UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

ROBERTO MORAIS LUZ DE CARVALHO

DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-β-LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter baumannii* EM HOSPITAIS DE SÃO LUÍS-MA

SÃO LUÍS

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTO MORAIS LUZ DE CARVALHO

DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-β-LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter baumannii* EM HOSPITAIS DE SÃO LUÍS-MA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Azizedite Guedes Gonçalves

Co-orientador: Sirlei Garcia Marques

SÃO LUÍS

2009

Roberto Morais Luz de Carvalho

DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-β-LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter baumannii* EM HOSPITAIS DE SÃO LUÍS-MA

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia / / , considerou o(a) candidato(a)

( ) APROVADA ( ) REPROVADA

1) Examinador _____

2) Examinador _____

3) Examinador _____

4) Presidente (Orientador)_____

À minha família.

À Daniele.

À Raphaela

AGRADECIMENTOS

– A Deus.

– Aos meus pais, pelo amor e carinho.

– Aos meus irmãos, pelo companheirismo.

– Aos meus amigos e colegas de trabalho, pelo apoio nas horas difíceis.

– À minha orientadora Prof.ª Dr.ª Azizedite Guedes Gonçalves, pela oportunidade e confiança.

– Aos professores, Libera Maria Dalla Costa e Nilton Lincopan, pela doação de reagentes.

– E, em especial, a Rosália do Laboratório Cedro, pela presteza na realização das análises.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A detecção de metalo-β-lactamases (MβL) em bacilos gram-negativos não fermentadores vem ganhando importância nos últimos anos, não só pela maior freqüência de sua participação como agentes responsáveis por quadros infecciosos graves, como também pela selecionada resistência aos antimicrobianos. Este trabalho tem como objetivos detectar fenotipicamente MβL em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem em três hospitais de São Luís-MA; verificar o percentual de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem nos hospitais pesquisados; determinar a freqüência de positividade de amostras produtoras de MβL; correlacionar as cepas MβL positivas com os hospitais, as amostras clínicas e os setores hospitalares de origem e comparar o perfil de resistência das amostras produtoras de MβL com as amostras não produtoras. No período de Junho a Novembro de 2008, foram analisadas 138 cepas consecutivas de *P. aeruginosa* e 72 de *A. baumannii.* Destas, foram triadas 56 amostras de *P. aeruginosa* e 19 de *A. baumannii* resistentes a imipenem para os testes de detecção fenotípica de MβL. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, utilizou-se o método de Kirby-Bauer. A detecção fenotípica das amostras produtoras de MβL foi realizada através das técnicas do disco aproximação e disco combinado. No período estudado, 210 culturas apresentaram crescimento para *P. aeruginosa* e *A. baumannii,* no total de 138 (65,7%) e 72 (34,3%), respectivamente. A proporção de *P. aeruginosa* resistente a imipenem correspondeu a 40,6% e para *A. baumannii,* 26,4%. Os testes de disco aproximação e disco combinado para detecção de MβL revelaram positividade para 18 (38,3%) amostras de *P. aeruginosa* e 1 (5,6%) de *A. baumannii.* A porcentagem de *P. aeruginosa* produtora e não-produtora de MβL, diferiram estatisticamente dependendo do tipo de amostra clínica em que o microorganismo foi isolado (p= 0,0014). Cepas de *P. aeruginosa* resistente a imipenem MβL positivas foram encontrados com maior freqüência na UTI, com o total de 15 isolados (83,3%). A única cepa de *A. baumannii* produtora de MβL foi isolada da UTI. Comparando-se o perfil de resistência frente aos antimicrobianos das amostras produtoras e não-produtoras de MβL, observa-se que as primeiras apresentaram maior índice de resistência. Todos os isolados apresentaram sensibilidade para polimixina. Detectou-se através de métodos fenotípicos a presença de MβL em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem em dois hospitais estudados.

Palavras-chave: Metalo-β-lactamases. Resistência a imipenem. Bacilos gram-negativos não fermentadores.

ABSTRACT

The metalo-β-lactamases (MβL) detection in nonfermentative gram-negative bacilli has become important in the last years, not only by their major role in severe infectious conditions but because of their selected resistance to antimicrobial drugs as well. This study is aimed at phenotypically detect MβL on the isolated *P. aeruginosa* and *A. baumannii* resistant to imipenem in three hospitals from São luís, state of Maranhão. Check the *P. aeruginosa* and *A. baumannii* imipenem resistant percentage on the researched hospitals; determine the positive frequency on the MβL samples; correlate the positive MβL strains to the hospitals, clinical samples and hospital areas which they came from and compare the resistance profile of MβL producer samples to the non-producer ones. From June to November 2008, 138 *P. aeruginosa* and 72 *A. baumannii* strains were analyzed. From these samples, 56 of *P. aeruginosa* and 19 of *A. baumannii* were sorted for MβL phenotypical detection test. For the susceptibility to antimicrobial, the Kirby-Bauer method was used. The phenotypical detection of the MβL producer samples were carried out through disk approximation and combined disk techniques. On the studied period, 210 cultures presented *P. aeruginosa* and *A. baumannii* growth, in a total of 138 (65.7%) and 72 (34.3%), respectively. The amount of *P. aeruginosa* cultures resistant to imipenem was 56 (40.6%) and regarding *A. baumannii* was, 19 (26.4%). The approximation disk and combined disk tests for MβL detection have revealed positive results for 18 (38.3%) *P. aeruginosa* samples and 1 (5.6%) for the *A. baumannii*. The MβL non producer and producer percentage on the *P. aeruginosa* statistically differs depending on the clinical in which the microorganism was isolated (p= 0,0014). The MβL positive *P. aeruginosa* imipenem resistant were found with a higher frequency on ICU, 15 samples in total (83.3%) The only MβL producer *A. baumannii* strain was isolated from an ICU. Comparing the resistance profile regarding the antimicrobial on the MβL producer and non producer samples, it was observed more resistance rates on the first ones. All the isolated presented sensibility to polymyxin. It was detected through phenotypical methods the MβL presence in *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolated and imipenem resistant in two of the studied hospitals.

Keywords: Metalo-β-lactamases. Imipenem resistance. Nonfermentative gram-negative bacilli.

SUMÁRIO

RESUMO ..... *iv*
ABSTRACT ..... *vi*
LISTA DE SIGLAS ..... *ix*
LISTA DE TABELAS ..... *x*
LISTA DE FIGURAS ..... *xi*

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 9
2.1 Geral 9
2.2 Específicos 9

3 CAPÍTULO I – Detecção fenotípica de metalo-β-lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em hospitais de São Luís-MA 10

4 CONCLUSÕES 27

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 28

REFERÊNCIAS 29

ANEXO A – informações para os autores da Revista *Infection Control and Hospital Epidemiology* 32

LISTA DE SIGLAS

2-MPA	–	Ácido 2-mercaptopropiônico
ATCC	–	*American Type Culture Collection*
CAZ	–	Ceftazidima
CCIH	–	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CLSI	–	*Clinical and Laboratorial Standards Institute*
EDTA	–	Ácido Etilenodiaminotetracético
GIM	–	German imipenemase
IMP	–	Imipenemase
IRAS	–	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
LBA	–	Lavado Brônquico Alveolar
MA	–	Maranhão
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
MβL	–	Metalo-β-Lactamases
SIM	–	Seoul imipenemase
SPM	–	São Paulo Metalo-β-Lactamases
UTI	–	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	–	Verona Imipenemase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Freqüência de isolamento de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem conforme amostra clínica e hospitais de origem no período de Junho a Novembro de 2008 em São Luís-MA 15

Tabela 2 – Percentual de resistência de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* para imipenem em três hospitais, no período de Junho a Novembro de 2008 em São Luís-MA 16

Tabela 3 – Teste do qui-quadrado de indepedência das amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por hospital no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA 17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Percentual de amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por hospital no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA..... 17

Figura 2 – Percentual de amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por amostra clínica no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA..... 18

Figura 3 – Percentual de amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por setores hospitalares de origem no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA. 19

Figura 4 – Percentual de resistência aos antimicrobianos de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA..... 20

1 INTRODUÇÃO

Metalo-β-Lactamases (MβL) são enzimas pertencentes à classe B da classificação molecular de β-Lactamases de AMBLER, ou à classe 3 da classificação funcional de Bush (YANO *et al*., 2001). Seu espectro de ação é bastante amplo, hidrolisando penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas com ação limitada para hidrolisar o aztreonam (QUEENAM; BUSH, 2007). Estas necessitam de íons zinco para catalisar a hidrólise dos antibióticos β-Lactamâmicos e não possuem homologia na seqüência e estrutura química com as Serino-β-Lactamases, portanto não sofrem a ação dos inibidores disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (PAGE; BADARAU, 2008). O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ou compostos derivados do ácido tiolático (ácido mercaptopropiônico e ácido mercaptoacético) têm a capacidade de inibir as MβL, devido à sua ação quelante ao íon zinco e outros cátions divalentes (ARAKAWA et al. 2000; QUEENAM; BUSH, 2007)

A classificação funcional de Bush subdivide as MβL em três grupos, baseados no poder de hidrolisar o imipenem e outros β-Lactamâmicos. O grupo 3a possui um amplo poder de hidrolisar β-Lactâmicos, o grupo 3b possui uma alta afinidade para degradar carbapenêmicos e o grupo 3c hidrolisa fracamente carbapenêmicos quando comparados a outros β-Lactâmicos (WALSH *et al*., 2005).

As primeiras MβL detectadas e estudadas foram enzimas cromossomais presentes em bactérias ambientais e oportunistas tais como *Bacillus cereus, Stenotrophomonas maltophilia e Aeromonas* spp. Ao contrário das MβL cromossomais, cuja presença está diretamente relacionada com a prevalência da espécie produtora, as MβL adquiridas têm sido detectadas de forma dramaticamente crescente (QUEENAM; BUSH, 2007). A primeira descrição de uma MβL transferível ocorreu no Japão em 1991. Apesar de esta enzima ter sido caracterizada bioquimicamente, esta, não foi nomeada, nem seqüenciada (WATANABE *et al*., 1991). A IMP-1 foi formalmente descrita, de um isolado de *Serratia marcescens* isolado no Japão, também em 1991 (OSANO *et al*., 1994). A partir daí, diversas MβL foram descritas e identificadas. Atualmente se conhece cinco subclasses: IMP- imipenemase (WATANABE *et al*., 1991; OSANO *et al*., 1994), VIM- Verona imipenemase (LAURETTI *et al*., 1999), SPM- São Paulo-metalo-β-Lactamases

(TOLEMAN *et al*., 2002), GIM- German imipenemase (CASTANHEIRA *et al*., 2004) e SIM- Seoul imipenemase (LEE *et al*., 2005).

Durante anos, acreditou-se que bactérias produtoras de IMP estavam restritas ao Japão. Isto mudou após a descoberta de IMP-2 (1997) e IMP-5 (1998) isoladas de *Acinetobacter baumannii*, na Itália e Portugal, respectivamente. (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008). Atualmente, a família IMP está completamente disseminada por vários microorganismos e pelo mundo, e é composta por 24 variantes pertencentes a esta subclasse (LAHEY CLINIC, 2009).

VIM é o segundo grupo dominante, também conhecido como MβL européia, devido a sua alta prevalência nos países europeus (BERTONCHELI *et al*., 2008 apud WALSH *et al*., 2005). Foi primeiramente descrita em Verona na Itália, em 1997 (LAURETTI *et al*., 1999). Atualmente, são conhecidas 22 variantes identificadas de diversos microorganismos em vários países pelo mundo, e a VIM-2 é a predominante entre as MβL do tipo VIM (LAHEY CLINIC, 2009).

No Brasil em São Paulo, ocorreu o primeiro relato de uma nova integrante da família de metalo- β-lactamases adquiridas, a SPM (São Paulo metalo-β-lactamases). Esta foi isolada, a partir de uma amostra de urina de um paciente com leucemia linfoblástica aguda, no complexo do hospital São Paulo, em São Paulo, em 2001. Essa MβL foi denominada de SPM-1, e apesar de descrita somente em *Pseudomonas aeruginosa,* e em várias regiões brasileiras, não há relatos de SPM-1 em outros países (TOLEMAN *et al*., 2002).

A quarta subclasse de MβL adquirida foi descrita em Dusseldorf na Alemanha, isolada de cinco amostras do trato respiratório de diferentes pacientes, em 2002. Esta foi denominada de GIM (German imipenemase), sendo o único relato desta enzima até o presente momento (CASTANHEIRA *et al*., 2004).

Por último, a quinta subclasse de MβL foi encontrada em Seoul, na Coréia em isolados de *A. baumannii* de pacientes internados com infecção urinária e pneumonia, em 2003 e 2004. Denominada de SIM-1, esta também está confinada ao país onde foi descoberta, possui concentração inibitória mínima (CIM) baixa para imipenem e meropenem, e é o subtipo de MβL mais relacionada geneticamente com a IMP (LEE *et al*., 2005).

As MβL adquiridas representam a maior ameaça aos antibióticos β-lactamâmicos de utilidade clínica, pois representam a enzima de resistência mais temida devido à sua capacidade de hidrolisar virtualmente todos os antibióticos da classe, inclusive os carbapenêmicos que têm sido reservados para o tratamento das infecções mais graves ou provocadas por microorganismos conhecidamente resistentes às penicilinas e cefalosporinas mais avançadas (WALSH, 2005).

Mundialmente, a susceptibilidade aos carbapenêmicos é de 98% no grupo das enterobactérias, enquanto a susceptibilidade ao imipenem encontra-se entre 60 e 83% para *P. aeruginosa* e *A. baumannii,* segundo levantamentos de 2004 a 2005 (QUEENAM; BUSH, 2007). A emergência de metalo- β-lactamases adquiridas entre os mais importantes patógenos gram-negativos (*P. aeruginosa, A. baumannii* e enterobactérias) têm sérias implicações clínicas e epidemiológicas gerando uma crescente preocupação entre a comunidade científica mundial. O rápido alastramento, o aumento na diversidade e no número de espécies envolvidas, não tem sido acompanhado pela acurácia e padronização de métodos de detecção, conhecimento epidemiológico e um claro entendimento de como a produção de MβL implica em termos de impacto clínico, controle de infecção hospitalar e terapia antimicrobiana (CORNAGLIA *et al*., 2007).

Na América do Sul, as MβL predominantes são a SPM e família VIM. O estudo SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), avaliou 183 isolados de *P. aeruginosa* das quais 82 (44,8%) foram resistentes ao imipenem, e 36 (43,9%) isolados, destes, eram produtores de MβL. A maioria era produtora de SPM-1 20 (55,6%), acompanhado por VIM-2 11 (30,6%), e IMP-1 em três isolados (8,3%). Enquanto SPM-1 está confinada ao Brasil, VIM-2 e VIM-8, têm sido descritas na Argentina, Chile, Venezuela e Colômbia, sendo produzidas por *P. aeruginosa.* Nos Estados Unidos e Canadá, MβL das famílias IMP e VIM têm sido descritas. Em 2001, uma amostra produtora de VIM-7 foi isolada no Texas, e mais recentemente uma produtora de VIM-2. Em Chicago, um surto provocado por um clone de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2, envolvendo 17 pacientes entre 2002 e 2004, foi descrito. Surtos de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2 e IMP-7 no Canadá, e um isolado produtor de IMP-18 da mesma bactéria no sudoeste dos Estados Unidos, têm sido descritos (QUEENAM; BUSH, 2007).

No Brasil, segundo dados do SENTRY, 44,8% dos isolados de *P. aeruginosa* são resistentes a imipenem e destes, 43,9% são produtores de MβL (FRITSCHE *et al*., 2005). Um estudo realizado no Hospital São Paulo (São Paulo, Brasil) com 7705 isolados bacterianos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* entre os anos de 1997 e 2003, encontrou 59,6% e 40,4% de resistência aos carbapenêmicos (FURTADO et al., 2006). Gales *et al*. (2003) descreveram amostras produtoras de SPM-1 em diversas cidades brasileiras, tais como, São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Londrina, Brasília, Santo André, Fortaleza, Maringá e Curitiba. Em Recife, Pernambuco, 15 amostras dentre 24 avaliadas, foram produtoras de MβL do tipo SPM-1 (MAGALHÃES V.; LINS; MAGALHÃES M., 2005). No Sul do país, mais especificamente em três hospitais de Porto Alegre, um estudo realizado com 60 isolados de *P. aeruginosa,* encontrou 49 (81,7%) produtoras de SPM-1 e IMP-1 (GASPARETO *et al*., 2007). O primeiro isolado no Brasil e na América Latina, de uma *Klebsiella pneumoniae* produtora de MβL do tipo IMP-1*,* ocorreu em 2005 (LINCOPAN *et al*., 2005). Todas as amostras de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos do período de Janeiro de 1993 a Dezembro de 2001, isoladas no Hospital São Paulo, foram testadas para produção de MβL. Do total de 73 isolados, 40 (55%) foram positivas para MBL do tipo IMP-1. Nenhum isolado de *A. baumannii* do tipo SPM ou VIM foi encontrado. A prevalência de *A. baumannii* produtor de IMP-1, entre os resistentes aos carbapenêmicos, cresceu de 0% no período de 1993 a 1997, para 29% em 1998, alcançando 100% entre 1999 e 2001 (TOGNIM *et al*., 2006).

O Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY, detectou um significativo aumento no número de ocorrência e de tipos de MβL entre os anos de 2003 e 2005, e conseqüentemente um aumento na resistência aos carbapenêmicos atribuída a qualquer tipo de mecanismo foi observado na Ásia do lado do Pacífico, na América Latina e na Europa. O rápido alastramento destas, o aparecimento de novos tipos e de novas espécies portadoras não tem acompanhado a padronização e acurácia dos métodos de detecção, nem o conhecimento epidemiológico do que as metalo- β-lactamases significam em termos de impacto clínico, controle de infecção hospitalar e quimioterapia antimicrobiana (CORNAGLIA *et al*., 2007; FRITSCHE *et al*., 2005).

Devido à baixa prevalência das MβL nos Estados Unidos o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008) ainda não recomendou, nem padronizou

nenhum método rotineiro para a sua detecção, até o presente momento. A identificação do gene da MβL por técnicas de Biologia Molecular ou a medição espectrofotométrica da hidrólise dos carbapenêmicos, são os métodos padrão-ouro para detecção genotípica e fenotípica da detecção de MβL, respectivamente. Porém, estas técnicas são trabalhosas, necessitando de técnicos treinados e equipamentos especiais, que somando ao elevado custo inviabiliza a detecção pela maioria dos laboratórios (PICÃO *et al*., 2008).

Um grande número de métodos baseados na difusão ou diluição de antibióticos para a detecção fenotípica de MβL foi descrito a partir de Arakawa *et al*. (2000), baseados na propriedade das MβL de serem inibidas por agentes quelantes do zinco, tais como o EDTA ou derivados dos Tióis (CORNAGLIA *et al*., 2007; BERGÈS *et al*., 2007; PICÃO *et al*., 2008). Entre as metodologias fenotípicas desenvolvidas, o teste de disco-aproximação pode apresentar boa sensibilidade e especificidade, variando de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato e o agente quelante utilizados. No estudo de Arakawa *et al*. (2000), foram utilizados como inibidores de metalo- β-lactamases, o $CuCl_2$, $FeCl_2$, EDTA, e os derivados dos Tióis, o ácido mercaptoacético, o mercaptoetanol e o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). Este último apresentou a melhor sensibilidade (100%), utilizando a ceftazidima como substrato. Em um estudo posterior realizado por Lee *et al*. (2003), o ácido mercaptoacético apresentou melhor sensibilidade (100%) na detecção de amostras de *A. baumannii* produtoras de metalo- β-lactamases, mas esse inibidor falhou na detecção de 10,5% das amostras de *Pseudomonas* spp., em contrapartida o EDTA detectou 100% das amostras de *Pseudomonas* spp., mas falhou em 6% das amostras de *A. baumannii*

Picão et al. (2008), avaliaram a acurácia dos testes de disco aproximação e disco combinado, e as modificações dos mesmos para a detecção fenotípica de MβL em bacilos gram-negativos de diferentes gêneros e produtoras de tipos variados de MβL. Os autores concluíram que o teste de disco aproximação, utilizando 2-MPA como inibidor de MβL a 2,0 cm de distância de um disco de ceftazidima e imipenem, respectivamente, constitui um bom método para detecção das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* produtoras de MBL, podendo ser recomendado para a triagem em amostras clínicas.

Na presença de *Pseudomonas* spp., *A. baumannii*, e enterobactérias, resistentes aos carbapenêmicos, os testes fenotípicos para detecção de MβL seriam importantes para se ter conhecimento da prevalência de amostras produtoras de metalo- β-lactamases, e para que uma vez detectado um microorganismo deste tipo, os membros da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) possam atuar implementando ações com o intuito de prevenir a disseminação desses determinantes de resistência, já que estes estão contidos em estruturas genéticas que propiciam uma mobilidade muito efetiva. Apesar da prevalência hospitalar destes microorganismos ainda ser desconhecida, esses isolados têm sido responsáveis por surtos de infecção hospitalar em diferentes partes do mundo e vêm causando infecções graves como septicemias e pneumonias que estão associadas a falhas na terapia com carbapenêmicos (PITOUT *et al*., 2005; MENDES *et al*., 2006; MARRA *et al*., 2006).

O aumento na disseminação e diversidade de MβL tem limitado severamente as opções terapêuticas em três continentes: Ásia, Europa e América do Sul, resultando no uso de combinações de agentes antimicrobianos, na tentativa de alcançar um sinergismo entre drogas que seriam a princípio ineficazes, ou utilizando drogas mais tóxicas como a polimixina B e a celestina. Devido à prevalência de cor resistência, isolados produtores de MβL são resistentes a todas as outras opções de tratamento, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de potentes agentes terapêuticos com novos mecanismos de ação. Infelizmente, existem poucos candidatos a novos agentes antimicrobianos contra gram-negativos em estudo, devido ao desinteresse da indústria farmacêutica que prevê queda nos lucros do mercado de antibióticos (FRITSCHE *et al*., 2005).

Devido ao amplo espectro de ação das MβL, as bactérias produtoras destas enzimas têm se tornado um desafio aos clínicos no que concerne ao tratamento de pacientes infectados pelas mesmas. O crescente aumento dos subtipos de MβL e de espécies produtoras destas enzimas, tem limitado as opções de tratamento de infecções causadas por estas bactérias. Associações de dois ou mais tipos de antimicrobianos têm sido tentadas, com a intenção de se obter sinergismo de mecanismo de ação, já que o uso isolado das drogas seria ineficaz. Algumas opções terapêuticas antigas, como as polimixinas têm voltado a ter utilidade clínica, mesmo sabendo-se da toxicidade destas. Estudos em modelos animais de pneumonia

provocadas por microorganismos produtores de VIM-2, demonstraram que o tratamento com aztreonam em altas doses pode ser útil. No entanto, nesse mesmo estudo, o uso de carbapenêmicos manteve alguma atividade antimicrobiana, porém a sua utilidade clínica permanece duvidosa (WALSH, 2005; WALSH *et al*., 2005).

Além do amplo espectro de substratos em que as MβL podem agir, é comum o encontro de genes de MβL localizados em plasmídeos com genes codificadores de determinantes de resistência a outros antibióticos, como por exemplo, os genes de resistência aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas. Desta forma, estes microorganismos são resistentes aos β-lactâmicos, aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas. No entanto, estes permanecem susceptíveis às polimixinas. O amplo espectro de resistência provocado pelas bactérias produtoras de MβL, demonstram a necessidade do desenvolvimento de novos e mais potentes fármacos, inclusive com novos mecanismos de ação (WALSH, 2005; WALSH *et al*., 2005).

A terapêutica ideal para as infecções causadas por microorganismos produtores de MβL permanece desconhecida. A detecção de microorganismos MβL positivos, além de útil do ponto de vista epidemiológico, no sentido de se adotar medidas preventivas de disseminação desses genes de resistência e modificações no uso de antibióticos, é útil para contra-indicar o uso de carbapenêmicos em infecções causadas por este tipo de bactérias. O conhecimento dos mecanismos de co-resistência, também deve ser levado em consideração, quanto à utilidade antimicrobiana dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, já que os genes de resistência estão muitas vezes associados em microorganismos MβL positivos. A terapêutica ideal para as infecções causadas por microorganismos produtores de MβL permanece desconhecida, porém o uso de polimixinas têm se mostrado eficaz no tratamento de bactérias gram-negativas multirresistentes. A crescente necessidade da utilização das polimixinas, no tratamento de bactérias multirresistentes, tem demonstrado que estas drogas não são tão tóxicas quanto se acreditava no passado. No entanto, deve-se evitar a monoterapia com polimixinas, sendo o ideal, determinar rapidamente a CIM de um aminoglicosídeo e associá-lo ao tratamento. A rifampicina pode ser uma opção interessante no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes (WALSH, 2005; WALSH *et al*., 2005).

É inegável que o emprego dos antimicrobianos revolucionou o tratamento das infecções, e o seu sucesso veio desencadear uma sensação otimista em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. No entanto, o uso exagerado e pouco criterioso dos antibióticos e quimioterápicos gerou graves problemas, e entre eles, mencionamos a progressiva resistência bacteriana às drogas.

Os bacilos gram-negativos não-fermentadores vêm ganhando importância nos últimos anos, não só pela maior freqüência de sua participação como agentes de quadros infecciosos graves, como também pela selecionada resistência aos antimicrobianos. Considerando a alta prevalência de bactérias gram-negativas com índice de resistência elevado, é essencial que tenhamos conhecimento dos mecanismos envolvidos neste processo, pois sabemos que a resistência bacteriana aos antimicrobianos eleva os índices de morbi-mortalidade dos pacientes com infecções adquiridas na comunidade e, principalmente, daqueles que adquirem infecções hospitalares, hodiernamente denominadas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Detectar fenotipicamente MβL em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem em três hospitais de São Luís-MA.

2.2 Específicos

- Determinar a proporção de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem nos hospitais pesquisados.
- Determinar a freqüência de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* produtoras de metalo-β-lactamases.
- Correlacionar as amostras MβL positivas com os espécimes clínicos e setores hospitalares de origem.
- Comparar o perfil de resistência das amostras produtoras de MβL com as amostras não produtoras.

3 CAPÍTULO I

DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-β-LACTAMASES EM *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter baumannii* EM HOSPITAIS DE SÃO LUÍS-MA

Roberto M. L. Carvalho, MD; Sirlei G. Marques, MD; Luís Henrique Bastos Gonçalves, MD; Silvio Gomes Monteiro, PhD; Azizedite G. Gonçalves, PhD.

Objetivo: Detectar fenotipicamente metalo-β-lactamases (MβL) em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem em três hospitais de São Luís-MA.

Amostra. 138 cepas de *P. aeruginosa* e 72 de *A. baumannii* isoladas no período de Junho a Novembro de 2008.

Local. Três hospitais de São Luís-MA.

Métodos. Todos os isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem foram testados para avaliação da produção de MβL pelos métodos fenotípicos de disco aproximação e disco combinado. O perfil de susceptibilidade foi determinado pelo método de Kirby-Bauer.

Resultados. No período estudado, 210 culturas apresentaram crescimento para *P. aeruginosa* e *A. baumannii,* no total de 138 (65,7%) e 72 (34,3%), respectivamente. A proporção de *P. aeruginosa* resistente a imipenem correspondeu a 56 (40,6%) e para *A. baumannii,* 19 (26,4%). Os testes de disco aproximação e disco combinado para detecção de MβL revelaram positividade para 18 (38,3%) amostras de *P. aeruginosa* e 1 (5,6%) de *A. baumannii.* A porcentagem de *P. aeruginosa* produtora e não-produtora de MβL, diferiu estatisticamente dependendo do tipo de amostra clínica em que o microorganismo foi isolado (p= 0,0014). Amostras de *P. aeruginosa* resistente a imipenem MβL positivas foram encontrados com maior freqüência na

UTI, com o total de 15 amostras (83,3%). A única cepa de *A. baumannii* produtora de MβL foi isolada da UTI. Comparando-se o perfil de resistência frente aos antimicrobianos das amostras produtoras e não-produtoras de MβL, observou-se que as primeiras apresentaram maior índice de resistência.

Conclusão. Detectou-se através de métodos fenotípicos a presença de MβL em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem em dois hospitais estudados.

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Maranhão; Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão; Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA); Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão; Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão.

Metalo-β-Lactamases (MβL) são enzimas pertencentes à classe B da classificação molecular de β-Lactamases de AMBLER, ou à classe 3 da classificação funcional de Bush[1]. Seu espectro de ação é bastante amplo, hidrolisando penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas com ação limitada para hidrolisar o aztreonam[2]. Estas necessitam de íons zinco para catalisar a hidrólise dos antibióticos β-Lactamâmicos e não possuem homologia na seqüência e estrutura química com as Serino-β-Lactamases, portanto não sofrem a ação dos inibidores disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam[3]. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ou compostos derivados do ácido tiolático (ácido mercaptopropiônico e ácido mercaptoacético) têm a capacidade de inibir as MβL, devido à sua ação quelante ao íon zinco e outros cátions divalentes[2,4].

As primeiras MβL detectadas e estudadas foram enzimas cromossomais presentes em bactérias ambientais e oportunistas tais como *Bacillus cereus, Stenotrophomonas maltophilia e Aeromonas* spp. Ao contrário das MβL cromossomais, cuja presença está diretamente relacionada com a prevalência da espécie produtora, as MβL adquiridas têm sido detectadas de forma dramaticamente crescente[2].

No Brasil, segundo dados do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), 44,8% dos isolados de *P. aeruginosa* são resistentes a imipenem e destes, 43,9% são produtores de MβL[5]. Um estudo realizado no Hospital São Paulo (São Paulo, Brasil) com 7705 isolados bacterianos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* entre os anos de 1997 e 2003, encontrou 59,6% e 40,4% respectivamente, de resistência aos carbapenêmicos[6]. Gales *et al*.[7] descreveram amostras produtoras de SPM-1 em diversas cidades brasileiras. Todas as amostras de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos do período de Janeiro de 1993 a Dezembro de 2001, isoladas no Hospital São Paulo, foram testadas para produção de MβL. Do total de 73 isolados, 40 (55%) foram positivas para MBL do tipo IMP-1. Nenhum isolado de *A. baumannii* do tipo SPM ou VIM foi encontrado. A prevalência de *A. baumannii* produtor de IMP-1, entre as resistentes aos carbapenêmicos, cresceu de 0% no período de 1993 a 1997, para 29% em 1998, alcançando 100% entre 1999 e 2001[8].

Este trabalho tem como objetivos detectar fenotipicamente MβL em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem em três hospitais de São Luís-

MA; verificar o percentual de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem nos hospitais pesquisados; determinar a freqüência de positividade de amostras produtoras de MβL; correlacionar as cepas MβL positivas com os hospitais, as amostras clínicas e os setores hospitalares de origem e comparar o perfil de resistência das amostras produtoras de MβL com as amostras não produtoras.

MÉTODOS

Isolados bacterianos

Foram analisadas 138 cepas consecutivas de *P. aeruginosa* e 72 de *A. baumannii* de 124 pacientes no período de 1º de Junho a 30 de Novembro de 2008. Destas, foram triadas 56 amostras de *P. aeruginosa* e 19 de *A. baumannii* para os testes de detecção fenotípica de MβL. Os isolados foram provenientes de três hospitais (dois privados e 1 público), denominados de Hosp 1, Hosp 2 (ambos privados) e Hosp 3 (público). Não foi possível realizar os testes de detecção fenotípica em 9 das 56 amostras de *P. aeruginosa* e em 1 das 19 cepas de *A. baumannii.*

Susceptibilidade antimicrobiana

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados conforme o método de difusão do disco (Kirby-Bauer), segundo as recomendações do *Clinical and Laboratorial Standards Institute* (CLSI)[9]. Foram testadas as seguintes drogas: amicacina (30µg), cefepima (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacin (5µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), levofloxacin (5µg), meropenem (10µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), tobramicina (10µg) e polimixina B (300 unidades). O aztreonam (30µg) foi testado somente para *P. aeruginosa* e ampicilina/sulbactam (10/10µg) para *A. baumannii*. Para o controle de qualidade empregou-se as cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) de *P. aeruginosa* 27853 e *Escherichia coli* 25922.

Detecção fenotípica das amostras produtoras de metalo-β-lactamases por disco aproximação

Este teste foi realizado de acordo com a técnica proposta por Arakawa *et al*.[4] com alterações nos volumes e concentrações dos inibidores. As suspensões bacterianas foram semeadas em placas de ágar *Müeller Hinton* de acordo com os critérios do CLSI[9] pelo método do disco difusão. Para o teste de detecção de MβL em *P.aeruginosa,* dois discos de ceftazidima (CAZ) (30 µg) (Oxoid®) foram utilizados como substrato e posicionados a 2,0 e 1,5 cm de distância centro a centro de dois discos sem impregnação (Cefar®). No primeiro disco, sem impregnação e com 2,0 cm de distância de CAZ, foi adicionado 4 µL de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (Sigma®) (1,4 mM), e no segundo, 4 µL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma®) (400 mM). O mesmo procedimento foi realizado para *A. baumannii* utilizando como substrato o imipenem (10 µg), e como inibidores, 4 µL de 2-MPA (1,4 mM) e 8 µL de EDTA (200 mM). As placas foram incubadas de 18 a 24 horas a 35ºC.

As amostras foram consideradas produtoras de MβL quando houve deformação no halo de inibição do crescimento bacteriano produzido pelo antimicrobiano, ou o aparecimento de zonas fantasmas entre os discos impregnados com inibidores de MβL e os β-lactâmicos.

Detecção fenotípica das amostras produtoras de metalo-β-lactamases por disco combinado

O teste do disco combinado foi realizado de acordo com a técnica descrita por Yong *et al*.[10]. As concentrações, volumes dos inibidores e pontos de corte foram utilizados segundo Picão *et al*.[11] para *P. aeruginosa*. As suspensões bacterianas foram semeadas em placas de ágar Müeller Hinton de acordo com os critérios do CLSI[9] para o método de disco difusão. Três discos de ceftazidima foram dispostos na superfície das placas de Mueller Hinton previamente inoculadas com a suspensão bacteriana de *P. aeruginosa.* Em um dos discos foi adicionado 8µL de 2-MPA (1,4 mM), no seguinte, 8µL de EDTA (100mM) e no terceiro disco não foi acrescentado o inibidor para que o diâmetro formado fosse avaliado na ausência do

mesmo. O mesmo procedimento foi feito para *A. baumannii* empregando-se a combinação imipenem (IPM)+2-MPA (4µL a 1,4 mM) e IMP+EDTA (4µL a 400mM). Em seguida, as placas foram incubadas a 35ºC por 18 a 24 horas e após este período o diâmetro do halo de inibição produzido pelos discos dos β-lactâmicos com os inibidores foram aferidos e comparados com o diâmetro do halo de inibição produzido pelo disco contendo somente o antimicrobiano. O resultado foi considerado positivo para a detecção de MβL em *P. aeruginosa* quando o aumento dos diâmetros produzidos pelos discos de EDTA+CAZ e 2-MPA+CAZ, em relação ao disco contendo somente o antimicrobiano, foram maiores que 8 e 14 mm, respectivamente. As amostras de *A. baumannii* foram consideradas positivas para produção de MβL quando ocorreu o aumento do diâmetro do halo de inibição acima de 4 mm para a combinação IPM+2-MPA e superior a 7 mm para IPM+EDTA, quando comparados com o disco de IPM.

Tanto nos testes de disco aproximação e disco combinado, os inibidores foram adicionados imediatamente após o posicionamento dos discos nas placas. Foram empregadas cepas controle de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, ambas as produtoras de IMP-1, sendo a primeira fornecida pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (LEMC) e a segunda pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Como controle negativo empregou-se uma cepa ATCC de *P. aeruginosa* 27853.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa *SPSS for Windows 16.0* (2007). Para verificar a relação das espécies de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* com as variáveis: Hospitais, setores hospitalares de origem e amostras clínicas, bem como, o resultado do teste de detecção fenotípica de MβL com as variáveis amostra clínica, setores hospitalares e o perfil de resistência, foi aplicado o teste de qui-quadrado de independência (χ^2). Em todos os testes o nível de significância aplicado foi de 5%, ou seja, foi considerado significante se $p < 0,05$.

Resultados

No período estudado, 210 culturas apresentaram crescimento para *P. aeruginosa* e *A. baumannii,* no total de 138 (65,7%) e 72 (34,3%), respectivamente. As bactérias foram provenientes de diversas amostras clínicas, distribuídas nos seguintes hospitais: 80 (38,1%) no Hosp 1; 64 (30,5%) no Hosp 2; e 66 (31,4 %) no Hosp 3. A distribuição das cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem de acordo com a amostra clínica e os hospitais de origem (Tabela 1).

Tabela 1 – Freqüência de isolamento de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem conforme amostra clínica e hospitais de origem no período de Junho a Novembro de 2008 em São Luís-MA

ORGANISMO	AMOSTRA CLÍNICA	Hosp 1 n (%)	Hosp 2 n (%)	Hosp 3 n (%)
P. aeruginosa	SANGUE	1 (5,3)	4 (17,5)	1 (7,1)
	URINA	4 (21,1)	-	4 (28,6)
	SECREÇÃO TRAQUEAL	6 (31,6)	16 (69,6)	4 (28,6)
	PONTA DE CATETER	4 (21,1)	-	3 (21,5)
	LAVADO BRONCO-ALVEOLAR	2 (10,5)	-	-
	LÍQUIDO PERITONEAL	-	-	1 (7,1)
	SECREÇÃO BILIAR	-	1 (4,3)	-
	SECREÇÃO NASAL	1 (5,2)	-	-
	LÍQUIDO DE LESÕES DE PELE BOLHOSAS	-	1 (4,3)	-
	ESCARA/FERIDA	1 (5,2)	1 (4,3)	1 (7,1)
TOTAL		19 (33,9)	23 (41,1)	14 (25,0)
A.baumannii	SANGUE	1 (12,5)	-	-
	URINA	1 (12,5)	-	1 (10,0)
	SECREÇÃO TRAQUEAL	3 (37,5)	1 (100,0)	7 (70,0)
	PONTA DE CATETER	1 (12,5)	-	2 (20,0)
	LAVADO BRONCO-ALVEOLAR	-	-	-
	LÍQUIDO PERITONEAL	1 (12,5)	-	-
	SECREÇÃO BILIAR	-	-	-
	SECREÇÃO NASAL	1 (12,5)	-	-
	LÍQUIDO DE LESÕES DE PELE BOLHOSAS	-	-	-
	ESCARA/FERIDA	-	-	-
TOTAL		8 (42,1)	1 (5,3)	10 (52,6)

Hosp 1= Hospital 1; Hosp 2= Hospital 2; Hosp 3= Hospital 3; n= número de isolados

A proporção de *P. aeruginosa* resistente a imipenem correspondeu a 56 (40,6%) e para *A. baumannii,* 19 (26,4%). Considerando o percentual de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem por hospital, observa-se que o hosp 3 apresentou o maior índice de resistência, correspondente a 14 (45,2%). Com relação ao *A. baumannii,* o maior percentual de resistência foi encontrado no hosp 1 (Tabela 2). A proporção de *A. baumannii* resistente, intermediário e sensível não difere

estatisticamente entre os três hospitais (p=0,361), no entanto a proporção de *P. aeruginosa* apresentou diferença significativa (p= 0,040) (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de resistência de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* para imipenem em três hospitais, no período de Junho a Novembro de 2008 em São Luís-MA

	A. baumannii Imipenem				*P. aeruginosa* Imipenem			
	Resistente	Intermediário	Sensível	Total	Resistente	Intermediário	Sensível	Total
Hosp 1	8 (30.8)	0 (0.0)	18 (69.2)	26 (36.1)	19 (35.2)	6 (11.1)	29 (53.7)	54 (39.1)
Hosp 2	1 (9.1)	0 (0.0)	10 (90.9)	11 (15.3)	23 (43.4)	0 (0.0)	30 (56.6)	53 (38.4)
Hosp 3	10 (28.6)	0 (0.0)	25 (71.4)	35 (48.6)	14 (45.2)	0 (0.0)	17 (54.8)	31 (22.5)
Total	19 (26.4)	0 (0.0)	53 (73.6)	72	56 (40.6)	6 (4.3)	76 (55.1)	138
χ^2		2.037				10.026		
p		0.361				0.040		

Hosp 1 = Hospital 1; Hosp 2 = Hospital 2; Hosp 3 = Hospital 3.

Os testes de detecção fenotípica para amostras bacterianas produtoras de MβL por disco aproximação e disco combinado revelaram positividade para 18 (38,3%) amostras de *P. aeruginosa* e 1 (5,6%) de *A. baumannii,* havendo uma correlação de 100% entre os métodos utilizados.

Correlacionando-se os hospitais com o isolamento de MβL positivas dentre as amostras resistentes a imipenem, as mesmas foram encontradas nos Hosp 1 e Hosp 3, nos percentuais de 63,2% e 66,7%, respectivamente. No hosp 2, não foi detectada a presença de amostras produtoras de MβL (Figura 1). A proporção de *P. aeruginosa* produtoras e não-produtoras de MβL difere estatisticamente entre os três hospitais (p < 0,0001) (Tabela 3). A única amostra de *A. baumannii* resistente a impenem MβL positiva foi proveniente do Hosp 1.

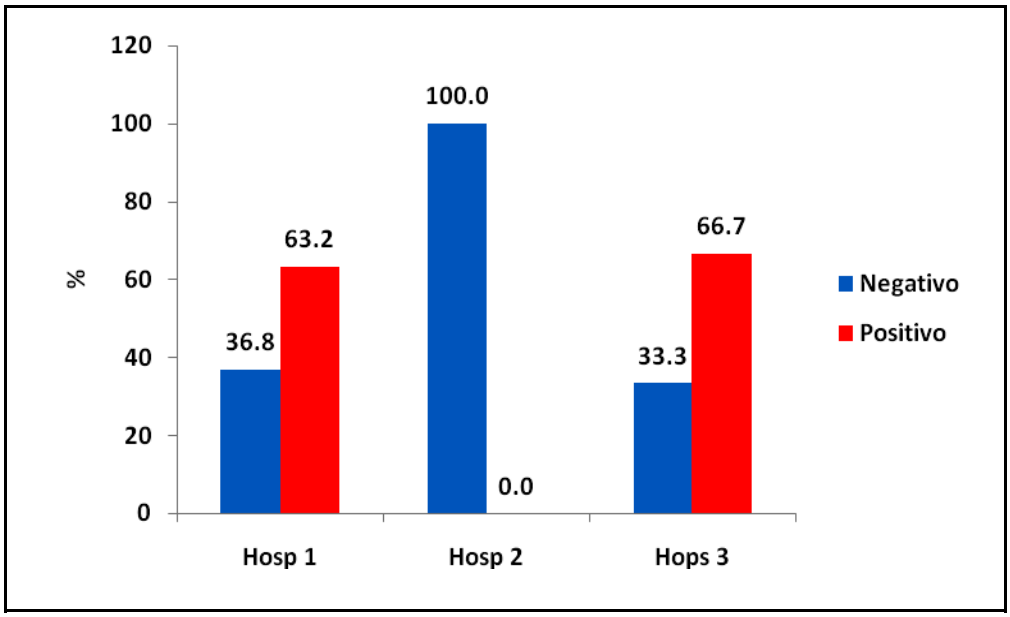

Figura 1 – Percentual de amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por hospital no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA

Tabela 3 – Teste do qui-quadrado de indepedência das amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por hospital no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA

	P. aeruginosa	
	χ^2	p
Hospital	19.827	< 0.0001
Setor	2.232	0.6932
Amostra clínica	27.008	0.0014
Amicacina	5.111	0.0777
Aztreonam	13.58	0.0011
Cefepima	6.923	0.0085
Ceftazidima	11.398	0.0007
Ciprofloxacina	6.418	0.0404
Gentamicina	1.988	0.3701
Meropenem	2.714	0.2575
Pipe/tazobactam	8.773	0.0031

No que diz respeito ao sítio de isolamento das amostras de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem e produtoras de MβL, 5 (27,8%) foram recuperadas de urina, 3 (16,7%) de secreção traqueal, 6 (33,3%) de ponta de cateter e 1 (5,6%) de

sangue, lavado brônquico alveolar (LBA), líquido peritoneal e secreção nasal (Figura 2). A porcentagem de *P. aeruginosa* produtora e não-produtora de MβL, difere estatisticamente dependendo do tipo de amostra clínica em que o microorganismo foi isolado (p= 0,0014) (Tabela 3). Apenas uma amostra de *A. baumannii* resistente a imipenem MβL positiva foi identificada no sangue.

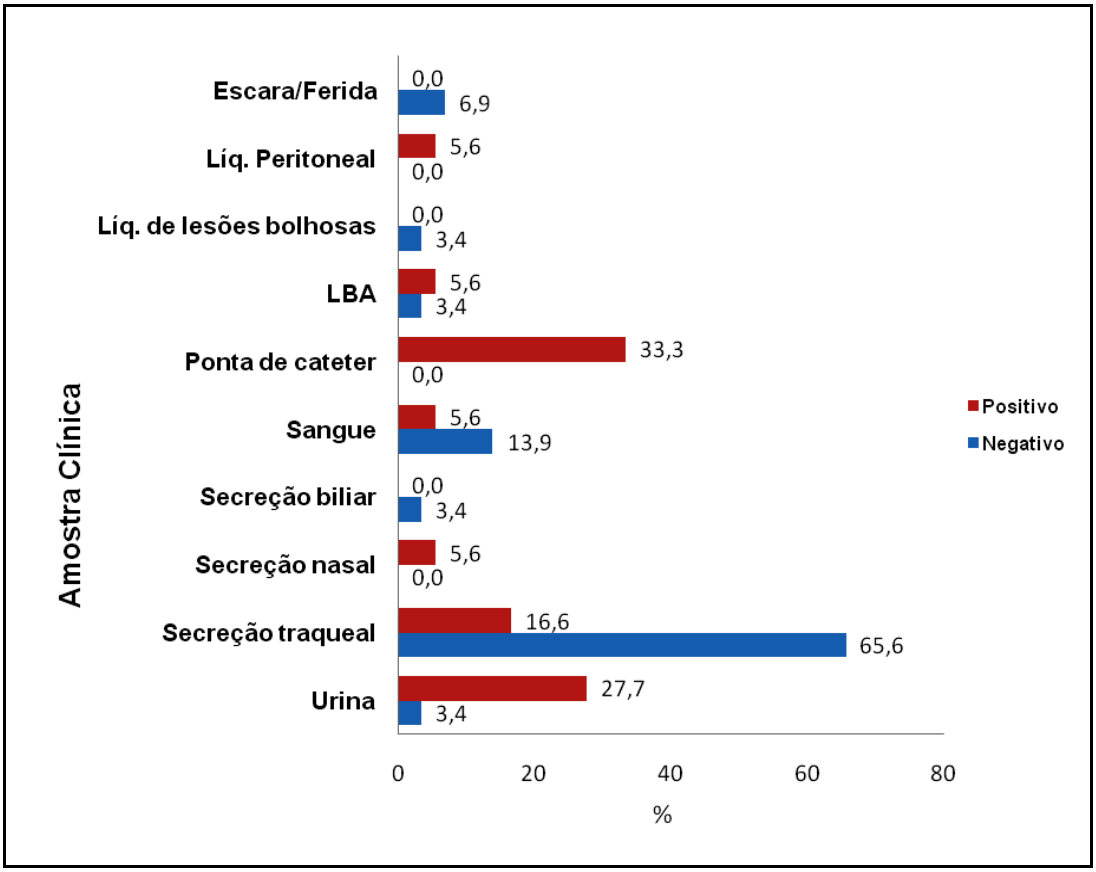

Figura 2 – Percentual de amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por amostra clínica no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA

Correlacionando-se os setores hospitalares de origem com o isolamento de *P. aeruginosa* resistente a imipenem MβL positiva e negativa, esta foi encontrada com maior freqüência na UTI, com o total de 15 amostras (83,3%). O percentual de *P. aeruginosa* positiva para MβL e resistente a imipenem nos hospitais hosp 1 e hosp 3 foi de 42,9% e 39,5% nos setores de clínica médica e UTI's, respectivamente (Figura 3). Não há diferença estatisticamente significante entre os setores hospitalares (clínica médica/cirúrgica e UTI), onde as cepas de *P. aeruginosa* MβL positivas e MβL negativas foram isoladas (p= 0,6932) (Tabela 3). A única cepa de *A. baumannii* produtora de MβL foi isolada da UTI.

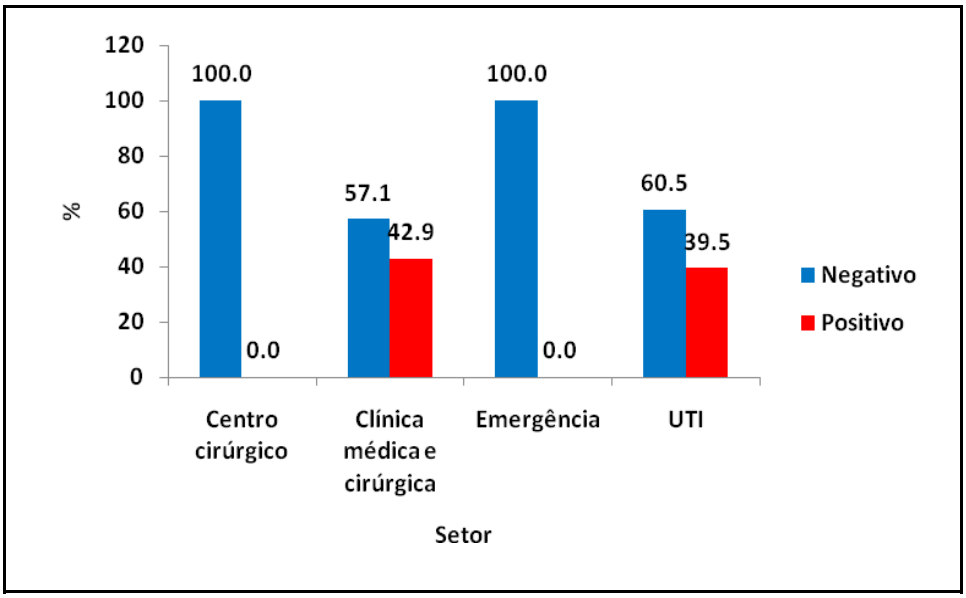

Figura 3 – Percentual de amostras de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas distribuídas por setores hospitalares de origem no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA

As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MβL, foram 100% resistentes para cefepima, ceftazidima, ciprofloxacina e meropenem, por outro lado, as cepas não-produtoras de MβL, mostraram percentual de resistência correspondente a 63,0%, 44,4%, 74,1% e 88,9%, respectivamente. Para aztreonam, *P. aeruginosa* MβL negativas, exibiram maior índice de resistência em relação às MβL positivas. Todas as amostras foram sensíveis para polimixina B (Figura 4). Comparando-se o perfil de resistência frente aos antimicrobianos das amostras produtoras e não-produtoras de MβL, observa-se que as primeiras apresentaram maior índice de resistência, com diferença estatisticamente significante para cefepima (p= 0,0085), ceftazidima (p= 0,0007), ciprofloxacino (p= 0,0404) e piperacilina/tazobactam (p= 0,0031). O aztreonam demonstrou diferença estatística demonstrando maior resistência para o grupo das *P. aeruginosa* não produtoras de MβL (p= 0,0011) (Tabela 3).

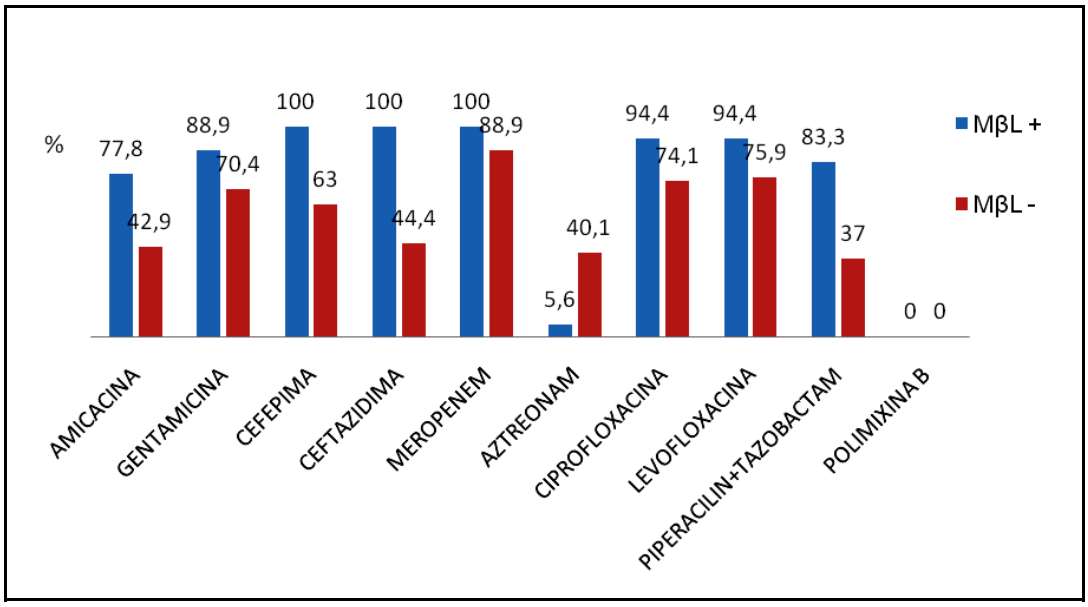

Figura 4 – Percentual de resistência aos antimicrobianos de *P. aeruginosa* MβL positivas e negativas no período de Junho a Novembro de 2008 em três hospitais de São Luís-MA

O único isolado de *A. baumannii* MβL positiva foi resistente para amicacina, gentamicina, cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem e ciprofloxacina e sensível para os demais antimicrobianos. Quanto ao perfil de resistência de *A. baumannii* MβL negativa, observou-se índice de resistência de 100% para imipenem, meropenem, ciprofloxacina e piperacilina/tazobactam. Para amicacina e gentamicina, o percentual de resistência foi de 61,5 e 76,9%, respectivamente. Quanto às cefalosporinas, o percentual de resistência foi 84,6% para cefepima e 53,8% para ceftazidima. Levofloxacina apresentou 69,2% de resistência, enquanto que o menor índice de resistência ocorreu para a ampicilina/sulbactam (23,1%). Todos os isolados foram sensíveis para polimixina B.

DISCUSSÃO

Foram avaliadas 47 cepas de *P. aeruginosa* e 18 de *A. baumannii,* resistentes a imipenem provenientes de diversas amostras biológicas. Os critérios de triagem dos microorganismos para detecção de MβL ainda não estão bem estabelecidos. Existem autores que selecionam bactérias gram-negativas resistentes à ceftazidima[4,12,13], enquanto outros optam pelos microorganismos resistentes para os carbapenêmicos[14]. Segundo Franklin; Liolios; Peleg[15], bactérias classificadas como

sensíveis pelos pontos de corte definidos pelo CLSI[9] podem também ser produtoras de MβL.

Os antimicrobianos β-lactâmicos (ceftazidima e imipenem) foram os substratos utilizados nesta pesquisa para detectar amostras produtoras de MβL, através das técnicas do disco aproximação e disco combinado, frente a dois inibidores de MβL (2-MPA e EDTA). Detectou-se 18 (40,0%) *P. aeruginosa* e 1 (7,1%) *A. baumannii* MβL positivas, ocorrendo uma correlação de 100% entre os testes realizados. Embora tenhamos conhecimento que os testes genotípicos sejam mais sensíveis e específicos para a detecção dessas enzimas, a literatura relata trabalhos que utilizaram testes de triagem que comparados com a *Polimerase chain reaction* (PCR), identificaram um percentual variável de resultados falso-positivos. Até o momento, o CLSI nem outros comitês internacionais apontam um teste para detecção de amostras produtoras de MβL[14].

O teste de disco aproximação pode apresentar boa sensibilidade e especificidade, no entanto os resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato, o agente quelante empregado e a experiência do observador em diferenciar o sinergismo verdadeiro da intersecção de zonas de inibição[16,17]. Para o teste de disco combinado, a principal vantagem é a maior objetividade na interpretação do resultado quando comparado ao teste de disco aproximação, sendo mais aplicável na rotina laboratorial. Porém, devido à volatilidade e toxicidade de alguns reagentes inibidores, a preparação do disco combinado pode causar resultados errôneos, assim como a falta de padronização do aumento do tamanho do halo de inibição que será adotado como ponto de corte[11].

P. aeruginosa e *A. baumannii* são patógenos oportunistas que vêm ganhando importância nos últimos anos, não só pela maior freqüência de sua participação como agentes de quadros infecciosos graves, como também, pela selecionada resistência aos antimicrobianos[18]. Surtos de infecção por *A. baumannii* têm sido freqüentes, principalmente entre os pacientes admitidos em UTI[8]. Quase todos os equipamentos, e materiais hospitalares, principalmente com componentes líquidos podem servir de reservatório para *P. aeruginosa,* incluindo equipamentos de ventilação assistida, fluidos de administração intravenosa e desinfetantes[19].

Quando comparamos o perfil de resistência frente aos antimicrobianos das amostras de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem produtoras e não-produtoras de

MβL, evidenciamos que as primeiras mostraram-se 100% resistentes para cefepima, ceftazidima, meropenem e 94% para ciprofloxacina (Figura 4). Pitout *et al*.[14] compararam o perfil de sensibilidade das amostras produtoras e não produtoras de MβL e verificaram que as cepas MβL positivas foram mais resistentes, com resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo, chamando a atenção para as amostras 100% resistentes para ciprofloxacino. Gales *et al*.[7] também evidenciaram alta proporção de resistência para as fluoroquinolonas em amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de SPM, procedentes de vários estados brasileiros.

O perfil de resistência de amicacina e gentamicina foi de 77,8 e 88,9%, respectivamente, para *P. aeruginosa* (Figura 4). Em integrons de classe 1, já foi observada a disseminação de genes de MβL juntamente com outros determinantes de resistência, entre eles, genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Genes de MβL que tiveram seu conteúdo pesquisado, apresentavam-se associados a um ou mais genes de resistência aos aminoglicosídeos esclarecendo em parte os casos de multirresistência em *P. aeruginosa*[16].

Embora haja relatos na literatura que os microorganismos produtores de MβL hidrolisam todos os β-lactâmicos disponíveis comercialmente, sendo a única exceção o monobactam aztreonam[16,17] identificamos um isolado resistente para aztreonam e três com perfil intermediário com teste positivo para MβL. Cipriano[20] relatou que surpreendentemente 92,6% das cepas de *P. aeruginosa* eram resistentes para aztreonam e pertenciam ao clone SPM, no entanto, a maioria dos clones de outras regiões do Brasil é sensível a este antibiótico. Martins[21] encontrou 3 amostras que foram resistentes para aos β-lactâmicos e intermediário para aztreonam no sul do país. É provável que estejamos diante do mesmo clone relatado por Cipriano[20], já que a nossa pesquisa foi realizada na mesma cidade, porém em período distinto de investigação. Portanto, seria importante a realização de técnicas de Biologia Molecular para confirmarmos este achado.

Usualmente, isolados de *P. aeruginosa* demonstram resistência para agentes β-lactâmicos seguido de hiper produção de β-lactamase Amp-C. Em adição, bomba de efluxo e alterações na permeabilidade de membrana externa podem exercer papel importante limitando o acesso do antimicrobiano ao alvo intracelular[22].

Possivelmente estes mecanismos de resistência desenvolvidos por *P. aeruginosa* poderiam explicar a elevada resistência das cepas não produtoras de MβL identificadas no nosso trabalho.

Para *A. baumannii* também observamos elevado índice de resistência para as drogas testadas. Segundo Tognim *et al*.[8] o imipenem é 2 a 4 vezes mais potente do que meropenem quando testado para *Acinetobacter* spp. De acordo com estes autores os isolados de *Acinetobacter* spp. foram resistentes para meropenem e sensíveis para imipenem, porém com elevada CIM (4µg/mL). As espécies de *A. baumannii* isoladas em nosso estudo apresentaram 100% de resistência para os dois antibióticos.

A emergência da resistência aos carbapenêmicos tem limitado as opções terapêuticas para o tratamento de *A. baumannii,* às polimixinas e à ampicilina-sulbactam[8]. Todas as cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* avaliadas em nosso estudo apresentaram-se sensíveis para polimixina B. A maioria dos microorganismos continua sensível às polimixinas, porém já foram identificados 5 isolados de *A. baumannii* resistentes à polimixina B no complexo hospitalar São Paulo em 2003[17]. Tognim *et al*.[8] encontraram 2 isolados desse microorganismo, resistentes a colistina (polimixina E). Estudos recentes vêm demonstrando a eficácia das polimixinas para o tratamento das infecções causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes que apresentam sensibilidade somente para este antimicrobiano, além disso, os achados apontam que as polimixinas não são tão tóxicas quanto se acreditava no passado[23,24]. Nosso estudo demonstrou que 23,1% de *A. baumannii* foram resistentes para ampicilina/sulbactam, dados que são semelhantes aos encontrados por Tognim *et al*.[8], quando verificaram uma resistência de 26%.

É alarmante a crescente capacidade de disseminação de resistência das *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Os estudos apontam que os antibióticos disponíveis comercialmente vêm se tornando escassos no combate a estes microorganismos. O registro de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* produtoras de MβL nesta pesquisa, representa uma séria ameaça tendo em vista que os genes codificadores de MβL também codificam resistência para outras classes de antimicrobianos e encontram-se situados em elementos genéticos móveis proporcionando rápida disseminação. É de extrema importância que medidas de

controle às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) sejam implementadas, estudos clínico-epidemiológicos sejam desenvolvidos, assim como, o laboratório de microbiologia clínica utilize técnicas de detecção fenotípica que apresentem praticidade de execução, baixo custo e fácil interpretação. Acreditamos que essas medidas contribuirão para prevenir a disseminação deste tipo de resistência bacteriana e auxiliem no serviço de orientação da terapia antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

1. Yano H, Kuga A, Okamoto R, *et al*. Plasmid-encoded metallo-β-lactamases (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1343-1348.

2. Queenam AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20: 440-458.

3. Page MI, Badarau A. The Mechanisms of catalysis by metallo-β-lactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2008; Volume 2008: Article ID 576297, 14p.

4. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, *et al*. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 38: 40-43.

5. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, *et al*. Emerging metallo-β-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clinical infectious Diseases* 2005; 41:276-278.

6. Furtado GHC, Martins ST, Machado AMO, *et al*. Clinical Culture Surveillance of Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter Species in a Teaching Hospital in São Paulo, Brazil: A 7 Year Study. Infection Control and Hospital Epidemiology 2006; 27: 1270-1273.

7. Gales AC, Meneses LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-ß-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52: 699-702.

8. Tognim MCB, Gales AC, Penteado AP, *et al*. Dissemination of IMP-1 metallo-b-lactamase–producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2006; 27: 742-747.

9. CLINICAL LABORATORY AND STANDARD INSTITUTE (CLSI). *M100-S18 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;* 18th Informational Supplement. 2008.

10. Yong D, Lee K, Yum JH, *et al*. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* ssp. and *Acinetobacter* ssp. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 3.798-3.801.

11. Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, *et al*. Metallo-β-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disktests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 2.028-2.037.

12. Lee K, Lim YS, Yong D, *et al*. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter spp. Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 4623- 4629.

13. Pelegrino FL, Teixeira LM, Carvalho MGS, *et al*. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 2420-2424.

14. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, *et al*. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metalo-β-lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 3129-3135.

15. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 3139-3144.

16. Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metalo-b-lactamases. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006; 42: 103-113.

17. Bertoncheli CM, Hörner R. Uma revisão sobre metalo-β-lactamases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 44: out/dez.

18. Quinn JP. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis*, v. 27, supll. 1, p.117-124, 1998.

19. Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AN, *et al*. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O: 11. J. *Clinical Microbiology*, v. 36, n.4, p. 897-901, 1998.

20. Cipriano R, Vieira VV, Fonseca EL, *et al*. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa,* including the blaSPM clone, spread in hospital in a Brasilian Amazon City. *Microb Drug Resist*, 2007; 13:142-146.

21. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto P, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallobeta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection*, v. 35, p.457-460, 2007.

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

23. Michalopoulos AS, Tsiodras S, Rellos K, *et al*. Colistin treatment in patients with ICU-adquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. *Clinical Microbiology and infections Disease*, v. 11, p. 115-121, 2005.

24. Sader HS. Polimixinas: menos tóxicas e mais necessárias que imaginávamos. *Prática Hospitalar*, n. 46, p. 216-220, 2006.

4 CONCLUSÕES

- Através de métodos fenotípicos detectou-se a presença de MβL em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a imipenem nos hospitais Hosp 1 (particular) e Hosp 3 (público).
- A proporção de resistência a imipenem foi de 40,6% para *P. aeruginosa* e 26,4% para *A. baumannii* nos hospitais pesquisados dentre os 210 microorganismos isolados no período.
- O percentual de positividade para amostras bacterianas produtoras de MβL foi de 38,3% e 5,6 % para *P. aeruginosa* e *A. baumannii,* respectivamente.
- A proporção de *P. aeruginosa* produtoras e não produtoras de MβL foi significativamente diferente entre os três hospitais e entre as amostras clínicas estudadas. Não houve diferença significativa entre os setores hospitalares de origem.
- O único isolado de *A. baumannii* resistente a imipenem produtor de MβL foi identificado em uma amostra de sangue procedente da UTI do Hospital 1.
- As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MβL apresentaram maior percentual de resistência para a maioria dos antimicrobianos testados, quando comparadas com as amostras não produtoras. Todos os isolados bacterianos demonstraram sensibilidade para polimixina B.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Várias pesquisas têm demonstrado que o envolvimento de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* em infecções hospitalares deve-se a vários fatores tais como: Uso crescente de procedimentos invasivos, como cateteres vasculares e urinários, hemodiálise, ventilação mecânica, transplantes de medula óssea e de órgãos sólidos. Estes fatores podem causar situações de imunossupressão nos pacientes, que aliado ao uso de medicamentos de última geração, como corticóides, imunossupressores, antimicrobianos e antifúngicos, vêm promovendo seleção de microorganismos resistentes. A participação desses agentes tem sido descrita, principalmente, em pacientes de UTI's, unidades oncológicas, neonatais e cirúrgicas. Estes setores são considerados núcleos de emergência e disseminação de bactérias multirresistentes, devido a algumas características tais como: Unidade restrita/fechada, com alta freqüência de contato profissional-paciente, maior possibilidade de transmissão cruzada de patógenos, alta pressão seletiva por antibióticos de amplo espectro e maior possibilidade de contaminação do meio ambiente.

Considerando o elevado índice de positividade para as amostras produtoras de MβL nos hospitais estudados em São Luís-MA, sugerimos a implantação nos laboratórios de microbiologia clínica de testes para a detecção de MβL que apresentem praticidade de execução, baixo custo e fácil interpretação. Os resultados desta pesquisa alertam para que medidas de controle de IRAS sejam implementadas, no sentido de prevenir a disseminação deste tipo de resistência para outros microorganismos, bem como auxiliar no serviço de orientação terapêutica antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

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

BERGÈS, C. *et al*. Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and etest for detection of metallo-b-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advanced Access Published February22,** 2007.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER R. Uma revisão sobre metalo-β-lactamases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 44, n. 4, out./dez., 2008.

CASTANHEIRA, M. *et al*. Molecular characterization of a β-lactamase gene, bla_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4.654–4.661, 2004.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARD INSTITUTE. **M100-S18 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement**. 2008.

CORNAGLIA, G. *et al*. Metallo- β-lactamases as emerging resistant determinants in Gram-negative pathogens: open issue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 29, p. 380-388, 2007.

FRITSCHE, T. R. *et al*. Emerging metallo-β-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. **Clinical infectious Diseases**, n. 41, p. 276-278, 2005.

FURTADO, G. H. C. et al. Clinical Culture Surveillance of Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter Species in a Teaching Hospital in São Paulo, Brazil: A 7-Year Study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 11, p. 1270-1273, 2006.

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

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

LAHEY CLINIC. **Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and inhibitor resistant β-lactamases**. Disponível em: http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1. Acesso em: 23 fev. 2009.

LAURETTI, L. *et al*. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 07, p. 1.584-1.590, 1999.

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

LEE, K. *et al*. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4.485–4.491, 2005.

LINCOPAN *et al*. First isolation of metallo-ß-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 01, p. 516-519, 2005.

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

MARRA, A. R. Bloodstream infections with metalo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 388-390, 2006.

MENDES R. E *et al*. Metalo-b-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** v. 42, n.2, p.103-113, 2006.

OSANO, E. *et al*. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 38, n. 01, p. 71-78, 1994.

PAGE, M. I; BADARAU, A. The Mechanisms of catalysis by metallo-β-lactamases. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2008, Article ID 576297, 14p, 2008.

PICÃO, R. C. *et al*. Metallo-β-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disktests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2.028-2.037, 2008.

PITOUT, J. D. D. *et al*. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metalo-β-lactamases in a large centralized laboratory. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 43, n. 7, p. 3.129-3.135, 2005.

QUEENAM, A; M. BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 3, v. 20, p. 440-458, July, 2007.

SADER, H. S. *et al*. Dissemination and diversity of metallo-β-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 25, n. p.57-61, 2005.

TOGNIM M. C. B. *et al*. Dissemination of IMP-1 metallo-b-lactamase–producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 07, p. 742-747, 2006.

TOLEMAN, M. A. *et al*. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.**

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

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

WATANABE, M. *et al*. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 35, n. 01, p. 147-151, 1991.

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

YONG, D. *et al*. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* ssp. and *Acinetobacter* ssp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.3.798-3.801, 2002.

ANEXO A – INFORMAÇÕES PARA OS AUTORES DA REVISTA *INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY*

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