

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Diana Christina Pereira Santos Gonçalves

**DETECÇÃO DE METALO BETA LACTAMASE EM *Pseudomonas aeruginosa*  
ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Goiânia

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Diana Christina Pereira Santos Gonçalves

**DETECÇÃO DE METALO BETA LACTAMASE EM *Pseudomonas aeruginosa*  
ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical  
e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como  
requisito parcial para obtenção do título de Mestre na  
área de concentração em Microbiologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Goiânia

2009

Ao meu esposo Saulo,  
Aos meus filhos Saulo Filho, André, Mateus,  
Aos meus pais Waldir e Didir,  
Pelo carinho e apoio em todos os momentos

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus “porque tu és a minha rocha e a minha fortaleza; por causa do teu nome, tu me conduzirás e me guiarás” Sl 31:3.

Ao meu amado esposo Saulo, aos meus queridos filhos: Saulo Filho, André e Mateus, pelo amor, pelo carinho e compreensão de minha ausência em vários momentos.

Aos meus pais, Waldir e Didir, por me fazer acreditar e ensinar os caminhos para alcançar a vitória.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pimenta pela oportunidade de conhecê-la, de me orientar neste trabalho e me dando a oportunidade de crescer. Pela sua alegria, capacidade de transmitir de forma fácil, prática tantos ensinamentos. Você é um exemplo de profissionalismo, competência e segurança e isso permanecerá sempre comigo.

Ao meu co-orientador Prof. José Daniel Gonçalves Vieira pela competência e pelas orientações que contribuíram muito para este trabalho.

A Profa. Lara Stefania Netto de Oliveira Leão pela contribuição na orientação e acompanhamento de toda a parte de detecção genotípica deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Médica: Ana Beatriz Mori Lima, Juliana de Oliveira Rosa, Laurine Lacerda, Denise Gonçalves de Oliveira, Juliane A. de Lima, Ana Cláudia Alves de Oliveira, Marina Eidt, Cristyane Benício Gonçalves Rocha Bastos, Josiene Moreira dos Santos, Silvana Santiago, Daniella Vilela Lima, Wesley Rogério Oliveira, Leda Maria Valadão, Luciana Cruz Oliveira por sempre estarem prontos a ajudar.

Aos funcionários da Pós Graduação do IPTSP, José Clementino de Oliveira Neto e Kariny Vieira Soares pela atenção sempre dispensada.

A todos os funcionários e diretores do Laboratório Hemolabor pela contribuição pessoal e profissional na realização deste trabalho.

A minha supervisora Maria Cristina Lisboa Machado pelo apoio, incentivo e colaboração em me fazer acreditar nesse sonho.

Ao meu amigo muito especial e colega de trabalho Hélios de Amorim Neto pelo apoio, por proporcionar momentos alegres e pela contribuição na parte prática deste trabalho.

Aos professores do mestrado por compartilhar conhecimentos, experiências e pela amizade transmitida.

Aos professores Geraldo Sodoyama Leal, Lúcia Kioko Hasimoto e Souza e José Rodrigues Carmo Filho que contribuição pessoal e profissional na banca de qualificação.

A todos que contribuíram para que este trabalho se tornasse real, muito obrigada.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas .....	viii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	x
Resumo .....	xii
Abstract .....	xiii
<b>1. Introdução</b> .....	<b>15</b>
1.1. Agente etiológico .....	16
1.2. Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
1.3. Perfil de suscetibilidade das <i>P. aeruginosa</i> aos antimicrobianos betalactâmicos .....	19
1.4. Mecanismos de resistência aos betalactâmicos .....	21
1.5. Produção de metalo-beta-lactamases .....	26
1.5.1. Metalo-beta-lactamase adquiridas ou transferíveis .....	28
1.5.1.1. MBL tipo IMP .....	29
1.5.1.2. MBL tipo VIM .....	30
1.5.1.3. MBL tipo SPM .....	31
1.5.1.4. MBL tipo GIM .....	31
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>34</b>
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>36</b>
3.1. Procedimentos laboratoriais .....	36
3.1.1. Amostras Bacterianas .....	36
3.2. Isolamento e identificação dos bastonetes Gram negativos .....	36
3.2.1. Teste da Oxidase .....	37
3.2.2. Observação da produção de pigmentos .....	38

3.2.3. Identificação Bioquímica.....	38
3.3. Antibiograma.....	39
3.3.1 Teste de difusão em ágar.....	39
3.4. Detecção fenotípica da resistência aos carbapenêmicos.....	39
3.4.1. Disco aproximação.....	39
3.5. Detecção dos genes <i>blaIMP-1</i> , <i>blaIMP-2</i> , <i>blaVIM-1</i> , <i>blaVIM-2</i> e <i>blaSPM-1</i> pela PCR.....	41
<b>4. Resultados , Discussão e Conclusão.....</b>	<b>46</b>
<b>5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>48</b>
<b>6. Artigo Científico.....</b>	<b>61</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>77</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação esquemática das beta-lactamases bacterianas.....	25
<b>Tabela 2.</b> Metallo-beta-lactamases pertencentes às famílias IMP, VIM e SPM.....	32

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Teste de disco aproximação para avaliar a produção de MBL em amostras de *P.aeruginosa* utilizando discos de ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP) ..... 41
- Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose a 1% os produtos da PCR amplificados do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> ..... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2MPA – ácido 2-mercaptopropiônico

AMPC – Beta-lactamase cromossômicas

API 20E – Sistema de identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras e não fermentadoras

BCARE – Bristol Centre for Antimicrobial

BGNF – Bastonetes Gram negativos não fermentadores

EDTA – etilenodiaminotetracético

ESBL – Beta-lactamase de espectro ampliado

GIM – German Imipenemase

ICS – Infecção de sítio cirúrgico

IMP – Imipenemase

MBL – Metalo-beta-lactamase

MYS – *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*

NNIS – *National Nosocomial Infection Surveillance System*

OXA – Oxacilina

PBP – Proteína ligadora de penicilina

PBP2 – Proteína ligadora de penicilina tipo 2

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SENTRY – *Antimicrobial Surveillance Program*

SHV – Sulfidril variável

SIM – Seoul imipenemase

SPM – São Paulo Metalo-beta-lactamase

TEM – Temonieira

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM – Verona Imipenemase

## RESUMO

*P. aeruginosa* é frequentemente isolada em ambientes hospitalares e sua importância clínica têm aumentado devido à gravidade das infecções. A produção de metalo-beta-lactamase (MBL) é um mecanismo de resistência emergente entre *P. aeruginosa*. O estudo teve como objetivo determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em um hospital de Goiânia, realizar a triagem fenotípica para verificar a produção de MBL e detectar genes que codificam MBL pela técnica de PCR. Foram avaliadas 75 amostras, isoladas de diversos sítios, no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007. A identificação bioquímica foi realizada pelo sistema API 20E e o antibiograma pelo método de Kirby-Bauer. As 75 *P. aeruginosa* apresentaram multirresistência, e com relação ao imipenem 82,7% foram resistentes; ceftazidima 90,7%; aztreonam 30,7%; ciprofloxacina 97,3%; 48,0% de resistência a piperacilina/tazobactam, 88,0% ao cefepime; amicacina, gentamicina e tobramicina, com resistência de 78,7%, 84,0% e 77,4%, respectivamente. A produção de MBL pelo método de disco aproximação foi detectada em 46,7% (35/75). O gene *bla*<sub>SPM-1</sub> foi detectado em 39 (52,0%) e o *bla*<sub>IMP-1</sub> em três (4,0%) amostras através da técnica de PCR. A frequência elevada de *P. aeruginosa* multirresistentes e produtoras de MBL alerta para necessidade de controle da disseminação de resistência no ambiente hospitalar, bem como a adoção de medidas preventivas e esclarecimento das equipes de saúde sobre uso racional dos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, metalo-beta-lactamase, infecção nosocomial, carbapenêmicos, multirresistência.

## ABSTRACT

*P. aeruginosa* is frequently isolated in hospitals and the clinical importance has been increased due to gravity of infections. The metallo-beta-lactamase (MBL) production is an emergent mechanism of resistance in *P. aeruginosa*. The study aimed to determine the antimicrobial susceptibility profile of *P. aeruginosa* isolated of patients admitted in a hospital in Goiânia, to verify the MBL production by diffusion test and detect MBL genes by PCR technique. A total of 75 samples were evaluated, isolated of various clinical samples, in the period of January/2005 to January/2007. The biochemical identification was performed by automation technique system (*API 20E*®) and antimicrobial susceptibility profile by Kirby-Bauer method. The 75 *P. aeruginosa* presented multi-drug resistance and, the resistance profile was: 90.7% to ceftazidime; 30.7% to aztreonam, 97.3% to ciprofloxacin; 48.0% of resistance to piperacilin/tazobactam, 88.0% to cefepime; ampicillin, gentamicin and tobramycin with resistance profile of 78.7%, 84.0% and 77.4%, respectively. The MBL production by diffusion disc method was 46.7% (35/75). The gene *bla*<sub>SPM-1</sub> was detected in 39 (52.0%) and gene *bla*<sub>IMP-1</sub> in three (4.0%) isolates. The high frequency of *P. aeruginosa* resistant and MBL production alert to necessity of control the dissemination of bacteria multi-drug resistant in hospital, as well as the adoption of preventive actions and explanation of the health workers about rational use of antibiotics.

**Key-Words:** *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-beta-lactamase, nosocomial infection, carbapenems, multiresistant.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## **1. Introdução**

Os bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGNNF) constituem um grupo complexo de microrganismos aeróbios, não esporulados e que não utilizam carboidratos como fonte de energia ou os degradam por meio de outras vias metabólicas que não o metabolismo fermentativo. Apesar do grupo ser constituído por vários gêneros e espécies, somente alguns são isolados frequentemente. Sua classificação taxonômica sofreu várias alterações nos últimos anos, sendo que alguns membros permanecem com localização incerta (Murray et al. 2003; Koneman et al. 2006).

Os principais gêneros de BGNNF foram classificados em cinco famílias: Pseudomonadaceae, Alcaligenaceae, Flavobacteriaceae, Methylococcaceae, Rhizobiaceae. A família Pseudomonadaceae inclui o gênero *Pseudomonas* e outros gêneros estreitamente relacionados, os quais se caracterizam como bastonetes Gram negativos retos ou ligeiramente curvos, que utilizam carboidratos por via oxidativa e que, em geral, são citocromo oxidase-positivos (Murray et al. 2003; Koneman et al. 2006).

O gênero *Pseudomonas*, por sua vez, é constituído por dez espécies, isoladas a partir de espécimes clínicos e do ambiente, sendo *Pseudomonas aeruginosa* a espécie mais frequentemente isolada. Os membros deste gênero apresentam ampla distribuição ambiental, sendo encontrados no solo, na vegetação, na água, na matéria orgânica em decomposição e, também, no ambiente hospitalar, onde podem ser isolados a partir de vários reservatórios como alimentos, equipamentos hospitalares, reservatórios de água, entre outros. Essa distribuição no ambiente se deve ao fato desses microrganismos possuírem pequena exigência nutricional e muitos fatores de virulência que os tornam mais resistentes às condições ambientais e, também, à ação dos antimicrobianos mais comumente utilizados (Murray et al. 2003; Koneman et al. 2006).



A importância clínica dos BGNNF tem aumentado significativamente em razão da gravidade das infecções, das elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes hospitalizados (Bradley et al. 1999). Além disso, esse grupo de microrganismos apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos, representando um grande desafio na terapêutica. Nos Estados Unidos, observaram uma elevada prevalência de BGNNF resistentes, incluindo *Pseudomonas* spp (particularmente *P.aeruginosa*), *Acinetobacter* spp, *Stenotrophomonas maltophilia* e o complexo *Burkholderia cepacia*. Dentre os BGNNF *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *Acinetobacter* spp são as maiores causas de infecções em pacientes hospitalizados em UTI e queimados (Quinn 1998; Vidal et al. 2003; Saiman 2004).

### 1.1. Agente etiológico

*P. aeruginosa* se caracteriza como um microrganismo aeróbio, móvel, ubíquo na natureza, encontrado em ambientes úmidos, como água, solo, plantas e detritos. Raramente causa infecções em indivíduos saudáveis, mas são importantes patógenos oportunistas para pacientes hospitalizados, principalmente aqueles debilitados, neutropênicos, transplantados e queimados. Apresenta necessidade nutricional mínima, tolera uma ampla variedade de temperaturas (4°C a 42°C), são oxidase-positivas, sensíveis à polimixina B e suas colônias são identificadas presuntivamente pela produção de pigmento azul-esverdeado hidrossolúvel, piocianina e pioverdina, e pelo odor característico de frutas (Murray et al. 2003; Koneman et al. 2006).

*P. aeruginosa* possui vários fatores de virulência considerados como responsáveis pelo aumento de colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro, como a produção de enzimas e toxinas. Com frequência, é isolado um morfotipo mucóide a partir de secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística e infecção crônica. Esse morfotipo ocorre pela

produção de um mucopolissacarídeo que envolve a célula, denominado de alginato, o qual permite a bactéria aderir ao hospedeiro, formar biofilme e se proteger da ação de antimicrobianos e do sistema imunológico (Murray et al. 2003; Koneman et al. 2006).

É uma bactéria pouco frequente como constituinte da microbiota de indivíduos saudáveis. Entretanto, os pacientes internados, principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), são colonizados devido à frequente exposição a instrumentos e aparelhos auxiliares, mãos dos profissionais de saúde e uso de antimicrobianos de amplo espectro. O trato gastrointestinal é o principal sítio de colonização e reservatório de *P.aeruginosa* podendo ser encontrada também em outros locais úmidos do corpo como orofaringe, axilas, mucosa nasal e períneo. Este microrganismo é constantemente re-introduzido no ambiente hospitalar por meio de alimentos, especialmente frutas e vegetais. A colonização de indivíduos imunodeprimidos pode resultar em infecções graves, inclusive bacteremia (Kiska & Gillian 2003).

*P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, incluindo betalactâmicos, algumas quinolonas, cloranfenicol, tetraciclinas, macrolídeos, trimetropim-sulfametoxazol e rifampicina (Rossolini, 2005). Existe um número limitado de agentes antimicrobianos com atividade contra essa bactéria, incluindo penicilinas e cefalosporinas antipseudomonas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas, particularmente ciprofloxacina e polimixina B (Carmeli et al. 1999; Gales et al. 2001).

A resistência da *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos tem sido relatada por diversos autores (Afzal-Shah et al. 2001; Gales et al. 2003; Poirel et al. 2005; Aboufaycal et al. 2007; Pitout et al. 2007). Um dos mecanismos de resistência está associado à produção de metalo-beta-lactamase (MBL), resultando em falha na terapia com esses antibióticos (Rossolini, 2005). Os carbapenêmicos são geralmente reservados para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas resistentes a outros agentes betalactâmicos e no

tratamento de infecções nosocomiais principalmente infecções do trato respiratório e urinário (Santos Filho 2003). Apresentam elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2), estabilidade a diversas beta-lactamases, incluindo as de espectro ampliado (ESBL) e as cromossômicas (AmpC), e excelente permeabilidade através da porção externa da parede celular bacteriana (Woodford et al. 2000).

Segundo Martins et al. (2007) a produção de MBL é um mecanismo de resistência emergente entre *P. aeruginosa*, o qual é prevalente na América do Sul. Avaliaram 92 *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, isoladas em dois hospitais do Sul do Brasil e detectaram pelos testes fenotípicos 33 (35,9%) isolados produtores de MBL.

A emergência de bactérias produtoras de metalo-beta-lactamase requer mudanças na rotina dos laboratórios de microbiologia, adequando métodos capazes de detectar a sua produção. Entretanto, representa um desafio, pois não existe um consenso sobre a padronização de metodologias para a detecção da produção dessas enzimas (Picão et al. 2008).

## **1.2. Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa***

As infecções são, em geral, observadas em sítios onde existe tendência a presença de umidade como infecções urinárias associadas ao uso de cateteres, pneumonias hospitalares, especialmente em UTI (Pollack 1995; Tsakris et al. 2000; Dubois et al. 2001). O espectro de infecções causadas por este agente compreende desde infecções de pele a septicemias fulminante, infecção aguda pela produção de toxinas bem como infecções crônicas pela formação de biofilme, como a fibrose cística (Kiska & Gillian 2003).

As infecções adquiridas na comunidade por pacientes imunocompetentes, muitas vezes associadas ao contato com água contaminada, tendem a ser localizadas, como nos casos

de foliculite e otite externa dos nadadores. Após um pequeno trauma na córnea, infecções oculares por *P.aeruginosa*, decorrentes do uso de lentes de contato contaminadas com solução utilizada para sua estocagem podem evoluir para úlcera e até perda da visão (Kiska & Gillian 2003).

Segundo dados reportados pelo *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS), coletados entre 1992 e 1999, em hospitais americanos, *P.aeruginosa* foi a bactéria mais prevalente nos casos de pneumonias hospitalares em pacientes internados em UTI. De acordo com esse estudo, *P. aeruginosa* foi à quarta causa mais comum de infecções urinárias e o sexto patógeno mais frequentemente isolado em corrente sanguínea em pacientes internados em UTI (NNIS, 1999). De acordo com dados do programa de vigilância SENTRY, coletados em centros médicos localizados na América Latina, *P. aeruginosa* foi à quinta causa de infecção de corrente sanguínea, o patógeno mais frequente como causas de infecções no trato respiratório inferior e o terceiro agente etiológico das infecções do trato urinário (Sader et al. 2004).

Segundo dados do projeto SENTRY, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* são responsáveis por 3,6% e 6,2% dos episódios de infecções da corrente sanguínea, na Europa e na América Latina, respectivamente, (Sader et al. 1998; Diekema et al. 1999). Daxboeck et al. (2004) consideraram as infecções causadas por bastonetes Gram negativos não fermentadores como um problema emergente entre pacientes críticos.

### **1.3. Perfil de suscetibilidade de *P.aeruginosa* aos antimicrobianos betalactâmicos**

A emergência de resistência a antibióticos entre bastonetes Gram negativos é um notável exemplo de como esses microrganismos realizam processos de recombinação, adquirem e expressam novas informações genéticas (Poole 2003).

Em algumas instituições a taxa de resistência destas bactérias ao imipenem alcança 81,1% e este fato vem acompanhado de resistência cruzada a outros antimicrobianos (Marra et al. 2006).

Dados coletados pelo NNIS, entre 1992 a 2004, mostraram a emergência da resistência bacteriana aos antimicrobianos em hospitais americanos. Em isolados de pacientes com infecções nosocomiais internados em UTI, a prevalência de *P. aeruginosa* resistente a cefalosporina de terceira geração e imipenem foi de 31,9 e 21,1%, respectivamente. Entre janeiro e dezembro de 2003, verificaram um aumento da resistência de 20 e 15% em relação à cefalosporina de terceira geração e imipenem, quando comparado com o período de 1998 a 2002 (NNIS 2004).

A maior utilização de carbapenêmicos no ambiente hospitalar promove uma pressão seletiva sobre a microbiota, o que favorece a seleção de subpopulações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos. *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp resistentes a grande maioria dos agentes antimicrobianos e sensíveis somente à polimixina B têm sido isoladas em inúmeros hospitais brasileiros (Gales et al. 2003).

Bastonetes Gram negativos resistentes aos carbapenêmicos, incluindo enterobactérias e *P. aeruginosa* têm apresentado capacidade de produzir MBL, que são enzimas com atividade sobre vários betalactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenêmicos, e ainda sobre os inibidores de betalactâmicos, como ácido clavulânico e sulbactam (Bush et al. 1995b, Arakawa et al. 2000).

*P. aeruginosa* produtora de MBL tem sido reportada como importante causa de infecções hospitalares (Hirakata et al. 2003; NCCLS 2003; Crespo et al. 2004). Apesar da prevalência destes microrganismos em hospitais ainda ser pouco investigada, eles estão associados aos casos de disseminação clonal e surtos hospitalares (Senda et al. 1996; Hirakata

et al. 2003; Crespo et al. 2004). Marra et al. (2006) investigaram a produção da MBL em 76 *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea. Nesta investigação, 23/76 (30,3%) isolados apresentaram fenótipo MBL e a taxa de mortalidade entre os pacientes infectados por *P. aeruginosa* produtora de MBL foi de 85,7%.

#### **1.4. Mecanismos de resistência aos betalactâmicos**

Dentre os vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, a produção de beta-lactamases é o mecanismo mais prevalente e importante, além disso, alterações de permeabilidade de membrana externa e nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBP) também são descritas em *P. aeruginosa*.

Nesses microrganismos, as beta-lactamases encontram-se estrategicamente situadas no espaço periplásmico, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os antimicrobianos betalactâmicos que estão atravessando o espaço periplásmico para alcançar as PBP (Livermore 1995).

As beta-lactamases apresentam a mesma origem evolucionária das proteínas ligadoras de penicilinas. Sequências similares de aminoácidos têm sido demonstradas entre PBP de alto e baixo peso molecular e as beta-lactamases (Spratt & Cromie 1988). Algumas beta-lactamases utilizam íons zinco como cofatores enzimáticos, entretanto a maioria opera via produção de ésteres de serina (Livermore 1995).

A produção de beta-lactamases cromossômicas, que podem ser induzíveis, é responsável pela resistência intrínseca de microrganismos como *P. aeruginosa* aos betalactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas (Livermore 2002; Poirel et al. 2005). Entretanto, a resistência às cefalosporinas de espectro ampliado pode ser decorrente da hiperexpressão das beta-lactamases cromossômicas associadas à diminuição da

permeabilidade da membrana externa, mediada pela perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, conhecidas como porinas, ou, ainda, hiperexpressão de bombas de efluxo, que reduzem a concentração do antimicrobiano no interior das células (Livermore 2001; Livermore 2002; Poirel et al. 2005).

As beta-lactamases mediadas por plasmídeos, conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, tais como cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e monobactâmicos. Porém, essas enzimas não reconhecem as cefamicinas e os carbapenens como substratos, e bactérias produtoras dessas beta-lactamases permanecem sensíveis *in vitro* à ação desses antimicrobianos. Outra característica fenotípica importante dessas enzimas, é que elas são sensíveis à ação dos inibidores de beta-lactamases, como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam (Phillipon et al. 1989; Jacoby & Medeiros 1991).

As beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) clássicas são enzimas codificadas por plasmídeos, como as famílias: Temoniera (TEM), sulfidril variável (SHV) e oxacilina (OXA). Nos últimos anos houve uma emergência de novas ESBL (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES), resultando em mais de 370 variantes naturais (Sirot et al. 1987; Sturenburg et al. 2005).

Para a classificação das ESBL foram propostos dois esquemas (Tabela 1), a classificação de Ambler, que é baseada na similaridade entre as sequências de aminoácidos (Ambler et al. 1991) e o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros (Bush et al. 1995a; Bush 2001).

Segundo o esquema de Ambler, as ESBL podem ser divididas em quatro classes evolucionárias distintas (A, B, C e D). As beta-lactamases SHV e TEM, pertencentes à classe A, que possuem uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo. Além disso, são penicilinases e cefalosporinases encontradas em plasmídeos ou transposons. As enzimas do tipo OXA são ESBL pertencentes à classe D (oxacilinas).

O esquema de Bush classifica as ESBL segundo o perfil do substrato, características físicas como, peso molecular e ponto isoelétrico (Bush et al. 1995a; Bush 2001). No esquema funcional de Bush, as ESBL foram divididas em dois subgrupos: 2be (principalmente TEM e SHV) e 2d (OXA), que em geral os dois subgrupos são inibidos pelo clavulanato (Bush et al. 1995). Em 1995, Bush-Jacoby-Medeiros apresentaram um novo esquema de classificação funcional (fenotípica), no qual, dividiram as enzimas em quatro grandes grupos (1 - 4) e subgrupos (a – f) (Tabela 1) (Bush et al. 1995a; Bush 2001).

O grupo 1, denominadas de cefalosporinases, não sofrem inibição pelo ácido clavulânico, e pertencentes a classe molecular C. O grupo 2 são penicilinas, cefalosporinas, ou ambas, que sofrem inibição pelo ácido clavulânico, e também pertencentes às classes moleculares A e D. Nesta classe estão as primeiras beta-lactamases isoladas (TEM-1 e SHV-1). Porém, por causa da detecção de ESBL mutantes, foram criadas duas subclasses: 2a e 2b. A subclasse 2a contém apenas penicilinas, enquanto a 2b contém ESBL de amplo espectro, e com a capacidade de inativação tanto de penicilinas quanto de cefalosporinas na mesma proporção (Shah et al. 2004).

Com o passar dos anos, surgiu a necessidade da criação de novos subgrupos, segregados do subgrupo 2b. Trata-se dos subgrupos 2be e 2br. No subgrupo 2be, a letra “e” significa amplo espectro de atividade e representam beta-lactamases capazes de inativar as cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima). Assim, com os monobactams (aztreonam). No subgrupo 2br, a letra “r” denota a reduzida ligação aos inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico e sulbactam); são também conhecidas como ESBL resistentes aos inibidores de beta-lactamases (derivadas da TEM). Algumas ainda mantêm-se suscetíveis ao tazobactam (Shah et al. 2004).

Existe, ainda, o subgrupo 2c, o qual foi separado do subgrupo 2b, devido a estas enzimas inativarem a carbenicilina, com maior afinidade do que a benzilpenicilina, e com



pequeno efeito sobre a cloxacilina. O subgrupo 2d inativa a cloxacilina com mais afinidade do que a benzilpenicilina, e com pequeno efeito sobre a carbenicilina, além de serem fracamente inibidas pelos inibidores de beta-lactamases. O subgrupo 2e são cefalosporinas que podem também hidrolisar os monobactams e são inibidas pelo ácido clavulânico. Além disso, o subgrupo 2f foi adicionado, devido a tratar-se de enzimas classificadas como serina-beta-lactamases, em contraste as zinco-beta-lactamases, incluídas no grupo 3.

O grupo 3 são enzimas que possuem no seu sítio ativo a necessidade de zinco (Zn) para exercerem seu efeito, por isso chamadas de zinco-beta-lactamases ou simplesmente metalo-beta-lactamases, e correspondem à classe molecular B. Finalmente existe o grupo 4, onde localizam-se as penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico, e ainda não possuem grupo molecular definido (Shah et al. 2004).

A classificação molecular das beta-lactamases é baseada na sequência de nucleotídeos e aminoácidos destas enzimas. Sendo assim, 4 classes são conhecidas (A a D), e são correlacionadas com suas classificações funcionais. Às classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas serinas, enquanto a classe B ou MBL necessitam de zinco para sua ação. A maioria das ESBL estão contidas na classe molecular “A” de Ambler (Ambler, 1980), caracterizadas pela presença do sítio ativo serina e massa molecular de aproximadamente 29.000 KDa, e preferência (afinidade) de hidrólise sobre as penicilinas (Hall & Barlow 2005).

Mecanismos que conferem resistência aos betalactâmicos de espectro ampliado e carbapenêmicos têm sido descritos como a produção das beta-lactamases pertencentes à classe D de Ambler (Bou et al. 2000; Donald et al. 2000; Afzal-Shah et al. 2001; Poirel et al. 2002; Heritier 2003) e as que pertencem à classe B de Ambler, ou também conhecidas como MBL (Toleman et al. 2002).

**Tabela 1.** Classificação esquemática das beta-lactamases bacterianas

Bush, Jacoby, Medeiros	Bush	Rychmond & Sykes	Mitsuashi & Inoue	Classe Molecular	Substratos enzimáticos preferenciais	Inibição pelos inibidores de $\beta$ -lactamases		Enzimas representativas
						Ác. Clav.	EDTA	
<b>1</b>	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC (Bactérias Gram negativas)
<b>2a</b>	2 <sup>a</sup>	N.I.	PCase V	A	Penicilinas	+	-	PCases Gram positivas
<b>2b</b>	2b	III	PCase I	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
<b>2be</b>	2b'	N.I.	CXase	A	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactams	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
<b>2br</b>	N.I.	N.I.	N.I.	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
<b>2c</b>	2c	II, V	PCase IV	A	Penicilinas (carbenicilina)	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
<b>2d</b>	2d	V	PCase II, III	D	Penicilinas (cloxacilina)	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
<b>2e</b>	2e	Ic	CXase	A	Cefalosporinas	+	-	CSase induzíveis do <i>Proteus vulgaris</i>
<b>2f</b>	N.I.	N.I.	N.I.	A	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenens	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> (NMC-A), <i>Serratia marcescens</i> (Sme-1)
<b>3</b>	3	N.I.	N.I.	B	A maioria dos $\beta$ -lactâmicos + carbapenens	-	+	<i>Stenotrophomonas Maltophilia</i> (L1), <i>Bacteriodes fragilis</i> (Ccra)
<b>4</b>	4	N.I.	N.I.	N.D.	Penicilinas	-	ND	PCase - <i>Burkholderia cepacia</i>

Legenda: Csase- cefalosporinase; Pcase- penicilinase; Cxase- cefalosporinase que hidrolisa a cefuroxima; N.I. não incluída; N.D. não determinada; Ác. Clav.- ácido clavulânico.

(Adaptado do artigo de BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995a).

### 1.5. Produção de metalo-beta-lactamases

Nos últimos anos tem sido observada uma maior incidência de *P. aeruginosa* resistentes a cefalosporinas de espectro ampliado no ambiente hospitalar, ocasionando, assim, maior uso de betalactâmicos mais potentes, como os carbapenens (Quinteira et al. 2005). Esses agentes são importantes opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções nosocomiais. Isso se deve a sua afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2), estabilidade a muitas beta-lactamases, incluindo as de espectro ampliado (ESBL) e as cromossomiais (AmpC), e excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (Woodford et al. 2000).

A maior utilização de carbapenens no ambiente hospitalar acaba por ocasionar maior pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, o que favorece a seleção de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos. *P. aeruginosa* resistentes a maioria dos agentes antimicrobianos e sensíveis somente à polimixina B têm sido isoladas pelos laboratórios de microbiologia na maior parte dos hospitais brasileiros (Gales et al. 2003).

Mecanismos que conferem resistência aos betalactâmicos de espectro ampliado e carbapenens têm sido descritos (Poirel & Nordemann, 2002), como a produção das beta-lactamases pertencentes à classe D de Ambler (Bou et al. 2000; Donald et al. 2000; Afzal-Shah et al. 2001; Heritier et al. 2003) e as que pertencem à classe B de Ambler, também denominadas MBL. Adicionalmente, a produção dessas enzimas tem sido comumente responsável pelo fenótipo de resistência a esses betalactâmicos (Tolemam et al. 2002).

As MBL são beta-lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros e hidrolisam todos os betalactâmicos comercialmente disponíveis, com exceção dos monobactâmicos, ou seja, o aztreonam (Bush 1998). Essas enzimas

caracterizam-se por necessitarem de dois íons valentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica, e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions valentes (Murphy et al. 2003). Sendo assim, essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (i.e., ácido 2-mercaptopropiônico), não sendo impedidas por inibidores de serino-beta-lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Bush et al. 1995a).

As MBL são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos, como *S. maltophilia* (Crowder et al. 1998; Avison et al. 2001; Spencer et al. 2001), *Bacillus cereus* (Thompson & Malamy 1990), *Chryseobacterium meningosepticum* (Rossolini et al. 1998), *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* (Simm et al. 2001) e *Aeromonas* spp (Massida et al. 1991; Walsh et al. 1996; Walsh et al. 1998).

Desde o início da década de 90, os genes que codificam MBL têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (Poirel et al. 2000; Riccio et al. 2000; Yan et al. 2001a). Esses genes, os quais codificam as MBL estão inseridas em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene, enzimas conhecidas como MBL móveis ou MBL adquiridas. Atualmente são conhecidas cinco subclasses de MBL adquiridas: IMP (imipenemase) (Osano et al. 1994), VIM (Verona imipenemase) (Lauretti et al., 1999), SPM (São Paulo Metallo-beta-lactamase) (Toleman et al. 2002), GIM (German imipenemase) (Castanheira et al. 2004) e, mais recentemente, SIM-1 (Seoul imipenemase), codificada pelo gene *bla*<sub>SIM-1</sub> detectado em sete amostras de *A. baumannii* isolados de um hospital terciário em Seul, Coreia (Lee et al. 2005). A origem das metalo-beta-lactamases pertencentes às famílias IMP, VIM e SPM está apresentada na tabela 2.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *P. aeruginosa* produtoras de MBL adquirida ocorreu em 2002 (Pellegrino et al. 2002). Entretanto, esse relato não caracterizou o determinante de resistência envolvido. Mais tarde, em 2003, uma variante de IMP foi relatada por Gales et al. (2003).

Em estudo realizado em amostras bacterianas isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo durante os anos de 2002 e 2003, foi detectado o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> em sete *Acinetobacter spp.* e em uma *P. aeruginosa* (Castanheira et al. 2003). Posteriormente, uma *Klebsiella pneumoniae*, isolada no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), foi caracterizada como produtora de IMP-1 (Lincopan et al. 2005). Este foi o primeiro relato de MBL adquirida em membros da família *Enterobacteriaceae* na América Latina.

A SPM-1 foi detectada numa *P. aeruginosa* isolada em 2001. Amostras produtoras dessa enzima têm sido isoladas em diversos centros no Brasil, como São Paulo (Toleman et al. 2002), Rio de Janeiro (Pellegrino et al. 2002), João Pessoa (Santos Filho et al. 2002), Goiânia (Oliveira et al. 2008), Brasília, Salvador, Santo André, Londrina, Curitiba, Maringá e outros (Gales et al. 2003; Castanheira et al. 2008).

### **1.5.1. Metallo-beta-lactamases adquiridas ou transferíveis**

As MBL adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídio bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídio (Toleman et al., 2002, Poirel et al., 2004), as demais MBL adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1 (Toleman et al. 2003; Mendes et al. 2004; Patzer et al. 2004).

Embora a grande maioria dos integrons encontrados em isolados clínicos pertença à classe 1, já foram descritas outras classes distintas de integrons (i.e., classes 2, 3 e 4).

Membros dessas classes possuem suas respectivas integrases (intI1, intI2, intI3 e intI4), as quais compartilham similaridade entre 35% e 94% (Collins et al. 2002). A classe 1 tem sido extensivamente estudada, e membros dela foram originalmente descritos como integrons. A classe 2 constitui-se de uma estrutura genética encontrada em transposon Tn7 e elementos relacionados, porém essa classe é composta por uma integrase defeituosa e incapaz de promover a mobilização de cassetes gênicos. A classe 3 é composta de um único exemplo até hoje descrito (Bennett 1999).

#### **1.5.1.1. MBL tipo IMP**

O primeiro relato de MBL adquirida ocorreu em 1994 quando foi descrita uma nova subclasse denominada IMP-1. Foi detectada no Japão, em um isolado clínico de *Serratia marcescens* produtora de MBL com fenótipo de resistência ao imipenem e beta-lactamases de espectro ampliado (Osano et al., 1994). Por muitos anos a ocorrência de isolados produtores de IMP-1 foi restrita ao Japão, mas, a IMP-1 tem sido detectada em diferentes microrganismos, como *Acinetobacter* spp, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* isolados de diferentes regiões geográficas (Chu et al. 2001; Da Silva et al. 2002; Iyobe et al. 2002).

Em estudo realizado em amostras bacterianas, isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo, durante os anos de 2002 e 2003, foi detectado o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> em sete amostras de *Acinetobacter* spp. e uma de *P. aeruginosa* (Castanheira et al. 2003). Posteriormente, uma amostra de *P. aeruginosa* apresentando fenótipo de resistência a todos os beta-lactâmicos, inclusive imipenem e meropenem, foi isolada de um paciente internado no Hospital de Base de Brasília, em 2002. Mais tarde, estudos revelaram tratar-se da presença de uma nova variante de IMP, designada IMP-16 (Mendes et al. 2004).

### 1.5.1.2. MBL tipo VIM

As variantes de VIM foram encontradas tanto em microrganismos fermentadores de glicose quanto naqueles não-fermentadores. Essas enzimas são mais prevalentes na Europa, região onde foi originariamente encontrada em 1999 (Lauretti et al., 1999). Em seguida, houve diversos relatos dessas enzimas em microrganismos isolados em países da Comunidade Européia (Poirel et al. 2000, Poirel et al. 2001; Prats et al. 2002; Patzer et al. 2004). Variantes de VIM também foram relatadas na Ásia (Yan et al. 2001a), nos EUA (Toleman et al. 2004), no Chile e na Venezuela (Mendes et al. 2004).

A família VIM tem sido reportada em países como Ásia e Europa, embora com relativo distanciamento de MBL, o tipo VIM-7 tem emergido nos Estados Unidos (Toleman et al., 2004). Rodrigo et al. (2004) descrevem *P. aeruginosa* produtoras de *bla*<sub>VIM-2</sub> isolados e caracterizados geneticamente na América Latina, oriundos da Venezuela e Chile.

Em trabalho realizado por Pitout et al. (2007), na Universidade do Canadá, investigou-se a caracterização molecular pela técnica de PCR em isolados nosocomiais de *P.aeruginosa*, resistentes a carbapenêmicos, do Hospital Regional de Calgary, no período de 2003 (UTI) e 2004 (na área de transplantados de medula). O estudo revelou que a maioria (96%) das *P.aeruginosa* naquela área geográfica, apresentou a presença de MBL tipo VIM-2.

Dados reportados para o programa de vigilância, MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), mostraram duas amostras de *P.aeruginosa* resistentes a betalactâmicos, fluorquinolonas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos e suscetível apenas a polimixina B. Após análise por PCR, observou-se a presença de *bla*<sub>VIM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-7</sub>. Estes achados foram isolados de um Centro Médico de Tratamento Terciário, nos Estados Unidos, Texas e publicados em trabalho por Aboufaycal et al. (2007).

#### 1.5.1.3. MBL tipo SPM

A SPM-1, terceira subclasse de MBL adquirida, foi identificada em amostra de *P. aeruginosa* 48-1997 recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo. Essa amostra bacteriana foi enviada ao programa SENTRY, que, em parceria com o laboratório Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation (BCARE), da Universidade de Bristol, Inglaterra, caracterizou-se esse novo determinante de resistência (Toleman et al. 2002). O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não detectado em demais microrganismos nosocomiais (Gales et al. 2003; Poirel et al. 2004).

Em estudo publicado no Brasil, Gaspareto et al. (2007) demonstraram a ocorrência dos genes de MBL *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>IMP-1</sub> em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e/ou ceftazidima obtidos em três hospitais universitários de Porto Alegre. Em 2004, Poirel et al. analisaram isolados de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos de diferentes Hospitais de Recife, no Brasil, isolados entre 2002 a 2003. Destes, nove isolados de *P.aeruginosa* do Laboratório Marcelo Magalhães, 10 isolados da UTI do Hospital Português e nove isolados de pacientes hospitalizados em unidades de outros Hospitais de Recife. Todos os isolados apresentaram resistência aos betalactâmicos, com exceção do aztreonam e 11 apresentaram gene *bla*<sub>SPM-1</sub>.

#### 1.5.1.4. MBL tipo GIM

Castanheira e colaboradores avaliaram cinco cepas de *P. aeruginosa* provenientes de Dusseldorf, Alemanha, e encontraram uma nova subclasse de MBL adquirida, denominada GIM-1 (German imipenemase) (Castanheira et al. 2004).



**Tabela 2** - Metallo-beta-lactamases pertencentes às famílias IMP, VIM e SPM.

<b>Enzima</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i>	Japão
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japão
	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Japão
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japão, Taiwan
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwan
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japão, Singapura
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Itália
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japão
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong
	<i>Citrobacter youngae</i>	China
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japão
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Canadá
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan
IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	China
IMP-10	<i>P. aeruginosa</i>	Japão
	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	Japão
IMP-11 <sup>a</sup>	NR	NR
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Itália
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Itália
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Itália
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	França, Grécia, Itália, Coréia
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Coreia
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Coreia
	<i>Serratia marcescens</i>	Coreia
	<i>Pseudomonas putida</i>	Coreia
	<i>Acinetobacter genomesp. 3</i>	Itália
	<i>Pseudomonas putida</i>	Taiwan
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwan
VIM-3	<i>P. aeruginosa</i>	Taiwan
VIM-4	<i>P. aeruginosa</i>	<b>Grécia</b>
SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil

Adaptado do artigo de Nordmann &amp; Poirel, 2002

NR= não reportado

a. A descrição desta enzima encontra-se no site <http://www.lahey.org>

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. Objetivos**

- Determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em um hospital de Goiânia, Goiás;
- Realizar a triagem fenotípica para a produção de metalo-beta-lactamase de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e à ceftazidima;
- Detectar os genes das metalo-beta-lactamases nos isolados resistentes ao imipenem e à ceftazidima pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Procedimentos Laboratoriais**

##### **3.1.1. Amostras Bacterianas**

Foram estudadas 75 amostras de *P.aeruginosa* previamente isoladas de pacientes internados em um hospital da rede privada em Goiânia. O hospital possui um total de 64 leitos, sendo uma UTI (11 leitos), Enfermaria (12 leitos), Apartamentos (35 leitos), Ambulatório (04 leitos) e Hemodinâmica (04 leitos). O protocolo de investigação (Nº 236/07) foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital Geral de Goiânia (CEPHA) atendendo à resolução 196/96.

As amostras de *P.aeruginosa* foram isoladas a partir de espécimes clínicos diversos, encaminhados e processados no Setor de Microbiologia de um Laboratório de Análises Clínicas, em Goiânia, no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007. Foram selecionados todos os isolados que apresentaram um perfil de multirresistência. As amostras de *P.aeruginosa*, foram mantidas congeladas a -20°, sob a forma de suspensões densas em caldo tioglicolato, acrescido de 15% de glicerol.

#### **3.2. Isolamento e identificação dos bastonetes Gram negativos**

O isolamento, a identificação bioquímica e o perfil de suscetibilidade das 75 amostras de pseudomonas foram realizados no Setor de Microbiologia de um Laboratório de Análises Clínicas.

Os meios de cultura utilizados foram escolhidos de acordo com os espécimes clínicos a serem analisados conforme descrito por Koneman et al. (2006). Desta forma, amostras de urina foram semeadas em ágar Cled (Biobrás) e ágar MacConkey (Difco) secreções diversas foram semeadas em ágar base (Biobrás) com 5% de sangue; ágar sangue achocolatado e caldo tioglicolato (Difco). Amostras provenientes de hemoculturas foram inoculadas em meio Hemobac trifásico (Probac).

*P. aeruginosa* avaliadas neste estudo foram identificadas pelo aspecto morfológico das colônias, odor adocicado, produção de pigmentos, características morfo-tintoriais (coloração pelo método de Gram) e teste da oxidase foram realizados conforme as recomendações de Koneman et al. (2006). Para identificação bioquímica foi utilizado o sistema API 20E (bioMérieux). Em todos os testes foram utilizadas amostras para controle positivo e negativo.

### **3.2.1. Teste da Oxidase**

A determinação da produção da enzima citocromo-oxidase foi realizada a partir da remoção de uma colônia bacteriana utilizando alça bacteriológica de platina, o qual foi depositado sobre tiras de papel de filtro impregnadas em solução contendo 125 mg de N-N-dimetil-para-fenileno-diamina e 125 mg de alfa-naftol, dissolvidos em 25ml de álcool etílico e 25 ml de água deionizada (Newprow). O teste positivo foi indicado pelo desenvolvimento de coloração púrpura intensa em até 10 segundos. Como controle negativo foi utilizado a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 e como controle positivo a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### 3.2.2. Observação da produção de pigmentos

Foi observada a produção de pigmentos após a semeadura da amostra em meio de ágar Müeller Hinton e incubação a 35°C - 37°C durante 18- 24 horas sob atmosfera convencional.

### 3.2.3. Identificação Bioquímica

Todos os 75 isolados foram identificados bioquimicamente pelo sistema API 20E (*Enterobacteriaceas* e Gram negativos não fastidiosos). O sistema API 20 E que contém 20 substratos desidratados foi utilizado para estudar o perfil bioquímico e identificar os isolados de *P. aeruginosa*. Os microtubos foram inoculados com uma suspensão bacteriana que reconstitui os testes. As reações produzidas durante o período de incubação, traduzem-se por viragens espontâneas ou reveladas através de adição de reagentes.

A leitura da galeria API 20 E foi efetuada consultando-se o quadro de leitura contido no manual do fabricante. A identificação do microrganismo foi realizada a partir da determinação de um perfil numérico. Na ficha de resultados, os testes são separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 é indicado para cada um. A galeria API 20 E engloba 20 testes, adicionando no interior de cada grupo os valores que correspondem às reações positivas, obtêm-se sete Algarismos; a reação de oxidase que constitui o 21º teste é assinalada com o valor 4 se for positiva.

Posteriormente, a partir do perfil numérico, a identificação do microrganismo é finalmente efetuada no programa de identificação apiweb™ <https://apiweb.biomerieux.com>. Como controle negativo foi utilizado a cepa de *E. coli* ATCC 25922 e como controle positivo a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### **3.3. Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

#### **3.3.1. Teste de difusão em ágar**

A avaliação da suscetibilidade das 75 *P. aeruginosa* foi realizada pelo teste de difusão em ágar segundo Kirby & Bauer, frente aos seguintes antimicrobianos: amicacina (30µg); aztreonam (30µg); cefepima (30µg); ceftazidima (30µg); ciprofloxacina (5µg); gentamicina (10µg); imipenem (10µg); piperacilina-tazobactam (75/10µg) e tobramicina (30µg).

Os discos foram colocados sobre placa de Mueller Hinton, previamente semeado com uma suspensão bacteriana padronizada (0,5 de MacFarland) e incubados à 35°C por 16-18 horas. Após incubação, determinou-se a leitura dos halos de inibição para cada antimicrobiano, sendo classificado nas categorias sensível, intermediário ou resistente de acordo com critérios estabelecidos no protocolo do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M 100-S15 de 2005 e M 100-S16 de 2006.

### **3.4. Detecção da produção de carbapenemases ou metalo-beta-lactamases (MBL)**

#### **3.4.1. Disco aproximação**

As 75 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* com sensibilidade reduzida aos carbapenens e ceftazidima foram submetidas à avaliação da produção de metalo-beta-lactamase pelo método do disco aproximação de acordo com Arakawa et al (2000). Foi utilizado, como inibidor de MBL, o ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA) que possui a propriedade de bloquear a ação da MBL da mesma forma que o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a partir do sequestro dos metais do meio. Como substratos



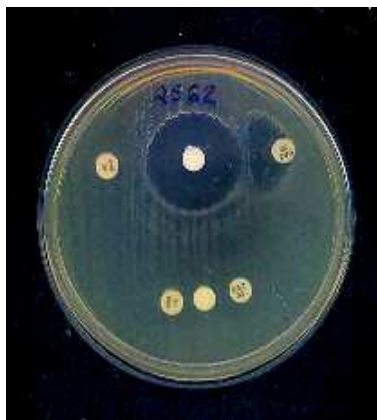
foram utilizados discos de ceftazidima (30µg) e imipenem (10µg) posicionados ao lado de um disco de papel de filtro contendo uma solução do agente quelante.

Para a realização do teste foi preparada uma suspensão bacteriana, com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland e inoculada em uma placa de Mueller-Hinton ágar (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Foi adicionado sobre cada disco em branco 5 µl de EDTA, 100 mM. A distância entre os discos de ceftazidima (30µg) e imipenem (10µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e o disco sem antimicrobiano, contendo apenas o EDTA, foi de 1,0 cm conforme Arakawa et al. (2000). Três microlitros de uma solução a 1,2g/ml de 2MPA foi adicionada a discos estéreis de papel de filtro, os quais foram dispensados a 2,5 cm (centro a centro) dos discos de ceftazidima (30µg) e imipenem (10µg). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 18 a 24 horas à temperatura de 37°C.

Conforme descrito por Arakawa et al. (2000), a presença de uma zona de expansão ou distorção no halo de inibição do crescimento entre os discos contendo o 2MPA ou EDTA e os discos de ceftazidima e imipenem indicará provavelmente que esta amostra seja produtora de uma MBL.

Como controle positivo foram utilizadas como cepas produtoras de metalo-beta-lactamase de *P. aeruginosa* com o gene *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> e *bla*<sub>SPM-1</sub>. Como controle negativo, foi utilizado a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Figura 1.** Teste de disco aproximação para avaliar a produção de MBL em amostras de *P.aeruginosa* utilizando discos de ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP)



Teste positivo: Identificação presuntiva para a produção de MBL.



Teste negativo: Crescimento bacteriano permanece inalterado.

### 3.5. Detecção dos genes *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> e *bla*<sub>SPM-1</sub> pela PCR

*P. aeruginosa* classificadas fenotipicamente como produtoras ou não de MBL pelo teste de aproximação de discos foram avaliadas pela técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificar a presença dos genes *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> e *bla*<sub>SPM-1</sub>.

Para a extração do DNA bacteriano, as amostras de pseudomonas foram cultivadas em ágar sangue e após isolamento de colônias puras, de três a cinco colônias de cada amostra foram transferidas para um tubo tipo eppendorf contendo 200µl de água destilada estéril. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 100°C por 10 minutos. Após este tempo, necessário para a lise das colônias, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente, e 10µl do sobrenadante foi utilizado para a etapa de amplificação do DNA. Em fluxo laminar, foi preparada a mix contendo: água milliQ, tampão MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, tampão NH<sub>4</sub> Cl 50mM, dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP, 0,2mM,

taqpolimerase (2,5U) e, 50 mol/L do primer. Um volume de 22,5 µL da mix foi transferido para cada tubo de amplificação, aos quais foram adicionados 2,5 µL do DNA bacteriano.

Para a amplificação do gene *bla<sub>IMP-1</sub>* utilizou o iniciador 5' CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC 3' e 5' GAACAACCAGTTTTGCCTTACC 3' (Osano et al. 1994; Poirel et al. 2000). Dois minutos a 95°C e dois minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 33 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 55°C (anelamento), quatro minutos a 72°C (extensão). A reação de amplificação do gene *bla<sub>IMP-1</sub>* produziu um produto com 587 pares de base. Como controles positivos e negativos foram utilizados as cepas de *P. aeruginosa* produtora de IMP-1 N° 319 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

A amplificação do gene *bla<sub>IMP-2</sub>* empregou o iniciador 5'GGCAGTCGCCCTAAAACAAA3' e 5'TAGTTACTTGGCTGTGATGG3' (Yan et al. 2001b). Como controle positivo foi utilizado a cepa de *Acinetobacter baumannii* produtora de IMP-2 e como controle negativo a amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Gales et al. 2003). As condições de termociclagem foram; 3 min a 94°C (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 35 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), 1 min a 55°C (anelamento) e 2 min a 72°C (extensão) e finalmente 7 minutos a 72°C (extensão). A reação de amplificação do gene *bla<sub>IMP-2</sub>* originou um produto com 737 pares de base (Yan et al. 2001b).

A amplificação do gene *bla<sub>VIM-1</sub>* utilizou o iniciador 5'TCTACATGACCGCGTCTGTC 3' e 5' TGTGCTTTGACAACGTTTCGC 3' (Lauretti et al., 1999; Poirel et al., 2000; Yan et al., 2001a). As condições de termociclagem foram: três minutos a 94°C (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 35 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 55°C (anelamento), dois minutos a 72°C (extensão) e sete minutos a 72°C. A reação de amplificação do gene *bla<sub>VIM-1</sub>* resultou em um produto com

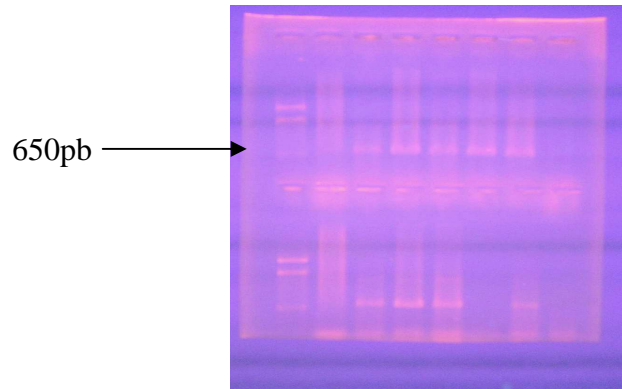
920 pares de base. Como controles positivos e negativos foram utilizados, *P. aeruginosa* produtora de VIM-1 75-3666 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

A amplificação do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* empregou o iniciador 5' ATGTTCAAAC TTTTGAGTAGTAAG 3' e 5' CTACTCAACGACTGAGCG 3' (Poirel et al., 2000; Poirel et al., 2001). As condições de ciclagem foram as mesmas utilizadas para a amplificação do gene *bla<sub>VIM-1</sub>*. A reação de amplificação do gene *bla<sub>VIM-2</sub>* resultou em um produto com 801 pares de base. Como controles positivos e negativos foram utilizados amostra de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 81-11963 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente.

A amplificação do gene *bla<sub>SPM-1</sub>* utilizou o iniciador 5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3' e 5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3' (Toleman et al. 2002). As condições de termociclagem foram as seguintes: cinco minutos a 95°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 40°C (anelamento), um minuto a 68°C (extensão) e cinco minutos de incubação a 68°C. A reação de amplificação do gene *bla<sub>SPM-1</sub>* resultou em um produto com 650 pares de base. Como controle positivo foi utilizado *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 N°48-1997A e como controle negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Toleman et al. 2002).

Dez microlitros dos produtos de cada reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, EUA) a 100V por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (89 nM Tris-Borato e 2mM EDTA pH 8,0). Foi utilizado como marcador do peso molecular DNA lader 100 pares de base (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), visualizado e fotografado contra luz ultravioleta (320nm).

**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose a 1% os produtos da PCR amplificados do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>.



## **4. RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

#### **4. Resultados, Discussão e Conclusão**

Os resultados, discussão e conclusão serão apresentados na forma de artigo submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## **5. Referências Bibliográficas**

Aboufaycal H, Sader HS, Rolston K, Deshpande LM, Toleman M, Bodey G, Raad I, Jones RN 2007. blaVIM-2 and blaVIM-7 Carbapenemicos-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Detected in a Tertiary Care Medical Center in the United States: Report from the MYSTIC Program. *J Clin Microbiol* 45: 614-615.

Afzal- Shah M, Woodford N, Livermore DM 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenêmicos resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 583-588.

Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG 1991. Astandard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 15: 269-270.

Ambler RP 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Antimicrob Chemother* 55: 1050-1051.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M 2000. Convenient test for screening metallo-b-Lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 38: 40-43.

Avison MB, Higgins CS, Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR 2001. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 b-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 413-419.

Bennett PM 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 43: 1- 4.

Bou G, Oliver A, Beltrán JM 2000. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenêmicosase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1556-1561.

Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KVI, Wilson SE, Quinn JP 1999. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int J Antimicrob Agents* 11: 93-100.

Bush K 1998. Metallo- $\beta$ -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 27: 48-53.

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

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

Bush LM, Calmon J, Johnson CC 1995b. Newer penicillins and  $\beta$ -lactamase. *Infect Dis Clin North Am* 9: 653-686.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH 1999. Emergence of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents Chemother* 43: 1379-1382.

Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN, Doi Y, de Oliveira Garcia D, Paterson DL 2008. RmtD 16S RNA methylase in Epidemiologically Unrelated SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1587-1588.

Castanheira M, Mendes RE, Murphy TA, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, Walsh TR 2003. Characterisation of mobile elements carrying metallo- $\beta$ -lactamase genes, blaIMP-1, blaIMP-16, bla-SPM-1, blaVIM-2 from Latin American Medical Centres: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *43<sup>rd</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrob Agents and Chemother* p. 153.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR 2004. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4654-4661.

Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ETS, Palepou MFI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM 2001. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 710-714.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth informational supplement. CSLI document M100-S15. Wayne, Pa, USA.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth information supplement. CSLI document M 100-S16. Wayne, Pa, USA.

Collins CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM 2002. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-bp site. *Mol Microbiol* 46: 1415-1427.

Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castaneda CR, Recable M, Livermore DM 2004. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 42: 5094-5101.

Crowder MW, Sharma N, Chandrasekar S, Sigdel T, Walsh TR, Spencer J, Crowder MW 1998. Overexpression, purification and characterization of the cloned metallo- $\beta$ -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemothe* 42: 921-926.

Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitão R, Peixe L, Duarte A 2002. Molecular characterization of bla (IMP-5), a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 251: 33-39.

Daxboeck F, Assadian O, Blacky A, Koller W, Hirschl AM 2004. Resintance of Gram-negative non-fermentative bacilli causing bloodstream infection, Viena, 1996-2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 415-416.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, Sader HS, Kugler K, Beach M 1999. Survey of bloodstream inf@□□□□□□ŷĩð<o gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis* 29: 595-607.

Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA b-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 196-199.

Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, Quentin C 2001. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol* 39: 2072-2078.

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.

Gales AC, Reis AO, Jones RN 2001. Comtemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymixin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J Clin Microbiol* 39: 183-190.

Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP 2007. Ocorrência dos genes de metalo-b-lactamases bla-SPM-1 e bla-IMP em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de três hospitais universitários da cidade de Porto Alegre, Brasil. *Braz J Microbiology* 38: 108-109.

Hall BG, Barlow M 2005. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 55: 1050-1051.

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

Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, Kondoh A, Matsuda J, Hirayawa M, Ynagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S 2003. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-  $\beta$ - lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 37: 26-32.

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

Jacoby GA, Medeiros AA 1991. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1697-1704.

Kiska DL & Gillian PH 2003. *Pseudomonas*. In: *Manual of Microbiology*. Murray P R, Baron E J, Pfaller M A, Jorgensen J H & Tenover F C (eds) 8th ed. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washington D C.

Koneman EW, Win JWC Jr, Allen SD, Janda W , Tenover FC, Schreckenbach PC, Woods GL, Lippincott W 2006 .*Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6 ed, p.316-322.

LAHEY 2008. Descrição da enzima IMP-11 encontra-se disponível no site <http://www.lahey.org>. Acesso em 10 de março de 2008.

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

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier GD, Rossolini GM, Chong Y 2005. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4485-4491.

Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM 2005. First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 43: 516-519.

Livermore DM 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiology* 8: 557-584.

Livermore DM 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenêmicoss. *J Antimicrob Chemother* 47: 247-250.

Livermore DM 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infection Dis* 34: 634-640.

Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Souza JMA, Edmond MB, Faro C, Wey SB 2006. Bloodstream Infections with Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology and Clinical Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 388-390.

Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL 2007. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamase in Hospitals from Southern Brazil. *Clin Infect Dis* 35: 457-460.

Massida O, Rossolini GM, Satta G 1991. The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol* 173: 4611-4617.

Mendes RE, Mark AT, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR 2004. Integron Carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-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.

Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR 2003. Biochemical characterization of the acquired metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 582-587.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller Olken MA, Tenover FC 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Ed. ASM press, p. 719-748.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 27: 520-532.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 32: 470-485.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS Documents M100-S13, Wayne, Pa, USA.

Oliveira RA, Provasi J, Santos DB, Montalvão E, Silva L, Silva FM, Frusta VRC, Gales AC, Pimenta FC, Carmo Filho JR 2008. First description and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* producer of *bla*-SPM in Goiânia-GO (in press).

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

Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kaminska W, Anowska DD, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR 2004. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*VIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). *J Antimicrob Chemothe* 53: 451-456.

Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér SA, Oliveira MP, Sampaio JLM, Freitas ADA, Ferreira ALP, Amorim ELT, Riley LW, Moreira BM 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 2420-2424.

Philippon A, Labia R, Jacoby G 1989. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1131-1136.

Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC 2008. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evolution of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP, GIM, SIM or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 46: 2028-2047.

Pitout JDD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Deirdre L, Church DL 2007. Molecular Epidemiology of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Emergence of VIM-2-Producing Isolates. *J Clin Microbiol* 45: 294-298.

Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P 2005. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapens in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 202-208.

Poirel L, Lambert T, Türkoglu S, Ronco E, Gaillard JL, Nordmann P 2001. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenêmicos-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 546-552.

Poirel L, Magalhaes M, Lopes NM 2004. Molecular Analysis of Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene blaSPM-1 Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife, Brasil. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1406-1409.



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

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

Pollack M 1995. *Pseudomonas aeruginosa. Principles and practice of infectious diseases*, 4<sup>th</sup> ed, New York Churchill Livingstone, p 1980-2003.

Poole K 2003. Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 12.

Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P 2002. First isolation of a carbapenêmicos-hydrolyzing b-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 932-933.

Quinn JP 1998. Clinical problems posed by multiresistant non fermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 27: 117-124.

Quinteira S, Sousa JC, Peixe L 2005. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo-b-lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 451-453.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM 2000. Characterization of the metallo-b-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1229-1235.

Rodrigo EM, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR 2004. First Isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1433-1434.

Rossolini GM 2005. Acquired metallo- $\beta$ -lactamases: an increasing clinical threat. *Clin Infect Dis* 41: 1557-1558.

Rossolini GM, Franceschini N, Riccio ML, Mercuri PS, Perilli M, Galleni M, Frere JM, Amicosante G 1998. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* carbapenêmicosase: a new molecule@□□□□□□□□ŷið8@□□□amase showing a broad substrate profile. *Biochem J* 332: 145-152.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC 2004. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Bras J Inf Dis* 8: 25-79.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Winokur P, Kugler K, Pfaller MA, Doern GV, and the SENTRY Latin America Study Group 1998. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). *Diagn Microbiol Infect Dis* 32: 289-301.

Saiman L, Siegel J 2004. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 17: 57-71.

Santos Filho L, Santos IB, Assis AML, Xavier DE 2002. Determinação da produção de metalo  $\beta$ -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J Brás Patol Méd Lab* 38: 79-84.

Santos Filho, L 2003. *Diagnóstico microbiológico*. 3 ed, João Pessoa, Sci 289: 321-331.

- Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Otha M 1996. Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 349-353.
- Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A 2004. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol* 30: 25-32.
- Simm AM, Higgins CS, Pullan ST, Avison MB, Niumsup P, Erdozain O, Bennett PM, Walsh TR 2001. A novel metallo-b-lactamase, MBL1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett* 509: 350-354.
- Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 20: 323-334.
- Spencer J, Clarke AR, Walsh TR 2001. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic b-lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo-b-lactamase. *Journal Biol Chem* 36: 33638-33644.
- Spratt BG, Kromie KD 1988. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 10: 699-711.
- Sturenburg E, Sobottka I, Laufs R, Mack D 2005. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51: 51-55.
- Thompson JS, Malamy MH 1990. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* b-lactamase II. *J Bacteriol* 172: 2584-2593.

Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR 2004. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 329-332.

Toleman MA, Diedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR 2003. Genetic characterization of a novel metallo-b-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenêmicos genes in Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 52: 583-590.

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

Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MFI, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM 2000. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenêmicosase in Greece. *J Clin Microbiol* 38: 1290-1292.

Vidal F, Mensa J, Almeda M, Olona M, Martínez JA, Marco F, López MJ, Soriano A, Horcajada JP, Gatell JM, Richart C 2003. Bacteraemia in adults due glucose non-fermentative bacilli other than *P.aeruginosa*. *QJM* 96: 227-234.

Walsh TR, Gamblin S, Emery DC, MacGowan AP, Bennett PM 1996. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo-b-lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J Antimicrob Chemother* 37: 423-431.

Walsh TR, Neville WA, Haran MH, Tolson D, Payne DJ, Bateson JH, Macgowan AP, Bennett PM 1998. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-b-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 436-439.

Woodford N, Palepou MFI, Babini GS, Holmes B, Livermore DM 2000. Carbapenêmicosases of *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution

of blaB and characterization of a novel metallo-b-lactamase gene, blaB3, in the type strain, NCTC 10016. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1448-1452.

Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ 2001a. Metallo-b-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2224-2228.

Yan JJ, Ko WC, Wu JJ 2001b. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1 and a variant of IMP-2 metallo-b-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2368-2371.

Artigo científico enviado para revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. As normas para a publicação do artigo estão em Anexo.

**DETECÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASE EM *Pseudomonas aeruginosa*  
ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS**

DETECTION OF METAL-BETA-LACTAMASE IN *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED  
FROM PATIENTS HOSPITALIZED

DIANA CHRISTINA PEREIRA SANTOS GONÇALVES<sup>1</sup>; FABIANA CRISTINA  
PIMENTA<sup>2</sup>; JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA<sup>3</sup>; JOSÉ RODRIGUES DO CARMO  
FILHO<sup>4</sup>; LARA STEFANIA NETTO DE OLIVEIRA LEÃO<sup>5</sup>.

**Resumo**

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria frequentemente isolada no ambiente hospitalar. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade de *P. aeruginosa* previamente isoladas de pacientes internados em um hospital de Goiânia (Goiás-Brasil); realizar a triagem fenotípica para a produção de metalo-beta-lactamase (MBL) e detectar os genes das MBL pela técnica de PCR. Foram avaliadas 75 *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e à ceftazidima, no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007. A identificação bioquímica foi realizada pelo sistema API 20E e o antibiograma pelo método de Kirby-Bauer. *P. aeruginosa* apresentaram resistência a vários agentes antimicrobianos. A produção de MBL foi verificada em 46,7% (35/75) dos isolados, enquanto que o gene *bla*<sub>SPM-1</sub> em 39 (52,0%) e o *bla*<sub>IMP-1</sub> em três (4,0%) *P. aeruginosa*, ou seja, 56,0% dos isolados. A frequência de *P. aeruginosa*

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

<sup>2</sup> Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP).

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP).

<sup>4</sup> Universidade Católica de Goiás (UCG).

<sup>5</sup> Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP).

produtoras de MBL sugere um maior controle da disseminação de resistência no ambiente hospitalar.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, metalo-beta-lactamase, infecção nosocomial, carbapenêmicos, multirresistência

### **Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* is frequently isolated in hospitals. This study aimed to determine the antimicrobial susceptibility profile of *P. aeruginosa* isolated from patients admitted in a hospital of Goiânia (Goiás-Brasil), verify the MBL production and, detect the MBL genes by PCR technique. A total of 75 *P. aeruginosa* was isolated, in the period of January/2005 to January/2007. The isolates biochemical identification was performed by system *API 20E*® and antimicrobial susceptibility profile by Kirby-Bauer method. *P. aeruginosa* presented resistance to diverse antimicrobials. The MBL production detected by diffusion disc method was 46.7% (35/75), and the gene *bla*<sub>SPM-1</sub> was detected in 39 (52.0%) and the gene *bla*<sub>IMP-1</sub> in three (4.0%) isolates, that is 56.0% of the isolates. The frequency of *P. aeruginosa* MBL production alert to necessity of control the dissemination of bacteria multi-drug resistant.

**Key-Words:** *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-beta-lactamase, nosocomial infection, carbapenems, multiresistant

**Endereço para Correspondência:** Fabiana Cristina Pimenta, Rua Delenda Rezende de Melo, esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás, e-mail: pimentaf@hotmail.com.



## Introdução

A importância clínica dos bastonetes Gram-negativos (BGNNF) tem aumentado significativamente devido à gravidade das infecções, elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes hospitalizados<sup>2</sup>. Esse grupo de microrganismos também apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos, representando um grande desafio na terapêutica. Dentre os BGNNF, *P. aeruginosa* é uma das maiores causas de infecções em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI) e queimados<sup>15</sup>.

A utilização indiscriminada de carbapenêmicos no ambiente hospitalar promove uma pressão seletiva sobre a microbiota, o que favorece a seleção de subpopulações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos<sup>6</sup>.

O isolamento de *P. aeruginosa* multirresistentes tem sido frequente nos últimos anos. Vários agentes antimicrobianos têm se tornado menos ativos, reduzindo o número de opções terapêuticas e aumentando o impacto clínico de infecções nosocomiais. Dentre as preocupações relacionadas à resistência antimicrobiana, destacam-se a produção de MBL<sup>12</sup>.

*P. aeruginosa* produtora de MBL têm sido reportada como importante causa de infecções hospitalares. Apesar da prevalência destes microrganismos em hospitais ainda ser pouco investigada, os mesmos estão associados aos casos de disseminação clonal e surtos hospitalares<sup>5,7</sup>.

A emergência de bactérias produtoras de MBL requer mudanças na rotina dos laboratórios de Microbiologia, adequando métodos capazes de detectar a sua produção. Entretanto, representa um desafio, pois não existe um consenso sobre a padronização de metodologias para a detecção da produção dessas enzimas<sup>13</sup>.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade de *P. aeruginosa* previamente isoladas de pacientes internados em um hospital de Goiânia (Goiás -

Brasil); realizar a triagem fenotípica para a produção de MBL dos isolados que se apresentarem resistentes ao imipenem e à ceftazidima e detectar os genes das MBL (*bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> e *bla*<sub>SPM-1</sub>).

## Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido em um hospital da rede privada localizado no município de Goiânia (Goiás – Brasil) em parceria com o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O hospital possui um total de 64 leitos, destes 11 são destinados à Unidade de Terapia Intensiva. Foram avaliadas 75 *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados, oriundas de diversos espécimes clínicos.

O critério de inclusão dos pacientes no estudo foi a admissão nas unidades clínicas do referido hospital, no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007, independente de gênero e doença de base. O protocolo de investigação (Nº 236/07) foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital Geral de Goiânia atendendo à resolução 196/96.

Os meios de cultura utilizados foram escolhidos de acordo com os espécimes clínicos analisados<sup>9</sup>. Amostras de urina foram semeadas em ágar Cled (Biobrás) e ágar MacConkey (Difco). Amostras de secreções diversas foram semeadas em ágar base (Biobrás) com 5% de sangue de carneiro, ágar chocolate e caldo tioglicolato (Difco). Amostras provenientes de hemoculturas foram inoculadas em meio Hemobac trifásico (Probac).

A identificação dos isolados foi feita pelo aspecto morfológico das colônias, odor, produção de pigmentos, características morfo-tintoriais e teste da oxidase<sup>9</sup>. A identificação bioquímica foi utilizado o sistema API 20E (bioMérieux).

O perfil de suscetibilidade dos isolados foi avaliado pelo teste de difusão em ágar e foram testados os seguintes antimicrobianos amicacina (30µg); aztreonam (30µg); cefepima

(30µg); ceftazidima (30µg); ciprofloxacina (5µg); gentamicina (10µg); imipenem (10µg); piperacilina-tazobactam (75/10µg) e tobramicina (30µg) e os resultados reportados como

sensível, resistência intermediária ou resistente conforme recomendações da *CLSI* (*Clinical*

and Laboratory Standards Institute)<sup>®</sup> com sensibilidade reduzida aos carbapenems e ceftazidima foram submetidas à avaliação da produção de MBL pelo método do disco aproximação como descrito por Arakawa et al<sup>1</sup>. Foi utilizado o ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os substratos usados foram discos de ceftazidima (30µg) e imipenem (10µg) posicionados ao lado de um disco de papel de filtro contendo a solução do agente quelante.

A presença de uma zona de expansão ou distorção no halo de inibição do crescimento entre os discos contendo o 2MPA ou EDTA e os discos de ceftazidima e imipenem indica que o isolado é produtor de uma metalo-beta-lactamase<sup>1</sup>.

*P. aeruginosa* classificadas fenotipicamente como produtoras ou não de MBL pelo teste de aproximação de discos foram avaliadas pela técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificar a presença de genes que codificam a produção de MBL.

Os oligonucleotídeos inicializadores utilizados foram: *bla*<sub>IMP-1</sub> F(5' CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC3') e R(5' GAACAACCAGTTTTGCCTTACC3'). A reação de amplificação do gene *bla*<sub>IMP-1</sub> produziu um produto com 587 pares de base. Para reação de multiplex, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-2</sub> foram: F(5' GGCAGTCGCCCTAAAACAAA3') e R (5' TAGTTACTTGGCTGTGATGG3'), F(5' TCTACATGACCGCGTCTGTC3') e R (5' TGTGCTTTGACAACGTTTCGC3'), F(5' ATGTTCAAACCTTTTGAGTAGTAAG3') e R(5' CTAACAACGACTGAGCG3')<sup>14, 19</sup>. A reação de amplificação dos genes *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-2</sub> originaram respectivamente produtos de: 737 pares de base, 920 pares de base e 801 pares de base.

A amplificação do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> utilizou o iniciador F(5' CCTACAATCTAACGGCGACC3') e R(5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC3')<sup>17</sup>. A reação de amplificação do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> resultou em um produto com 650 pares de base.

## Resultados

De acordo com os espécimes clínicos, 29 (38,7%) *P. aeruginosa* foram isoladas de amostras de urina, 21 (28,0%) de lavado broncoalveolar, 08 (10,7%) de secreção abdominal, 07 (9,3%) debridamento de escara, 05 (6,7%) de ferida operatória, 03 (4,0%) de hemoculturas, 01 (1,3%) de escarro e 01 (1,3%) ponta de catéter.

A distribuição dos 75 isolados de *P.aeruginosa* de acordo com os setores de atendimento dos pacientes no hospital avaliado está apresentada na tabela 1. A maioria das *P.aeruginosa* foi isolada de pacientes internados na UTI (62,7%), seguida pelos isolados de pacientes atendidos em outras unidades de internação.

Os isolados testados apresentaram perfil de multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos. Em relação ao imipenem, 62 (82,7%) foram resistentes, frente à ceftazidima, 68 (90,7%) foram resistentes, 23 (30,7%) *P. aeruginosa* apresentaram resistência ao aztreonam, frente à ciprofloxacina, 73 (97,3%) apresentaram resistência. Do grupo dos inibidores de beta-lactamase, foi observada uma resistência de 36 (48,0%) a piperacilina/tazobactam, do grupo das cefalosporinas de quarta geração, apresentaram resistência de 66 (88,0%) a cefepima. Em relação, a amicacina, a gentamicina e a tobramicina, com resistência de 59 (78,7%), 63 (84,0%) e 58 (77,4%), respectivamente. (Tabela 2).

Dos 75 isolados, 35 (46,7%) foram produtoras de MBL. O 2MPA apresentou melhor atividade em relação ao EDTA para detectar os isolados produtores de MBL (Tabela 3).

O gene *bla*<sub>SPM-1</sub> foi detectado em 39 (52,0%) isolados e o *bla*<sub>IMP-1</sub> em 3 (4,0%). Os genes *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> *bla*<sub>VIM-2</sub> não foram detectados.

Em três *P. aeruginosa* isoladas de urina, foi observada resistência aos carbapenêmicos, ceftazidima e produção de MBL, e o gene *bla<sub>SPM-1</sub>* foi detectado em dois desses isolados.

Em três *P. aeruginosa* isolados de ferida operatória, ponta de catéter e escara, com perfil de resistência aos carbapenêmicos e a ceftazidima, foi detectado o gene *bla<sub>IMP-1</sub>*. Porém, não foi observada a produção de MBL pelo teste de disco aproximação.

Entre *P. aeruginosa* com resistência ao imipenem, ceftazidima e sensibilidade ao aztreonam, 25 (33,3%) apresentaram produção de MBL e foi detectado o gene *bla<sub>SPM-1</sub>*, destes 10 (13,3%) foram isoladas de urina. Porém, em 07 (9,3%) isolados com produção de MBL identificado pelo teste fenotípico, não foram detectados os genes avaliados. Entretanto, em 10 (13,3%) isolados com detecção do gene *bla<sub>SPM-1</sub>*, não foi observada a produção de MBL pelo teste de disco aproximação.

## **Discussão**

A produção de MBL foi verificada, pelo método fenotípico, em 35/75 (46,7%) das *P. aeruginosa* analisadas quando o inibidor utilizado foi o 2MPA. O teste de disco aproximação empregado para detectar MBL pode apresentar boas sensibilidade e especificidade, porém esses resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato e o agente quelante utilizado. Segundo Arakawa et al<sup>1</sup>, o agente quelante 2MPA apresentou melhor atividade (100%) quando comparado ao com o EDTA utilizado na detecção de amostras produtoras de MBL utilizando-se a ceftazidima como substrato. Nesse estudo o teste com o 2MPA permitiu verificar a produção de MBL em 35 isolados, enquanto utilizando o EDTA, a produção foi verificada em 06.

Os genes de MBL foram detectados em 42 (56,0%) amostras de *P.aeruginosa*, entretanto em três isolados resistentes aos carbapenêmicos e à ceftazidima, foi detectado o gene *bla<sub>IMP-1</sub>*, porém, não foi observada a produção de MBL pelo teste de disco aproximação. Entretanto, em 07 (9,3%) isolados com produção de MBL, não foram detectados os genes avaliados. Em outro estudo realizado o 2MPA apresentou melhor atividade (100%) na detecção de amostras de *Acinetobacter spp.* produtoras de MBL, porém falhou em detectar 10,5% das *P.aeruginosa* analisadas. Em contrapartida, o EDTA apresentou melhor detecção da produção de MBL em amostras de *P.aeruginosa* (100%), mas falhou em detectar 6% das amostras de *Acinetobacter spp*<sup>10</sup>.

A taxa de *P. aeruginosa* produtora de MBL encontrada nesse estudo está em concordância com os resultados descritos por Jayakumar et al<sup>8</sup>, que verificaram 46,7% de produção de MBL em *P. aeruginosa* com resistência a imipenem e meropenem e isoladas de pacientes de um hospital de cuidados terciários.

A maioria das *P. aeruginosa* avaliadas nesse estudo foi isolada de amostras de urina (38,7%) seguido pelo lavado broncoalveolar com 28,0% e secreção abdominal (10,7%). Villas Bôas et al<sup>18</sup> descreveram uma frequência de 26,4%, de infecções do trato urinário, em idosos internados em um hospital universitário.

O perfil de resistência, dos isolados avaliados, ao imipenem e a ceftazidima foi de 82,7 e 90,7%, respectivamente, enquanto que Santos Filho et al<sup>16</sup> avaliaram 198 *P.aeruginosa* isoladas de diversos espécimes clínicos, hospitalares e comunitárias relataram um percentual de resistência de 19,7% ao imipenem e de 15,2% à ceftazidima, com 10,1% de resistência cruzada aos dois antimicrobianos. Entre esses isolados apenas 2% produziram MBL, dados inferiores aos detectados nesse estudo.

Neste estudo, o gene *bla<sub>SPM-1</sub>* foi detectado em 39 (52,0%) isolados e o *bla<sub>IMP-1</sub>* em 03 (4,0%). Outros estudos realizados no Brasil demonstram que *P. aeruginosa* portadoras do



gene *bla*<sub>SPM-1</sub> está disseminado pelo país e sua taxa de isolados produtores de MBL é variável em diferentes regiões<sup>3 16 20</sup>. As infecções causadas por este agente produtor da carbapenemase SPM-1 está relacionada com elevada mortalidade, como demonstrado no estudo que avaliou a produção da MBL em 76 *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea, sendo que 23 (30,3%) apresentaram fenótipo MBL e a taxa de mortalidade foi de 85,7% entre os pacientes infectados por *P. aeruginosa* produtora de MBL<sup>11</sup>.

A detecção de genes de resistência em isolados clínicos e a avaliação de seu perfil de suscetibilidade fornecem dados importantes para a racionalização da terapia antimicrobiana e redução das taxas de mortalidade. Porém, devido ao impacto da produção de MBL no contexto hospitalar, estudos adicionais são necessários para a elaboração e implementação de medidas mais efetivas de prevenção e controle das infecções nosocomiais, diminuindo custos hospitalares e qualificando os serviços oferecidos pelas equipes de saúde.

## **Conclusões**

Os dados apresentados neste estudo mostraram taxas elevadas de *P.aeruginosa* produtoras de MBL, dificultando assim as opções para tratamentos e a necessidade de vigilância individualizada de perfil de resistência em instituições de saúde. Essas informações devem auxiliar na adoção de medidas concretas de utilização dos antimicrobianos e redução da disseminação de microrganismos resistentes nas instituições.

**Tabela 1.** Distribuição das *P. aeruginosa* por Setores de um hospital de Goiânia-GO onde foram isoladas 75 amostras no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007.

<b>Setor do hospital</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
UTI	47	62,7%
Apartamento	13	17,3%
Enfermaria	11	14,6%
Ambulatório	04	5,4%
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>100,0%</b>

**Tabela 2.** Perfil de suscetibilidade de 75 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de diversos espécimes clínicos de pacientes internados em um hospital de Goiânia – GO.

Antimicrobiano	Resistente		Intermediário		Sensível		Não realizado	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Imipenem	62	82,7	13	17,3	-	-	-	-
Ceftazidima	68	90,7	-	-	07	9,3	-	-
Aztreonam	23	30,7	15	20,0	37	49,3	-	-
Ciprofloxacina	73	97,3	-	-	02	2,7	-	-
Piperac/Tazobac	36	48,0	04	5,3	13	17,3	22	29,4
Amicacina	59	78,7	02	2,7	14	8,6	-	-
Gentamicina	63	84,0	02	2,7	09	12,0	01	1,3
Tobramicina	58	77,4	03	4,0	07	9,3	07	9,3
Cefepima	66	88,0	05	6,6	04	5,4	-	-

**Tabela 3.** Detecção de produção de MBL utilizando como inibidor EDTA/2MPA e o substrato Cefotazidima (CAZ) de 75 amostras de *P.aeruginosa* isoladas de pacientes atendidos em um hospital em Goiânia-GO.

<b>MBL</b>	<b>2MPA/CAZ</b>	<b>EDTA/CAZ</b>
Teste positivo	35	06
Teste negativo	40	69
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>75</b>

## Referências Bibliográficas

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -Lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal Clinical Microbiology* 38: 40-43, 2000.
2. Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KVI, Wilson SE, Quinn JP. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int Journal Antimicrobial Agents* 11: 93-100, 1999.
3. Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN, Doi Y, de Oliveira GD, Paterson DL. RmtD 16S RNA methylase in Epidemiologically Unrelated SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1587-1588, 2008.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth information supplement. CSLI document M 100-S16. Wayne, PA, USA.
5. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castaneda CR, Recable M, Livemore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal Clinical Microbiology* 42: 5094-5101, 2004.
6. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 52: 699-702, 2003.
7. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, Kondoh A, Matsuda J, Hirayawa M, Ynagihara K, Miyazaki Y, Tomono K, Yamada Y, Kamihiro S,

- Kohno S. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-  $\beta$ - lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 37: 26-32, 2003.
8. Jayakumar S, Appalaraju B. Prevalence of multi and pan drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* with respect to ESBL and MBL in a terciary care hospital. *Indian Journal Pathology Microbiology* 50: 922-925, 2007.
  9. Koneman EW, Win JWC Jr, Allen SD, Janda WM, Gary WP, Schreckenber PC, Woods GL, Lippincott W. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6 ed, p.316-322, 2006.
  10. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J and Chong Y. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerging Infectious Diseases* 9: 868-871, 2003.
  11. Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Souza JMA, Edmond MB, Faro C, Wey SB. Bloodstream Infections with Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology and Clinical Outcomes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50: 388-390, 2006.
  12. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 42:1762-1770, 1998.
  13. Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evolution of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP, GIM, SIM or VIM-producing isolates. *Journal Clinical Microbiology* 46: 2028-2047, 2008.

14. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenêmicos-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44: 891-897, 2000.
15. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Rev* 17: 57-71, 2004.
16. Santos Filho L, Santos IB, Assis AML, Xavier DE. Determinação da produção de metalo  $\beta$ -lactamases em amostras de *Pseudomomas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 38: 79-84, 2002.
17. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 50: 673-679, 2002.
18. Villas Bôas PJF, Ruiz T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Revista de Saúde Pública*, v 38, n 03, São Paulo, 2004.
19. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1 and a variant of IMP-2 metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 2368-2371, 2001.
20. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 1148-1151, 2005.







REVISTA DA  
SOCIEDADE BRASILEIRA  
DE MEDICINA TROPICAL

ISSN 0037-8682 *versão impressa*

ISSN 1678-9849 *versão on-line*

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

Objetivo e política editorial

Preparação de originais

## **Objetivo e política editorial**

A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** destina-se à publicação de trabalhos científicos relacionados às doenças infecciosas e parasitárias, medicina preventiva, saúde pública e assuntos correlatos.

A revista tem periodicidade bimestral e aceitará trabalhos de pesquisadores brasileiros ou estrangeiros desde que obedeçam às normas e que sejam aprovados pelos relatores indicados pelos Editores.

1. Além de **Artigos**, a revista publica **Comunicações** para a divulgação de resultados de ensaios terapêuticos, notas prévias, relatórios técnicos, relatos de casos, cartas ao editor, fatos históricos, resenhas bibliográficas e resumos de teses. Artigos de revisão e editoriais serão publicados por solicitação do Corpo Editorial.

2. Os trabalhos devem ser originais e inéditos, digitados em espaço duplo, deixando margem de 3 cm à esquerda e remetidos em três vias ao endereço abaixo, sendo uma a original. Após revisão, pede-se que os trabalhos sejam enviados em disquete, devidamente acompanhados de uma cópia impressa da versão revisada.

## **Preparação de originais**

3. Normas para enviar trabalhos, após revisão, em meio eletrônico; obedecer os seguintes requisitos:

a) podem ser utilizados disquetes MS-DOS compatíveis nos formatos 3 1/2" ou 5 1/4". Disquetes de Macintosh no formato 3 1/2" também serão aceitos. Elimine dos disquetes todos os arquivos não pertinentes ao artigo enviado. Escreva na etiqueta do disquete: título do

artigo, nome do autor, nome do arquivo, editor de texto utilizado e nome dos arquivos acessórios (folhas de estilos, gráficos, tabelas etc);

b) envie artigos compatíveis com os seguintes processadores de texto: Word para Windows (versão 6.0 ou anterior), Word para Mac (versão 6.0 ou anterior), outros formatos podem ser aceitos mediante consulta prévia. Nunca envie artigos em formato ASCII (só texto/"text only");

c) ao redigir o texto, o comando de retorno de linha ("Enter") deve ser utilizado exclusivamente no final dos parágrafos. Não adicione espaços extras ou "tabs" ao texto para obter recuo da primeira linha ou centralização de títulos na página. Tampouco retornos ("enters") adicionais para espaçar os parágrafos. Para obter esses efeitos, utilize apenas os comandos de formatação de parágrafo, disponíveis em todos os editores de texto acima;

d) podem ser incluídas tabelas, desde que montadas no próprio editor de texto. Observações e notas de rodapé devem ser, preferencialmente, colocadas após o final do artigo, devidamente numeradas e referenciadas;

e) ilustrações, tabelas e gráficos produzidos em outros programas e "importados" para inclusão no texto devem ser enviados em arquivos anexos, em formatos universais de fácil compatibilidade (TIFF, BMP, PICT, GIF etc). Evite formatos não-padronizados (EPS, WMF etc) e arquivos que só podem ser abertos por programas específicos. De qualquer forma, envie sempre uma cópia bem impressa do gráfico, tabela ou ilustração para eventual reprodução.

4. Os trabalhos devem ser redigidos preferencialmente em português, embora sejam também aceitos trabalhos em inglês e espanhol. A linguagem deve ser clara e precisa, e o texto conciso normalmente não ultrapassando 12 páginas digitadas para **Artigos** e 6 para **Comunicações**.

5. A seguinte seqüência deve ser observada:

a) **título** original e traduzido e nome dos autores em letras minúsculas. No rodapé, instituição onde foi realizado o trabalho, filiação dos autores, quando for o caso, órgão financiador e o endereço completo para correspondência, inclusive telefone, fax e e-mail;

b) **resumo**: máximo de 150 palavras para os artigos e 50 para as comunicações e relatos de casos. Deve ser informativo e não indicativo, apresentando o objetivo do trabalho, como foi realizado, os resultados alcançados e a conclusão. Não usar abreviaturas ou citações

bibliográficas. Citar 4 ou 5 palavras-chave, que expressem com precisão o conteúdo do trabalho;

c) **abstract**: inserido logo após o resumo, deve ser a tradução fiel do mesmo, seguido pelas key-words;

d) **introdução**: clara, objetiva, contendo informações que justifiquem o trabalho, restringindo as citações ao necessário;

e) **material e métodos**: descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser referidos por citação;

f) **resultados**: sempre que necessário devem ser acompanhados por tabelas, figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. Texto e documentação devem ser complementares. Quando aplicáveis, os dados deverão ser submetidos à análise estatística. O conteúdo deve ser informativo, não interpretativo;

g) **discussão**: limitar aos resultados obtidos e conter somente as referências necessárias. O conteúdo deve ser interpretativo e as hipóteses e especulações formuladas com base nos achados;

h) **agradecimentos**: limitados ao indispensável;

i) **referências bibliográficas**: digitadas em minúsculas, sem ponto entre as abreviaturas, em espaço duplo, numeradas e organizadas em ordem alfabética pelo último sobrenome do autor; citar todos os autores de cada referência. Quando houver mais de uma citação do mesmo autor, seguir a ordem cronológica. As citações devem ser referidas no texto pelos respectivos números, acima da palavra correspondente, sem vírgula e sem parênteses; na lista de referências, deve seguir o seguinte estilo e pontuação:

***Artigos em periódicos (os títulos dos periódicos devem aparecer por extenso):***

Coura JR, Conceição MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Baarbosa no diagnóstico da esquistossomose mansoni. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 8:153-158, 1974.

***Livros:***

Chandra RK, Newberne PM. Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions. Plenum, New York, 1977.

***Capítulos de livros:***

Fulton JD. Diagnosis of protozoal diseases. In: Gell PGH, Coombs RRA (ed) Clinical aspects of immunology, 2nd edition, Blackwell, Oxford, p.133-136, 1968.

***Resumos de congressos:***

Daher RH, Almeida Netto JC, Pereira LIA. Disfunção hepática na malária grave. Estudo de 161 casos. In: Resumos do XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília p.16, 1995 .

***Teses:***

Tavares W. Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*. Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do bacilo tetânico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1975.

Somente deverão ser citados os trabalhos publicados. Dados não publicados ou comunicações pessoais devem ser referidos no texto da seguinte forma: (AB Figueiredo: comunicação pessoal, 1980) e (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados).

6. Tabelas: numeradas em algarismos arábicos e dotadas de título descritivo conciso. Manter seu número ao mínimo necessário e lembrar que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em folhas separadas, sem linhas verticais e as unidades referidas no título de cada coluna. Todos os dados das tabelas, inclusive o título, devem ser em minúsculas, exceto as siglas.

7. Ilustrações: de boa qualidade e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Além das fotografias, os gráficos, quadros etc. devem ser referidos no texto como Figuras. Anotar no verso com lápis o número da figura e o nome do autor e trabalho. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada e em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário.

8. Comitê de ética: no trabalho de pesquisa envolvendo seres humanos, deverá constar o nome do Comitê de Ética que o aprovou.

9. Permissão dos autores: anexar carta com o ciente de todos os autores concordando com a publicação.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)