RC, De-Morais LD, Jferreira JC, Costa-Pinto RM, Darini ALC, Gontijo-Filho PP 2009. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27: 269–274.

Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, Høiby N 2008. Scandinavian cystic fibrosis study consortium. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology* 154:103-113.

Cipriano R, Vieira VV, Fonseca EL, Rangel K, Freitas FS, Vicente ACP 2007. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the bla_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microb Drug Resist* 13: 142-146.

CLSI 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement*, M100-S20, Wayne, Pennsylvania, USA, 160 pp.

Deptuła A, Gospodarek E 2010. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol* 192:79–84.

Dong F, Xu XW, Song WQ, Lü P, Yu SJ, Yang YH, Shen XZ 2008. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chin Med J* 121:1611-1616.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G 2009. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res* 109:511–517.

Figueiredo EAP, Ramos H, Maciel MAV, Vilar MCM, Loureiro NG, Pereira RG 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. *Rev Bras Ter Intensiva* 19: 421-427.

Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, Teixeira LM, Mondino SSB 2009. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. *J Bras Patol Med Lab* 45: 177-184.

Fothergill JL, Panagea S, Hart CA, Walshaw MJ, Pitt TL, Winstanley C 2007. Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiol* 7: 1-10.

Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F 2010. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. *Clin Sci* 65: 825-829.

Freitas AL, Barth AL 2004. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. *Braz J Med Biol Res* 37: 77-82.

Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN 2005. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis* 4: 276-278.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 52: 699-702.

Garrity G 2005. *Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology*, vol 2: *The Proteobacteria, Part A Introductory Essays*. 2nd ed, Softcover, 304 pp.

Gräf T, Fuentefria DB, Corção G 2008. Ocorrência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo-b-lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 306-308.

Hafiane A, Ravaoarinoro M 2008. Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. *Med Mal Infect* 38: 238-247.

Iwalokun BA, Akinsinde KA, Lanlenhin O, Onubogu CC 2006. Bacteriocinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas* species isolated in Lagos, Nigeria. *Afr J Biotechnol* 5: 1072-1077.

Kanemitsu K, Nishino T, Kunishma H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M 2001. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods* 47: 1-16.

Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P 2006. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* 8: 1121-1133.

Layeux B, Taccone FS, Fagnoul D, Vincent JL, Jacobs F 2010. Amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4939-4941.

Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Andersen JB, Høiby N, Molin N 2005. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 43: 5247-5255.

Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH 2008. Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 32: 475-480.

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

Madigan MT, Martinko JM, Parker J 2004. Diversidade Procariótica: Bacteria. In *Microbiologia de Brock*. Prentice Hall, São Paulo, p. 332-421.

Magalhães V, Lins AK, Magalhães M 2005. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. *Braz J Microbiol* 36: 123-125.

Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P 2009. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 458-461.

Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL 2007. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* 35: 457-460.

McGowan Jr JE 2006. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:s29-s37.

Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Ronald N, Jones RN, Walsh TR 2004. 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* 48:4693-4702.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC 2006. Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med Lab* 42: 103-113.

Olayinka AT, Onile BA, Olayinka BO 2004. Prevalence of multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in surgical units of Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Nigeria: an indication for effective control measures. *Ann Afr Med* 3: 13-16.

Olive DM, Bean P 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.

Pedersen SS 1992. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 28: 1-79.

Pellegrino FLP, Moreira MB, Nouer SA 2001. Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro, Abstract L-14. In: 101th ASM General Meeting.

Picoli SU 2008. Metallo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Bras Anal Clin* 40: 273-277.

Pinna A, Usai D, Sechi LA, Mollicotti P, Zanetti S, Carta A 2008. Detection of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Cornea* 27: 320-326.

Pires EJVC, Silva Júnior VV, Lopes ACS, Veras DL, Leite LE, Maciel MAV 2009. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. *Rev Bras Ter Intensiva* 21: 384-390.

Pitt TL, Simpson AJ 2006. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, London, p.427-443.

Poirel L, Magalhães M, Lopes M, Nordmann P 2004. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1406-1409.

Queenan AM, Bush K 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20: 440-458.

Raja NS, Singh NN 2007. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect* 40: 45-49.

Sader HS, Reis AO, Silber S, Gales AC 2005. IMPs, VIMs, SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 11: 73–76.

Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T; Frei R, Walsh TR 2010. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 582.

Samuelsen O, Buaro L, Toleman MA, Giske CG, Hermansen NO, Walsh TR, Sundsfjord A 2010. The first metallo-beta-lactamase identified in Norway is associated with a TnIC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 331–332.

Santos-Filho L, Santos I, Xavier DE, Menezes LC 2003. Tipagem molecular de amostras de pseudomonas aeruginosa produtoras de metalo- β -lactamases isoladas em João Pessoa/PB, Brasil. *Rev Bras Anal Clin* 35:127-131.

Scheffer MA, Gales AC, Barth AL, Filho JRC 2010. Dalla-Costa, L. M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* – clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. *Braz J Infect Dis* 14: 508-509.

Spacov ICG, Silva SAM, Morais Júnior MA, Morais MMC 2006. Polymorphism of the rDNA and tDNA loci in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: A perspective for molecular epidemiology surveillance. *Genet Mol Biol* 29: 722-729.

Stehling EG, Silveira WD, Leite DS 2008. Study of Biological Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis and from Patients with Extra-Pulmonary Infections. *Braz J Infect Dis* 12: 86-88.

Tam VH, Chang KT, Abdelraouf K, Brioso CG, Ameka M, McCaskey LA, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW 2010. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1160–1164.

Todar K, editor. The mechanisms of bacterial pathogenicity. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [book on the Internet]. 2009. [cited 2010 ago 28] Available from: <http://textbookbacteriology.net/themicrobialword/pathogenesis.html>.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 50: 673-679.

Walsh TR 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 36:s8-s14.

Winn Jr WC, Allen SD, Janda WM, Koneman E, Procop G, Schreckenberger PC, Woods G. 2008. Bacilos gram-negativos não fermentadores. In *Koneman Diagnostico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido*. 6ª ed. Guanabara Koogan, Brasil, p. 302-386.

Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli VV, Gonçalves ALS, Brust FR, Santos LMO, Barreto MF 2009. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 13:170-172.

Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 56:1148-1151.

Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro ALD, Gonçalves ALS, Goldani LZ 2006. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care* 10: 100-110.

6. ARTIGO 2

Primeiro relato de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de KPC no Brasil

First report of *Pseudomonas aeruginosa* KPC producing in Brazil

Autores:

- (1) Paula Regina Luna de Araújo Jácome – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Mestranda em Medicina Tropical.
- (2) Lílían Rodrigues Alves - Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas. Bacharel em Biomedicina.
- (3) Adriane Borges Cabral – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Mestranda em Medicina Tropical.
- (4) Ana Catarina de Souza Lopes – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco.
- (5) Maria Amélia Vieira Maciel – Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Tropical. Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco.

Endereços para Correspondência:

Paula Regina Luna de Araújo Jácome
Av. Norte, 3533, Apto 106/Bl P2 – Tamarineira, Recife-PE / Brasil
52051-000
Tel. 30720472
e-mail: paulajacome@ibest.com.br

Maria Amélia Vieira Maciel
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Medicina Tropical.
Av. Moraes Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE / Brasil
50670-901
Tel. 21268526
e-mail: amelia57@gmail.com

Revista:

A estruturação do artigo procura estar de acordo com os requisitos de publicação da Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (Elsevier), no formato short notes.

Pseudomonas aeruginosa é a causa mais frequente de infecção respiratória em pacientes hospitalizados. Neste estudo foram identificados por PCR dois isolados de *P. aeruginosa* KPC-positivos, geneticamente relacionados e com fenótipo de multirresistência, proveniente de um hospital escola localizado em Recife-PE, Brasil. Os achados deste estudo são importantes devido à capacidade deste patógeno de disseminar genes de resistência entre isolados da mesma espécie ou até mesmo para espécies diferentes. Este é o primeiro relato de infecção nosocomial provocada por *P. aeruginosa* portadora do gene *bla*_{KPC} no Brasil.

Palavras Chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenemase, Brasil

Nos últimos anos, a crescente descoberta de novas enzimas carbapemenases em diferentes partes do mundo, revela um grave problema de saúde pública global. Apesar dos carbapenêmicos serem os antibióticos de escolha apenas em casos de infecções graves provocadas por bactérias gram-negativas multirresistentes, em muitos hospitais, tem sido pratica comum utilizar carbapenêmicos no tratamento empírico de pacientes graves (Colardyn 2005, Souza et al. 2008). As carbapenemases são predominantemente encontradas em bacilos gram-negativos não fermentadores, como as *Pseudomonas aeruginosa*, com exceção das enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que são mais frequentemente encontradas em membros da família *Enterobacteriaceae* (Walsh 2010). O primeiro relato de *P. aeruginosa* produtora de KPC ocorreu em 2007 na Colômbia (KPC-2), seguido por relatos em Porto Rico (KPC-5), Trinidad e Tobago (KPC-2) e Estados Unidos (KPC-2), no entanto, ainda é rara a identificação de KPC nesta espécie bacteriana (Villegas et al. 2007, Wolter et al. 2009, Akpaka et al. 2009 e Poirel et al. 2010). Este trabalho relata o primeiro caso de infecção por *P. aeruginosa* produtora de carbapemenase tipo KPC no Brasil.

Em fevereiro de 2010, dois isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carapenêmicos foram recuperados a partir de amostras de secreção traqueal de dois pacientes distintos internados

em um hospital escola situado em Recife-PE, Brasil. Estes foram submetidos à pesquisa de susceptibilidade aos antimicrobianos por meio da técnica de difusão em disco, conforme critérios do CLSI (2010), tendo como controle de qualidade um isolado de *P. aeruginosa* (ATCC 27853). A pesquisa dos genes associados à produção de enzimas carbapemenase *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, foi investigada por meio de PCR utilizando primers específicos (Dong et al. 2008, Gales et al. 2003, Yigit et al. 2001). E a tipagem genética dos isolados foi realizada por meio da técnica de Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-based PCR (ERIC-PCR), conforme protocolo já estabelecido (Duan et al. 2009).

Ambos isolados foram caracterizados como multirresistentes, por terem apresentado resistência a amicacina, ciprofloxacina, ticarcilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefepime, ceftazidima, imipenem e meropenem, sendo sensíveis apenas a gentamicina e polimixina B. A tipagem molecular por ERIC-PCR revelou que os isolados eram clones, por apresentarem o mesmo perfil molecular, conforme apresentado na figura 1a. Os genes carbapemenase *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} não foram amplificados por PCR, por outro lado, o gene *bla*_{KPC} estava presente em ambos isolados, amplificando uma fragmento de 1000 pb, conforme representado na figura 1b.

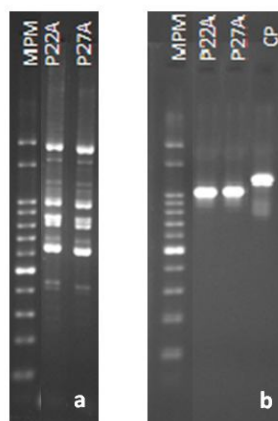


Figura 1. Eletroforese dos produtos de PCR, a. Tipagem molecular por ERIC-PCR; b. Pesquisa do gene *bla*_{KPC}.

Nota: MPM = marcador de peso molecular (Ladder 100pb – Amresco); CP = controle positivo; P22A e P27A = isolados de *P. aeruginosa* descritos neste artigo.

A identificação de *P. aeruginosa* produtora de KPC apresenta relevância no Brasil, devido à elevada prevalência deste patógeno envolvido em infecções relacionadas à assistência a saúde, muitas vezes associados às infecções respiratórias em pacientes graves (Sader et al. 2001, Pires et al. 2009). Concomitantemente, este patógeno apresenta um elevado nível de resistência intrínseca aos antimicrobianos, que somada a sua capacidade de desenvolver resistências adicionais por mutação genética ou aquisição de elementos genéticos móveis de resistência, dá origem a isolados multirresistentes ou mesmo panresistentes, cujo tratamento é mais longo e envolve maior risco de morte devido à necessidade de tratamentos utilizando elevadas doses de antimicrobianos por longos períodos e muitas vezes associado a diferentes classes de antimicrobianos (Castanheira et al. 2009, Layeux et al. 2010).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos encontrado neste estudo revelou sensibilidade apenas a gentamicina e polimixina B, ao passo que, tanto Villegas et al. (2007) como Poirel et al. (2010) identificaram isolados de *P. aeruginosa* produtores de KPC envolvidos nos surtos ocorridos na Colômbia e nos Estados Unidos, respectivamente, que eram sensíveis apenas a amicacina e colistina. Apesar dos antibióticos relatados acima serem distintos dos observados em nosso estudo, nos três casos o patógeno foi sensível a um aminoglicosídeo e um polipeptídeo, indicando ter sido esta, uma boa opção terapêutica para os pacientes envolvidos nos casos. Por outro lado, Akpaka et al. (2009) identificaram em Trinidad Tobago um isolado de *P. aeruginosa* produtor de KPC panresistente, não obtendo sucesso terapêutico e o paciente foi a óbito em dez dias após o diagnóstico da infecção.

Outra problemática observada foi à transmissão cruzada de clones bacterianos multiresistentes entre pacientes internados no mesmo período, indicando necessidade de reforçar as medidas de controle de infecção hospitalar estabelecida no hospital onde ocorreram os casos.

REFERÊNCIAS

- Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre AC, Quinn JP, Villega MV (2009) Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol* 47: 2670–2671.
- Castanheira M, Jones RN, Livermore DM (2009) Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63:426–433.
- CLSI (2010) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement*, M100-S20, Wayne, Pennsylvania, USA, 160 pp.
- Colardyn F (2005) Appropriate and timely empirical antimicrobial treatment of ICU infections – A role for carbapenems. *Acta Clin Belg* 60:51–62.
- Dong F, Xu XW, Song WQ, Lü P, Yu SJ, Yang YH, Shen XZ (2008) Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chin Med J* 121:1611–1616.
- Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G (2009) Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res* 109:511–517.
- Gales AC, Menezes, LC, Silbert S, Sader HS (2003) Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-b-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 52:699–702.
- Layeux B, Taccone FS, Fagnoul D, Vincent JL, Jacobs F (2010) Amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4939–4941.
- Pires EJVC, Silva Júnior VV, Lopes ACS, Veras DL, Leite LE, Maciel MAV (2009) Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. *Rev Bras Ter Intensiva* 21: 384–390.
- Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS (2010) Emergence of KPC producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3072.
- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zocolli C, Barth A, Jones RN (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 5:200–214.
- Souza NP, Noblat ACB, Noblat L (2008) Analysis of the use of imipenem at a university hospital following the restructuring of an antimicrobial audit system. *Braz J Infect Dis* 12:494–498.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP (2007) First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-

lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1553–1555.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, STEWARD CD, Alberti S, Bush K, TENOVER FC (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing b-lactamase, kpc-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 45:1151–1161.

Walsh TR (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 36:s8–s14.

Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND (2009) Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* 53:557-562.

7. Considerações Éticas

O presente trabalho não necessitou ser encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, por se tratar de um estudo experimental que utilizou amostra secundária fornecida pelas instituições envolvidas no mesmo, sem haver qualquer contato com o paciente, ou mesmo com dados do prontuário, não havendo a possibilidade de identificação dos respectivos pacientes.

8. Conclusões

Elevada frequência de produção de fatores de virulência e de isolados multirresistentes foi observada na amostra de *Pseudomonas aeruginosa* procedente de cinco hospitais públicos de Recife entre 2006 e 2010, com detecção de três isolados panresistentes e nove sensíveis apenas a polimixina B, representando 14,75% da amostra total.

Altos níveis de isolados produtores de MBL foram detectados entre os isolados resistentes a ceftazidima e/ou imipenem, estando o gene *bla_{SPM-1}* envolvido neste mecanismos de resistência.

Entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos, foi detectada a presença de dois isolados portadores do gene *bla_{KPC}*, constituindo o primeiro relato de isolados de *P.aeruginosa* KPC-positivas no Brasil.

A tipagem molecular dos isolados revelou 21 perfis genéticos distintos, com disseminação de sete clones em diferentes hospitais e coletados em períodos distintos.

O perfil de susceptibilidade detectado na amostra sugere a existência de associação de diferentes mecanismos de resistência.

9. Referências

- AKPAKA, P. E.; SWANSTON, W.H.; IHEMER, H. N.; CORREA, A.; TORRES, J. A.; TAFUR, J. D.; MONTEALEGRE, A. M.; QUINN, J. P.; VILLEGAS, M. V. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2670–2671, 2009.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 289, n.36, p.321-331, 1980.
- ANVISA (2007), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/carbapenens.htm>. acessado em 10 out. 2009.
- ANVISA (2009), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM- Ano III - Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008, Edição nº 1, de 10 de julho de 2009. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm>. acessado em 14 dez. 2010.
- ARAKAWA, Y.; SHIBATA, S.; SHIBAYAMA, K.; KUOKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 40–43, 2000.
- ARBEIT, R. D. Laboratory producer for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed., p. 116-137, 1999.
- AGARWAL, G.; KAPIL, A.; KABRA, S. K.; KUMAR, B.; DWIVEDI S. N. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. **BioMed Center Microbiology**, v. 5, p. 1-11, 2005.
- BERKA, R. M.; VASIL, M. L. Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterisation. **Journal of Bacteriology**, v. 152, p. 239-245, 1982.
- BODI, M.; GARNACHO, J. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamento combinado frente a monoterapia. **Medicina Intensiva**, Madrid, v. 31, n. 2, março 2007. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912007000200005&lng=es&nrm=iso>. acessado em 17 nov. 2009.
- BONFIGLIO, G.; RUSSO, G.; NICOLETTI, G. Recent developments in carbapenems. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.11, n. 4, p. 529-544, 2002.
- BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; MICHAEL SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1–12, 2009.
- BRATU, S.; LANDMAN, D.; ALAM, M.; TOLENTINO, E.; QUALE, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 776-778, 2005.
- BRITIGAN B.E.; HAYEK M.B.; DOEBBELING B.N.; FICK R.B. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa* - infected lungs of patients with cystic fibrosis. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 5049-55, 1993.
- BRITIGAN, B. E. Role of reactive oxygen species in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas aeruginosa: The opportunist. Pathogenesis and disease*. Fick, Jr, RB (ed). Boca Raton: CRC Press, p. 113-140, 1993.

- BUSH, K. Characterization of β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.33, n.3, p.259-263, 1989.
- BUSH, K.; JACOBI, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.
- BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1085-1089, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A; AMICOSANTE, G.; BONOMO, R. A.; BRADFORD, P.; CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; GIAMARELLOU, H.; JARLIER, V.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; MIRIAGOU, V.; PALZKILL, T.; PASCUAL, A.; RODRIGUEZ-BAÑO, J.; ROSSOLINI, G. M.; SOUGAKOFF, W.; VATOPOULOS, A. Comment on: Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 212–215, 2009.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- CARDOSO, O.; ALVES, A. F.; LEITÃO, R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 375–379, 2008.
- CARRER, A.; POIREL, L.; YILMAZ, M.; AKAN, O. A.; FERIHA, C.; CUZON, G.; MATAR, G.; HONDERLICK, P.; NORDMANN, P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 1369–1373, 2010.
- CARVALHO, A. P. D. A.; ALBANO, R. M.; OLIVEIRA, D. N.; CIDADE, D. A. P.; TEIXEIRA, L. M.; MARQUES, E. A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 2, p. 103-108. 2006
- CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, R. N.; SCHMIDT, F. J.; WALSH, T. R. Molecular characterization of a betalactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n.12, p. 4654-61, 2004.
- CASTANHEIRA, M.; WANGER, A.; KRUZEL, M.; DESHPANDE, L. M.; JONES, R. N. Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3179–3180, 2008.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase –United States, 2010. **MMWR Morbidity and Mortal Weekly Report**, v.59, n. 24, p.750, 2010.
- CEVAHIR, N.; DEMIR, M.; KALELI, I.; GURBUZ M.; TIKVESLI, S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination *Acinetobacter baumannii* strains. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 41, p. 513-518, 2008.
- CEZÁRIO, R. C.; DE-MORAIS, L. D.; JFERREIRA, 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 an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enfermidades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 5, p. 269–274, 2009.
- CHEN, L. R.; ZHOU, H. W.; CAI, J. C.; ZHANG, R.; CHEN, G. X. Combination of IMP-4 metallo-beta-lactamase production and porin deficiency causes carbapenem resistance in a *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, p. 163–167, 2009.
- CIOFU, O.; LEE, B.; JOHANNESSON, M.; HERMANSEN, N. O.; MEYER, P.; HØIBY, N. Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. Investigation of the *algT* operon sequence in

mucoïd and non-mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoïd revertants. **Microbiology**, v. 154, p. 103-113, 2008.

CIPRIANO, R.; VIEIRA, V. V.; FONSECA, E. L.; RANGEL, K.; FREITAS, F. S.; VICENTE, A. C. P. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth information supplement (June 2010 update). **CLSI document M100-S20-U (ISBN 1-56238-729-4)**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2010.

CORNAGLIA, G.; RUSSEL, K.; SATTA, G.; FONTANA, R. Relative importances of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, p. 350-355, 1995.

CORNAGLIA, G.; MAZZARIOL, A.; LAURETTI, L.; ROSSOLINI, G.M.; FONTANA, R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- β -lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.1119-1125, 2000.

CURTIS, N. A.; ORR, O.; ROSS, G. W.; BOULTON, M. G. Competition of beta-lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgen*, and *Escherichia coli*: Comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 16, p. 25-328, 1979.

DAVIES, T. A.; SHANG, W.; BUSH, K.; FLAMM, R. K. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.52, p. 1510-1512, 2008.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina e Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 365-367, 2010.

DOI, Y.; GHILARDI A. C. R.; ADAMS, J.; GARCIA, D. O.; PATERSON, D. L. High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 9, p. 3388-3390, 2007.

DONG, F.; XU, X. W.; SONG, W. Q.; LÜ, P.; YU, S. J.; YANG, Y. H.; SHEN, X. Z. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 17, p.1611-1616, 2008.

DORING, G.; DALHOFF, A.; VOGEL, O.; BRUNNER, H.; DROGE, V. E.; BOTZENHART, K. In vivo activity of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 149, n. 4, p. 532-537, 1984.

DORTET, L.; RADU, I.; GAUTIER, V.; BLOT, F.; CHACHATY, E.; ARLET, G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 455-457, 2008.

DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; ZHANG, X.; QI, C.; GAO, J.; WANG, Y.; CAI, Y.; MIAO, Z.; YAO, M.; SCHLENKER, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.

ESPEDIDO, B. A.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. R. *bla*_{IMP-4} in different genetic contexts in *Enterobacteriaceae* isolates from Australia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 2984-2987, 2008.

FERREIRA, L. L. **Estrutura Clonal e Multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de

Janeiro, 114p, 2005.

- FICK, R. B.; BALTIMORE, R. S.; SQUIRE, S.V.; REYNOLDS, H. Y. IgG proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 4, p. 589-598, 1985.
- FIGUEIREDO-MENDES, C. M.; SINTO, S.; MELLO-SAMPAIO, J. L.; CARDOSO-LEÃO, S.; OPLUSTIL, C. P.; TURNER, P.; VEIGA-KIFFER, C. R. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 23, n. 7, p. 402-405, 2005.
- FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.
- FIGUEIREDO, D. Q.; CASTRO, L. F. S.; SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; MONDINO, S. S. B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2009.
- FORTALEZA, C. M.; BACCHI, C. E.; OLIVEIRA, D. E.; MONTELLI, A. C.; CORREIA, C. R.; RAMOS, M. C. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Brazilian University Hospital using ERIC-PCR. Abstract in **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, sep 17-20, 40th, p. 416.
- FRANCO, M. R. G.; CAIAFFA-FILHO, H. H.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. **Clinical Science**, v. 65, n. 9, p. 825-829, 2010.
- FREITAS, A. L.; BARTH, A. L. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 1, p. 77-82, 2004.
- FRITSCH, T. R.; SADER, H. S.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; JONES, R. N. Emerging Metallo-b-Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clinical Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p.276-278, 2005.
- FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5 p. 470-473, 2008.
- GALES, A.C.; MENDES, R.E.; RODRIGUES, J.; SADER, H.S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.1, p.13-20, 2002.
- GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-b-lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699-702, 2003.
- GALLEN, M.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; ROSSOLINI, G.M.; SPENCER, J.; DIDEBERG, O.; FRÈRE, J.M.; THR METALLO-b-LACTAMASE WORKING GROUP. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, n.3, p.660-663, 2001.
- GANTA, S. R.; PERUMAL, S.; PAGADALA, S. R.; SAMUELSEN, O.; SPENCER, J.; PRATT, R. F.; BUYNACK, J. D. Approaches to the simultaneous inactivation of metallo- and serine-betalactamases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, n. 6, p. 1618-1622, 2009.

- GARAU, G.; GARCÍA-SÁEZ, I.; BEBRONE, C.; ANNE, C.; MERCURI, P.; GALLEN, M.; FRÈRE, J.M.; DIDEBERG, O. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.7, p.2347-2349, 2004.
- GARRITY, G. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**, Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays. Softcover, 2nd ed, 304 p; 2005.
- GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848–854, 2005.
- GIRLICH, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 48 , n. 6, p. 2043-2048, 2004.
- GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. First isolation of the *bla*OXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 578–579, 2010.
- GONÇALVES, D. C. P. S.; LIMA, A. B. M.; LEÃO, L. S. N. O.; CARMO FILHO, J. R.; PIMENTA, F. C.; VIEIRA, J. D. G. Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 411-414, 2009.
- GOOTZ, T. D.; LESCOE, M. K.; DIB-HAJJ, F.; DOUGHERTY, B. A.; HE, W.; DELLA-LATTA, P.; HUARD R. C. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*KPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 1998–2004, 2009.
- GOREN, M. G.; CARMELI, Y. SCHWABER, M. J.; CHMELNITSKY, I.; SCHECHNER, V.; NAVON- VENEZIA, S. Carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014-1017, 2010.
- GRÄF, T.; FUENTEFRÍA, D. B.; CORÇÃO, G. Ocorrência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo-b-lactamase *bla*_{SPM-1} em amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 306-308, 2008.
- GÜLMEZ, D.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F.; MUSHTAQ, S.; METAN, G.; YAKUPOGULLARI, Y.; KOCAGOZ, S.; UZUN, O.; HASCELİK, G.; LIVERMORE, D. M. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 523–526, 2008.
- HAFIANE, A.; RAVAOARINORO, M. Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 38, n. 5, 238–247, 2008.
- HÄUSSLER, S.; TÜMMLER, B.; WEISSBRODT, H.; ROHDE, M.; STEINMETZ, I. Small- colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cysticfibrosis. **Clinical and Infectious Diseases**. v. 29, p. 621–625, 1999.
- HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, suppl 1, p. 3–10, 2009.
- HAYES, M. V.; ORR, O. C. Mode of action of ceftazidime: Affinity for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K1 2, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, p. 119-126, 1983.
- HECK, L. W.; MORIHARA, K.; MCRAE, W. B.; MILLER, E. J. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 115-118, 1986.

- HIGGINS, P. G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 5035–5038, 2009.
- HIGGINS, P. G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 233–238, 2010.
- HIRAIWA, Y.; MORINAKA, A.; FUKUSHIMA, T.; KUDO, T. Metallo-beta-lactamase inhibitory activity of phthalic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p.5162–5165, 2009.
- HIRSCH, E. B; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumonia* carbapenemases: an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1119–1125, 2010.
- HOGARDT, M.; HOBOTH, C.; SCHMOLDT, S.; HENKE, C.; BADER, L.; HEESEMANN, J. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. **Journal of Infectious Diseases**. v. 195, p. 70–80, 2007.
- HOLLANDER, J. G. D.; HORREVORTS, A. M.; VAN GOOR, M. L.; VERBRUGH, H. A.; MOUTON, J. W. Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, tested in an in vitro pharmacokinetic model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 41, n. 1, p. 95-100, 1997.
- HUANG, Y. T.; CHANG, S. C.; LAUDERDALE, T. L.; YANG, A. J.; WANG, J. T. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo- β -lactamase genes in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, n. 2, p. 211–216, 2007.
- HUSSAIN, M.; CARLINO, A.; MADONNA, M.J.; LAMPEN, J.O. Cloning and sequencing of the metalloprotein β -lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.164, n.1, p.223-229, 1985.
- IWALOKUN, B. A.; AKINSINDE, K. A.; LANLENHIN, O.; ONUBOGU, C. C. Bacteriocinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas* species isolated in Lagos, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 11, p. 1072-1077, 2006.
- JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The New β -lactamases. **The New England Journal of Medicine**, v. 352: 380-391. 2005
- JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, p.77-84, 2005.
- KANEMITSU, K.; NISHINO, T.; KUNISHIMA, H.; OKAMURA, N.; TAKEMURA, H.; YAMAMOTO, H. *et al.* Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. **Journal of Microbiology Methods**, v. 47, p. 11-16. 2001.
- KHOSRAVI, A. D.; MIHANI, F. Detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 125–128, 2008.
- KISKA, D. L.; GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington D.C., American Society for Microbiology, p. 719-728, 2003.
- KOHLER, T. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa* respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 424-427, 1999.
- KONG, F.; YOUNG, L.; CHEN, Y.; RAN, H.; MEYERS, M.; JOSEPH, P. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1121-

1133, 2006.

- KUWABARA, S.; ABRAHAM, E.P. Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. **Biochemical Journal**, v.103, p.27-30, 1967.
- LAGATOLLA, C.; EDALUCCI, E.; DOLZANI, L.; RICCIO, M. L.; DE LUCA, F.; MEDESSI, E.; ROSSOLINI, G. M.; TONIN, E. A. Molecular evolution of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high level endemicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2348–2353, 2006.
- LAHEY CLINIC. β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes, **LAHEY CLINIC**, 2011. Disponível em: < [http:// www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)>. Acessado em: 05 jan. 2011.
- LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. 41, p. 22–26, 2002.
- LANOTTE, P.; WATT, S.; MEREGHETTI, L.; DARTIGUELONGUE, N.; RASTEGAR-LARI, A.; GOUDEAU, A.; QUENTIN, R. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 73-81, 2004.
- LARANJEIRA, V. S.; MARCHETTI, D. P.; STEYER, J. R.; CORÇÃO, G.; PICOLI, S. U. Pesquisa de *Acinetobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 462-464, 2010.
- 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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-90, 1999.
- LAYEUX, B.; TACCONE, F. S.; FAGNOUL, D.; VINCENT, J. L.; JACOBS F. amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 11, p. 4939-4941, 2010.
- LEAVITT, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3026–3029, 2007.
- 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}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.
- LEE, M. F.; PENG, C. F.; HSU, H. J.; CHEN, Y. H. Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 6, p. 475–480, 2008.
- LEIBOVICI, L.; PAUL, M.; POZNANSKI, O.; DRUCKER, M.; SAMRA, Z.; KONIGSBERGER, H.; PITLIK, S. D. Monotherapy versus b-Lactam–Aminoglycoside Combination Treatment for Gram-Negative Bacteremia: a Prospective, Observational Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 1127–1133, 1997.
- LIN, Y. C.; HSIA, K. C.; CHEN, Y. C.; SHENG, W. H.; CHANG, S. C.; LIAO, M. H.; LI, S. H. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter* clinical isolates in Taiwan. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 2078–2084, 2010.
- LINKER, A.; JONES, R. S. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* micro-

- organism. *Nature* (London), v. 204, n. 4954, p. 187-188, 1964.
- LIVERMORE, D. M. Role of beta-lactamases and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Chemother**, v. 42, p. 257-263, 1989.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology**, v. 8, p. 557-584, 1995.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n. 1, p. 634-640, 2002.
- LIVERMORE, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, supp 1, p. 29-36, 2009.
- LU, P. L.; DOUMITH, M.; LIVERMORE, D. M.; CHEN, T. P.; WOODFORD, N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 641-647, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, p. 348-51, 2004.
- MAGALHÃES, V.; LINS, A. K.; MAGALHÃES, M. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 123-125, 2005.
- MANSOUR, W.; POIREL, L.; BETTAIEB, D.; BOUALLEGUE, O.; BOUJAFFAR, N.; NORDMANN, P. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p.458-461, 2009.
- MARCHIARO, P.; VIALE, A. M.; BALLERINI, V.; ROSSIGNOL, G.; VILA, A. J.; LIMANSKY, A. First report of a Tn402-like class 1 integron carrying *bla*VIM-2 in *Pseudomonas putida* from Argentina. **Journal of infection in developing countries**, v. 4, p. 412-416, 2010.
- MARTÍNEZ, L.; GÓMEZ, L.; GARAU, J. Infecciones por *Pseudomonas*. En: Auxina V, Moreno S, editores. **Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica**. Madrid: Médica Panamericana. p. 347-56, 2006.
- 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- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. **Infection**, v. 35, n. 6, p. 457-460, 2007.
- MATHESON, N. R.; POTEPMAN J.; TRAVIS, J. Interaction of a novel form of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease (aeruginolysin) with interleukin-6 and interleukin-8. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 7, p. 911-915, 2006.
- MATTHEWS, S. J.; LANCASTER, J. W. Doripenem monohydrate, a broad-spectrum carbapenem antibiotic. **Clinical Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 42-63, 2009.
- MAVROIDI, A.; TSAKRIS, A.; TZELEPI, E.; POURNARAS, S.; LOUKOVA, V.; TZOUVELEKIS, L.S. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, n. 6, p.1037-1046, 2000.
- MENA, A.; SMITH, E. E.; BURNS, J. L.; SPEERT, D. P.; MOSKOWITZ, S. M.; PEREZ, J. L.; OLIVER, A. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airwaysof cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. **Journal of Bacteriology**. v. 190, p.7910-7917, 2008.
- MENDES, R. E.; TOLEMAN, M. A.; RIBEIRO, J.; SADER, H. S.; RONALD N. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4693-4702, 2004.

- MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M. PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n. 2, p. 103-113, 2006.
- MENDES, R. E.; BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 55–59, 2009.
- MERINO, M.; ACOSTA, J.; POZA, M.; SANZ, F.; BECEIRO, A.; CHAVES, F.; BOU, G. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 2724–2727, 2010.
- MINAMI, S.; AKAMA, M.; ARAKI, H.; WATANABE, Y.; NARITA, H.; IYOBE, S.; MITSUHASHI, S. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 433–44, 1996.
- MINOND, D.; SALDANHA, S. A.; SUBRAMANIAM, P.; SPAARGAREN, M.; SPICER, T.; FOTSING, J. R.; WEIDE, T.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B.; GALLEN, M.; BEBRONE, C.; LASSAUX, P.; HODDER, P. Inhibitors of VIM-2 by screening pharmacologically active and click-chemistry compound libraries. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, p. 5027–5037, 2009.
- 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. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 16, n. 2, p. 112–122, 2010.
- MOHR, J. F 3rd. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacteria infections. **Clinical and Infectious Diseases**. v. 47, suppl. 1, p. S41-S51, 2008.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.
- MORIMOTO, H.; BONAVIDA, D. Diphtheria toxin- and *Pseudomonas aeruginosa* A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 2, p. 2089-2094, 1992.
- MOTTA, F. A. **Avaliação de Métodos Moleculares de Tipagem de Isolados Nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa* Resistentes a Carbapenêmicos**. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2006.
- MOUTON, J. W. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. **Infection**, v. 27, n. 2, p. 24-28, 1999.
- MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Núcleo de Comunicação/SVS. Clipping – 28 de outubro de 2010 – quinta-feira. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_31_10_2010.pdf>. Acessado em 21 jan. 2011. MS, 2010a.
- MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Núcleo de Comunicação/SVS. Clipping – 11 de novembro de 2010 – terça-feira. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_11_11_2010.pdf>. Acessado em 21 jan. 2011. MS, 2010b.
- MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Núcleo de Comunicação/SVS. Clipping – 23 de novembro de 2010 – terça-feira. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_23_11_2010.pdf>. Acessado em 21 jan. 2011. MS, 2010c.

- MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Núcleo de Comunicação/SVS. Clipping – 07 de janeiro de 2011 – terça-feira. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_07012011.pdf>. Acessado em 21 jan. 2011. MS, 2011.
- MUGNIER, P. D.; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the *bla*OXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 35–40, 2010.
- MURPHY, T. A.; SIMM, A.M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 582-587, 2003.
- MURPHY, T. A.; CATTO, L. E.; HALFORD, S. E.; HADFIELD, A. T.; MINOR, W.; WALSH, T. R.; SPENCER, J. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 provides insights into variable zinc affinity of metallo-beta-lactamases. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, p. 890–903, 2006.
- NAMVAR, A. E.; ASGHARI, B.; ZADEH, S.; ABDOLAZIZ RASTEGAR LARI, A. R. Comparison of *in vitro* activity of imipenem productions on bacterial isolates from Hashemi Nezhad Tehran hospitalized patients. **Journal of Bacteriology Research**. v. 2, n. 5, p. 51-54, 2010.
- NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; SCHWABER, M. J.; RASHEED, J. K.; SRINIVASAN, A.; PATEL, J. B.; CARMELI, Y.; ISRAELI KPC KPN STUDY GROUP. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumonia* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 818–820, 2009.
- NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 128-131, 1998.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 228–236, 2009.
- ODE, T.; SAITO, R.; KUMITA, W.; SATO, K.; OKUGAWA, S.; MORIYA, K.; KOIKEB, K.; OKAMURA, A. Analysis of plasmidmediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 347–350, 2009.
- OJENIYI, B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 46, p. 1–44, 1994.
- OLGE, J. W.; JANDA, J. M.; WOODS, D. E.; VASIL, M. L. Characterization and use of aDNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, p. 119–126, 1987.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.
- 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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p.71-78, 1994.
- PAI, H.; KIM, J. W.; KIM, J. LEE, J.H.; CHOE, K. W.; GOTOH, N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, 480-484, 2001.
- PARMELY, M.; GALE, A.; CLABAUGH, M.; HORVAT, R.; ZHON, W. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 3009-3014, 1990.
- PATEL, J. B.; RASHEED, J. K.; KITCHEL, B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**. v.31, n.8, p.55-62,

2009.

- PEDERSEN, S.S. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 28, p. 1-79, 1992.
- PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 265–268, 2009.
- PELLEGRINO, F. L. P.; MOREIRA, M. B.; NOUER, S. A. Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro, Abstract L-14. In: **101th ASM General Meeting**, 2001.
- PERENTESIS, J. P.; MILLER, S. P.; BODLEY, J. W. Protein toxin inhibitors of protein synthesis. **Biofactors**, v. 3, n. 3, p. 173-184, 1992.
- PFALLER, M. A.; ACAR, J.; JONES, R. N.; VERFHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H. S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, s. 2, p. 156-167, 2001.
- PICÃO, R. C.; GALES A. C. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar**, ano IX, n. 49, p. 79–84, 2007.
- PICOLI, S. U. Metallo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 4, p. 273-277, 2008.
- PINNA A, USAI D, SECHI LA, MOLICOTTI P, ZANETTI S, CARTA A. Detection of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. **Cornea**, v. 27, n. 3, p. 320-326, 2008a.
- PINNA, A. U. D.; SECHI, L. A.; ZANETTI, S. A. L.; KALIAMURTHY, J. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with post-operative endophthalmitis. **Acta Ophthalmologica**, v. 86, s 243, 2008b.
- PIRES, E. J. V. C.; SILVA JÚNIOR, V. V.; LOPES, A. C. S.; VERAS, D. L.; LEITE, L. E.; MACIEL, M. A. V. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21. N. 4, p. 384-390, 2009.
- PITT, T. L.; SIMPSON, A. J. *Pseudomonas and Burkholderia spp.* In: **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**. Second Edition. (Eds. SH Gillespie, PM Hawkey). John Wiley & Sons, London, p.427-443, 2006.
- POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 84-85, 2000.
- POIREL, L.; THIERRY, N. A. A. S. T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J. D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenemhydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 891-7, 2000.
- POIREL, L.; MAGALHÃES, 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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.4, p.1406-1409, 2004.
- POIREL, L.; BRINAS, L.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. Integron-encoded GES-type extendedspectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3593-3597, 2005.
- POIREL, L.; LEBESSI, E.; HERITIER, C.; PATSOURA, A.; FOUSTOUKOU, M.; NORDMANN, P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. **Clinical Microbiology and Infecton**, v.12, p.1138–1141, 2006.

- POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, p. 1442–1448, 2006.
- POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, p. 501–512, 2007.
- POIREL, L.; FIGUEIREDO, S.; CATTOIR, V.; CARATTOLI, A.; NORDMANN, P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 1252–1256, 2008.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 24–38, 2010.
- POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 3072, 2010a.
- POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; AL, NAIEMI, N. A.; DEBETS-OSSENKOPP, Y. J.; NORDMANN, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in The Netherlands. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p. 2420–2424, 2010b.
- POOLE, K.; KREBES, K.; McNALLY C.; NESHAAT, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7363-7372, 1993.
- POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Components, mechanisms and clinical significance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 59-71, 2001.
- POTTUMARTHY, S.; MOLAND, E. S.; JERETSCHKO, S.; SWANZY, S. R.; THOMSON, K. S.; FRITSCH, T. R. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacteriaceae* in North American. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 999-1002, 2003.
- PROJAN, S. J. Whither antibacterial drug discovery? **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 279–280, 2008.
- QI, Y.; WEI, Z.; LI, L.; JI, S.; DU, X.; SHEN, P.; YU, Y. Detection of a common plasmid carrying *bla*KPC-2 in *Enterobacteriaceae* isolates from distinct cities in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 4, p. 297-301, 2010.
- QUEENAN, A. M.; SHANG, W.; SCHERECKENBERGER, P.; LOLANS, K.; BUSH, K.; QINN, J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, p. 3485–3487, 2006.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 440–458, 2007.
- RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, p.223–232, 1997.
- ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEON, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 1354–1357, 2010.
- ROCHE, C.; COTTER, M. O.; CONNELL, N.; CROWLEY, B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. **Euro Surveillance**, v. 14, n. 13, p. 1-2, 2009.
- ROSEWARNE CP, PETTIGROVE V, STOKES HW, PARSONS YM. Class 1 integrons in benthic

- bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, p. 35–46, 2010.
- ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 11, n. 4, p. 17–32, 2005.
- ROSSOLINI, G.M. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. **Clinical Infectious Disease**, v.41, n. p.1557-1558, 2005.
- SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase form *Bacillus cereus* 569. **Biochemical Journal**, v. 98, p. 11c-13c, 1966.
- SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, 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. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 5, p. 200-214, 2001.
- SADER, H. S.; REIS, A. O.; SILBER, S.; GALES, A. C. IMPs, VIMs, SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 1, p. 73–76, 2005.
- SALABI, A. E.; TOLEMAN, M. A.; WEEKS, J.; BRUDERER, T; FREI, R.; WALSH, T. R. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 582, 2010.
- SAMUELSEN, O.; BUARO, L.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; HERMANSEN, N. O.; WALSH, T. R.; SUNDSFJORD, A. The first metallo-beta-lactamase identified in Norway is associated with a TniC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 331–332, 2010.
- SANTOS-FILHO, L.; SANTOS, I.; XAVIER, D. E.; MENEZES, L. C. Tipagem molecular de amostras de pseudomonas aeruginosa produtoras de metalo- β -lactamases isoladas em João Pessoa/PB, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 3, p. 127-131, 2003.
- SCHEFFER, M. A., GALES, A. C. BARTH, A. L. FILHO, J. R. C. DALLA-COSTA, L. M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* – clonal spread in Southern Brazil and in the State of Goiás. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 508-509, 2010.
- SCHÜMANN, J.; ANGERMÜLLER, S.; BANG, R.; LOHOFF, M.; TIEGS G. Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cells and TNF. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 5745-5754, 1998.
- SCHÜMANN, J.; BLUETHMANN, H.; TIEGS, G. Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with endotoxin, superantigen, or TNF results in TNFRa- and TNFR2-dependent liver toxicity in mice. **Immunology Letters**, v. 74, n. 2, p. 165-172, 2000.
- SECHI, L. A.; KARADENIZLI, A.; ZANETTI, S.; KOLAYLI, F.; BALIKCI *et al.* PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. **Medical Science Monitor**, v. 10, p. 80-84, 2004.
- SEKIGUCHI, J. I.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194–4197, 2008.
- SENDA, K.; ARAKAWA, Y.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broadspectrum β -lactams, including carbapenems. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, n.2, p.349-353, 1996.

- SENER B, KOSEOGLU O, OZCELIK U, KOCAGOZ T, GUNALP A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infectious in cystic fibrosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 387–393, 2001.
- SEVILLANO, E.; GALLEGU, L.; GARCÍA-LOBO, J.M. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 6, p. 493-495, 2009.
- SHAHID, M.; SOBIA, F.; SINGH, A.; MALIK, A.; KHAN, H. M.; JONAS, D.; HAWKEY, P. M. Betalactams and beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: a comprehensive update. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 81–108, 2009.
- SONG, J.; XIE, G.; ELF, P. K.; YOUNG, K. D.; JENSEN, R. A. Comparative analysis of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 7 in the context of its membership in the family of low-molecular-mass PBPs. **Microbiology**, v. 144, n. 4, p. 975-983, 1998.
- SPACOV, I. C. G.; SILVA, S. A. M.; MORAIS JÚNIOR, M. A.; MORAIS, M. M. C. Polymorphism of the rDNA and tDNA loci in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: A perspective for molecular epidemiology surveillance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 722-729, 2006.
- SPEERT, D. P. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, n. 7, p. 354-361, 2002.
- STEHLLING, E. G.; SILVEIRA, W. D.; LEITE, D. S. Study of Biological Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis and from Patients with Extra-Pulmonary Infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12 n. 1, p. 86-88, 2008.
- STOEVA, T.; HIGGINS, P. G.; BOJKOVA, K.; SEIFERT, H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 723–727, 2008.
- SUMLTA, Y.; FUKASAWA, M. Potent activity of meropenem against *Escherichia coli* arising from its simultaneous binding to penicillin-binding proteins 2 and 3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 36, p. 53-64, 1995.
- SYRMIS, M. W.; O'CARROLL, M. R; SLOOTS, T. P; COULTER, C.; WAINWRIGHT, C. E.; BELL, S. C.; NISSEN, M. D. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1089–1096, 2004.
- TAM, V. H; CHANG, K. T; ABDELRAOUF, K; BRIOSO, C. G; AMEKA, M; MCCASKEY, L. A; WESTON, J. S; CAEIRO, J. P; GAREY, K. W. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.v.54, n. 3, p. 1160–1164, 2010.
- TATO M, COQUE TM, BAQUERO F, CANTON R. Dispersal of carbapenemase blaVIM–1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 320–327, 2010.
- TEIXEIRA, P. J. Z.; HERTZ, F. T.; CRUZ, D.B.; CARAVE, F.; HALLAL, R. C.; MOREIRA, J. S. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 6, p. 540-548, 2004.
- 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 eletrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- TODAR, K. The Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**.

2009. Disponível em <http://textbookbacteriology.net/themicrobialword/pathogenesis.html>. acessado em: 28 de agosto de 2010.

- 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 Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-9, 2002.
- TOLEMAN, M. A.; BIEDENBACH, D.; BENNETT, D. M.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 61-70, 2005.
- TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 296-316, 2006
- TOLEMAN, M. A.; VINODH, H.; SEKAR, U.; KAMA, T. V.; WALSH, T. R. *bla*VIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 2636-2638, 2007.
- TOWNER, K. J.; LVI, K.; VLASSIADI, M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p.161-167, 2008
- URBAN, C.; BRADFORD, P. A.; TUCKMAN, M.; SEGAL-MAURER, S.; WEHBEH, W.; GRENNER, L.; COLON-URBAN, R.; MARIANO, N.; RAHAL, J. J. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 127-130, 2008.
- VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R. ZERVOS, M. J.; *et al.* Association between the presence of enterococcal virulence factor gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 570-575, 2002.
- VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LOPEZ, J. A.; QUINN, J. P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1553-1555, 2007.
- VRANE, J.; BRKIÊ, I.; HORONITZ, M. Differences in the antigenic structure and production of hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of isolation sites. **Acta Clinica Croatica**; v. 40, p. 85-91, 2001.
- WACHINO, J.; DOI, Y.; YAMANE, K.; SHIBATA, N.; YAGI, T.; KUBOTA, T.; ARAKAWA, Y. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2905-2910, 2004.
- WALSH, T.R. The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, s.6, p.2-9, 2005.
- WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005a.
- WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 306-325, 2005b.
- WALSH, T. R. Clinically significant carbapenemases: an update. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 367-371, 2008.
- WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suppl 3, p. S8-S14, 2010.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial**

- Chemotherapy**, v. 57, p. 373–383, 2006.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 470–482, 2007.
- WANG, C.; CAI, P.; CHANG, D.; MI, Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261–1262, 2006.
- WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.35, n.1, p.147-151, 1991.
- WHO, World Health Organization. Second Meeting of Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines, 2008. Disponível em: http://www.who.int/selection_medicines/committees/subcommittee/2/Ceftazidime.pdf acessado em: 05 de setembro de 2009.
- WICK, M. J.; FRANK, D. W.; STOREY, D. J.; IGLEWSKI, B. H. Identification of *regB*, a gene required for optimal exotoxin A yields in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 489-497, 1990.
- WINN JR, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. Koneman Diagnostico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. **Guanabara Koogan**, Brasil; 2008.
- WIRTH, F. W.; PICOLI, S. U.; CANTARELLI, VV.; GONÇALVES, A. L. S.; BRUST, F. R.; SANTOS, L. M. O.; BARRETO, M. F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, n. 3, p.170-172, 2009.
- WOLF, P.; ELSÄSSER-BEILE, U. *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 3, p. 161–176, 2009.
- WOLTER, D. J.; KURPIEL, P. M.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F.; GOERING, R. V.; HANSON, N. D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 557-562, 2009.
- WOLSKA, K.; SZWEDA, P. A comparative evaluation of PCR Ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 157–163, 2008.
- WOODFORD, N.; TIerno JR, P. M.; YOUNG, K.; TYSALL, L.; PALEPOU, M. F.; WARD, E.; PAINTER, R. E.; SUBER, D. F.; SHUNGU, D.; SILVER, L. L.; INGLIMA, K.; KORNBLUM, J.; LIVERMORE D. M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 4793–4799, 2004.
- WOODS, D. E.; VASIL, M. L. **Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection**. In: *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*. Baltch AL and Smith RP (eds). Marcel Dekker, New York, p. 21-50, 1994.
- WU, Y. L.; SCOTT, E. M.; PO, A. L. W.; TARIQ, V. N. Ability of azlocillin and tobramycin in combination to delay or prevent resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 389-392, 1999.
- WU, Q.; LIU, Q.; HAN, L.; SUN, J.; NI, Y. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 326–328, 2010.

- YAN, J. J.; HSUEH, P. R.; KO, W. C.; LUH, K. T.; TSAI, S. H.; WU, H. M.; WU, J. J. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2224-2228, 2001.
- YAN, Z. Q.; SHEN, D. X.; CAO, J. R.; CHEN, R.; WEI, X.; LIU, L. P.; XU, X. L. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 269–273, 2010.
- YANG, Q.; WANG, H.; SUN, H.; CHEN, H.; XU, Y.; CHEN, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacteriaceae* with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 573–577, 2010.
- YATES, S. P.; JORGENSEN, R.; ANDERSEN, G. R.; MERRILL, A. R. Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 123-133, 2006.
- 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 pneumonia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
- 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, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumonia* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 5046–5054, 2009.
- YONG, D.; BELL, J. M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. A novel subgroup metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 2007, Disponível em: <<http://www.mindcull.com/data/american-society-for-microbiology/icaac-2007-antimicrobial-agents-and-chemotherapy/a-novel-sub-group-metallo-beta-lactamase-mbl-aim-1-emerges-in-pseudomonas-aeruginosa-psa-from-australia/#>>. acessado em 15 ago. 2010.
- 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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1148–1151, 2005.
- ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L.; FERNANDES, J. F.; MORO, A. L. D.; GONCALVES, A. L. S.; GOLDANI, L.Z. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Critical Care**, v. 10, n. 4, p.100-110, 2006.
- ZHANEL, G. G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D. J.; NOREDDIN, A. M. KARLOWSKY, J. A. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027-1052, 2007.
- ZHANG, R.; ZHOU, H. W.; CAI, J. C.; CHEN, G. X. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 574–576, 2007.
- ZHANG, R.; YANG, L.; CAI, J. C.; ZHOU, H. W.; CHEN, G. X. High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p.332–337, 2008.
- ZHAO, W. H.; CHEN, G.; ITO, R.; HU, Z. Q. Relevance of resistance levels to carbapenems and integron-borne blaIMP-1, blaIMP-7, blaIMP-10 and blaVIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas*

aeruginosa. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1080–1085, 2009.

ZHOU, H.; YANG, Q.; YU, Y. S.; WEI, Z. Q.; LI, L. J. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 45, N. 12, p. 4054–4057, 2007.

ZONG, Z.; LU, X.; VALENZUELA, J. K.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 50–54, 2008.

ZULIANELLO, L.; CANARD, C.; KOHLER, T.; CAILLE, D.; LACROIX, J. S.; MEDA, P. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3134–3147, 2006.

ANEXO 1: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (Instruções aos autores)

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Instructions to Authors

As of 01 June 2005, all new manuscripts must be submitted through the *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* online submission and review Web site (⇒ <http://ees.elsevier.com/dmid/>). Authors are requested to submit the text, tables, and artwork in electronic form (not as a PDF) to this address. In an accompanying letter, authors should state that the manuscript, or parts of it, have not been and will not be submitted elsewhere for publication. Authors are highly encouraged to include a list of three or more potential reviewers for their manuscript, with complete contact information.

Submission items include a cover letter (save as a separate file for upload), suggested reviewers, the manuscript (including title page, abstract, manuscript text, references, and table/figure legends), tables, and figures. Revised manuscripts should also be accompanied by a unique file (separate from the covering letter) with responses to reviewers' comments. The preferred order of files is as follows: cover letter, suggested reviewers, response to reviews (revised manuscripts only), manuscript file(s), table(s), figure(s). Files should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Tables3.doc). Upload text, tables and graphics as separate files. (You can compress multiple figure files into a Zip file and upload that in one step; the system will then unpack the files and prompt you to name each figure.) Do not import figures or tables into the text document and do not upload your text as a PDF. Complete instructions for electronic artwork submission can be found on the Author Gateway, accessible through the journal home page. Your figures will be tested by an artwork quality check tool; you will be asked to view the results before you can complete your submission. Your figures can move into review if not up to production standards, but you should be prepared to provide better quality figures should we express interest in your manuscript.

Authors who are unable to provide an electronic version or have other circumstances that prevent online submission must contact the Editors prior to submission to discuss alternate options. The Publisher and Editors regret that they are not able to consider submissions that do not follow these procedures.

Please note, although the Elsevier Editorial System Registration page asks if you are available for reviews, we are not currently seeking new reviewers as members of the Editorial Board. All other correspondence should be addressed to the Editor in Chief: Ronald N. Jones, M.D., Editorial Office, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Suite A, 345 Beaver Creek Centre, North Liberty, Iowa 52317, USA.

Manuscripts

Papers may be submitted that are full-length articles (including subject review articles), or short notes. Manuscripts are accepted with the understanding that they are original, unpublished work and are not being submitted elsewhere. All manuscripts are subjected to peer review by the editors, by members of the Editorial Board, or by other qualified reviewers.

Papers must be accompanied by a letter signed by the corresponding author indicating that they have read and are familiar with the current "Instructions to Authors" (published in each issue) and will comply with the instructions and stated conditions. The letter should indicate that all of the named authors and acknowledged parties have agreed to the submitted draft of the paper or, as providers of personal communications, have consented to their inclusion, and that the content/submission is original/unpublished and has not been simultaneously submitted to another medical journal. Furthermore, previous or other publication of any or part of the content of the manuscript (including conference or congress proceedings, letters, and brief communications) must be declared on the title page. Failure to comply with the above mentioned policies may result in a 3-year suspension of publishing privileges in this journal.

Manuscripts should be submitted via the [Elsevier Editorial System](#), in English, double-spaced, and, where appropriate, divided into *Introduction*; *Materials and Methods*, which should include sufficient technical information so that experiments can be repeated and which should give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains; *Results*, which should describe the design of the experiments as well as the results using text, tables, or figures; and *Discussion*, which should provide an interpretation of the results in relation to previously published work. An *abstract* is required for all papers; it should be 150 words or less for full-length papers and 50 words or less for notes. Papers for the Notes category, which is intended for the presentation of brief observations (including instructive case reports), that do not warrant full-length papers, should not contain any section heading and should not exceed 1,000 words.

The first page of the manuscript should include: title, running title of not more than 45 characters and spaces, full names of all authors, address of the institution at which the work was performed, and the corresponding author's full address, telephone number, and FAX number. Any change of address by any of the authors should also be noted. Any footnotes to the text should be numbered using Arabic numerals and should be typed on the page of the manuscript on which they are referred to.

Tables

Tables should be on separate files and numbered using Arabic numerals. Each table should have a brief title with detailed information appearing as footnotes bearing superscript, lower-case letters. Vertical rules should be avoided.

References

References should be arranged in alphabetical order. In the text they should be referred to by name and year. If there are more than two authors, use the name of the first author followed by et al. Papers by the same author(s) published in the same year should be distinguished by the use of lowercase letters following the date. References should contain the following, in the order shown: names of all contributing authors (last names first); date of publication; title of article; title of journal (abbreviate according to the style of *Index Medicus*) or book; volume number, location and name of publishing company (books only); and inclusive pages. Example:

Journal. Owen DAA, Lynch JM (1975) The effects of histamine and some histamine-like agonists on blood pressure. *Br J Pharmacol* 55:171-173.

Edited Book. Redei A, Kelemen P (1969) The presence of platelets in acute oedema. In *Inflammation Biochemistry*. Eds, A Bertelli and JC Houck. Amsterdam: Elsevier, pp 161-165.

Figures

All manuscripts must be accompanied by complete artwork. Each figure must be on a separate file. Electron micrographs should be of sufficient contrast to withstand reduction and printing at the journal page size. The cost of printing color photographs must be borne by the author. Any graphs, charts, or diagrams should be finished drawings, using type size large enough to be read easily when reduced to page size.

Proofs and Reprints

The corresponding author will receive page proofs, which should be corrected and returned within 48 hours of receipt. Corrections are limited to printer's errors and no substantial author's changes will be made. Reprints may be ordered at the price listed on the order form accompanying the proofs.

Style and Nomenclature

Authors should use the *CBE* (Council of Biology Editors) *Style Manual*, 5th ed., as a general guide for style. The names of chemical compounds should conform with *Chemical Abstracts* and its indexes or *The Merck Index*, 11th ed. Enzymes and biochemical terms should bear the recommended, trivial name listed in the latest edition of *Enzyme Nomenclature*. Whenever possible, use generic drug names. Binary names consisting of a generic name and a species name must be used for all microorganisms. Names of general and higher categories may be used alone. However, a species name must be preceded by the complete generic name the first time that it is used in the manuscript. Following this, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (for example, *S. aureus*), provided there can be no confusion with other genera of organisms used in the paper. The nomenclature for bacteria should follow well-established

references such as *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (current edition) or the *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., or validation lists and specific articles published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* since January 1, 1989. Informative web sites are available as well (⇒ <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> and ⇒ <http://www.bacterio.cict.fr>).

Nomenclature and classifications of fungi and yeasts are the responsibility of the manuscript authors as guided by published sources such as *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. (2001) and *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. (1998).

Names used for viruses should be those listed in the International Committee on Taxonomy of Viruses publication (*Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee of Taxonomy and Viruses*, 2000). Synonyms may be used in parentheses when the name is first used in conjunction with the approved generic (or group) and family names.

Copyright

Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer will insure the widest possible dissemination of information under the US copyright law. Unless this agreement is executed, the journal will not publish the manuscript.

Updated July 2008

ANEXO 2: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Instruções aos autores)

Instructions to Authors



The *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* is a multidisciplinary journal which publishes original research throughout the fields of tropical medicine (including pathology, field epidemiology and clinical studies) medical and veterinary parasitology (including protozoology, helminthology, entomology and malacology), and medical microbiology (virology, bacteriology and mycology). It particularly welcomes basic and applied research in biochemistry, immunology, molecular and cell biology, physiology, pharmacology and genetics related to these fields. Short communications are also considered. Review articles are invited. The journal publishes eight issues constituting one volume per year. Occasionally papers presented at symposia or congresses are published as supplements.

Submitted papers must be written in Portuguese or English. English of low quality is a major cause of delay in publication and we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist.

Submission of a paper to the *Memórias* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Manuscripts will be peer-reviewed; acceptance will be based on scientific content and presentation of the material.

Submission of manuscripts will only be accepted when submitted electronically using the following link: <http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login>.

ONLINE SUBMISSION STEPS



With this service you can submit manuscripts, you will be able to check the content of your submission, the electronic file will be used for editorial assessment and online refereeing, and the editorial decision on the manuscript will be communicated to you.

By using this service you will guarantee fast and safe submission of your manuscript, and speed the assessment process.

Papers on development of Natural Products must meet the following specific criteria

The manuscript should be prepared according to Author Guidelines

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if accepted for publication, copyright of the article, including the right to reproduce the article in all form and media, shall be assigned exclusively to the Memórias. The journal will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce any contribution.

For other instructions the authors should consult and follow the most recent number of the Memórias or consult the home-page of the Memórias (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>), or contact the Editorial Office by phones (+55-21-2562.1222), Fax (+55-21-2562.1220) or e-mails (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br).

Author Guidelines

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Intitutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human

experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations. See an example of result format at: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/results.pdf>

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus.

Consult:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>

- **In the text use authors' surname and date:**

Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is:

(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned:

Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

- **At the end of the paper use the following styles:**

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Book and Thesis

Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgar Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni Sambom, 1907 pela ação do látex de Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:
<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from:
<http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from:
<http://www.cancer-pain.org/>.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from:
<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

DATABASE ON THE INTERNET

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from:
<http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from:
http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.].

Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

- **Illustrations:** figures and tables must be understandable without reference to the text.

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with *a*, *b*, *c*, etc.) below.

- **Short communications:** should communicate rapidly single results or techniques. The text should be continuous and never arranged in sections or items. Therefore, results must be presented and discussed at a one time. Short Communications should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and up to five key words must be provided. See an example at http://memorias.ioc.fiocruz.br/104_8_1666.pdf.

- **Alternative format:** manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

- an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;
- a **copyright** assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.
- **Page charges:** there will be no page charges.
- **Proofs:** one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.