MARIA RENATA GOMES FRANCO

Detecção de Metallo- β -lactamases em cepas de
Pseudomonas aeruginosa isoladas de infecções sistêmicas no
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Flávia Rossi

São Paulo
2009

MARIA RENATA GOMES FRANCO

Detecção de Metallo- β -lactamases em cepas de
Pseudomonas aeruginosa isoladas de infecções sistêmicas no
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Flávia Rossi

São Paulo
2009

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria da Conceição,
aos meus irmãos Maria Iracilda, Alexander e Maria Fernanda,
à todos os meus familiares e amigos pela grande torcida,
e à todos que de alguma forma colaboraram
com a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Flávia Rossi, pela orientação, colaboração, apoio e incentivo.

À Dra. Gisele Madeira Duboc de Almeida, pela ajuda e colaboração.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nascimento Burattini, pelo apoio e colaboração na análise dos resultados.

Ao Dr. Hélio Caiaffa, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Eliana, funcionária do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela ajuda na realização deste trabalho.

À Márcia Maffucci da Seção de Biologia Molecular da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade e ajuda em uma das etapas deste trabalho.

À todos os amigos da Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela amizade e colaboração, em especial à Heleni Mota Pina, que me proporcionou condições para a realização deste trabalho.

À Patrícia Rodrigues Alves e Marlene Rafael da Silva, funcionárias do setor de controle de qualidade e banco de cepas da Seção de Microbiologia do HC-FMUSP, que além da amizade, carinho e apoio, colaboraram e proporcionaram condições para realização deste trabalho.

À Alessandra Messina Perini, pela grande amizade, carinho, companheirismo, compreensão, apoio e ajuda na revisão deste trabalho.

À Adriana Lopes Motta, pela amizade, carinho, apoio e por compartilhar dos bons e maus momentos de todas as etapas da realização deste trabalho.

À minha família, pela compreensão, paciência, incentivo, apoio e carinho.

E à todos que de alguma forma colaboraram....

Muito Obrigada!!!

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado da *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2. Alterações de proteínas de membrana externa	5
1.3. Hiperexpressão de sistemas ou bombas de efluxo	6
1.4. Alterações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)	7
1.5. Produção de β -lactamases.....	8
1.5.1. Classe A.....	11
1.5.2. Classe C - Cefalosporinases cromossomais ou AmpC	12
1.5.3. Classe D - Oxacilinases	14
1.5.4. Classe B - Metallo- β -lactamases (MBL)	14
2. OBJETIVOS.....	23
3. MÉTODOS.....	25
3.1. Local do estudo.....	26
3.2. Desenho do estudo	26
3.3. Microbiologia.....	26
3.3.1. Coleta e processamento das hemoculturas.....	26

3.3.2.	Identificação dos isolados e inclusão no estudo.....	27
3.3.3.	CrITÉrios de exclusão	28
3.4.	Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	28
3.4.1.	Método de microdiluição.....	28
3.4.2.	Método de Etest [®] para colistina	31
3.4.3.	Controle de qualidade	31
3.5.	Métodos fenotÍpicos para detecção de MBL	32
3.5.1.	Disco Aproximação (DA)	32
3.5.2.	Etest [®] MBL	35
3.5.3.	Teste de Hodge Modificado (THM).....	36
3.5.4.	Controle de qualidade	37
3.6.	Método molecular para detecção de MBL.....	38
3.6.1.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
3.6.2.	Controle de qualidade	41
3.7.	Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	42
3.8.	Análise Estatística	46
4.	RESULTADOS	47
4.1.	Perfil geral de suscetibilidade.....	49
4.2.	Métodos fenotÍpicos para detecção de MBL	52
4.2.1.	Disco Aproximação (DA)	52
4.2.2.	Etest [®] MBL	54
4.2.3.	Teste de Hodge Modificado (THM).....	55
4.3.	Método molecular para detecção de MBL.....	56
4.3.1.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	56

4.4.	Eletoforese em Campo Pulsado (PFGE)	57
4.5.	Análise dos resultados	61
4.6.	Perfil de suscetibilidade dos isolados produtores e não produtores de MBL.....	63
5.	DISCUSSÃO.....	66
6.	CONCLUSÃO	78
7.	ANEXOS.....	80
8.	REFERÊNCIAS	100

LISTA DE SIGLAS

AIM-1	Australia Imipenemase
AK	Amicacina
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicina
CT	Colistina
DA	Disco Aproximação
DLC	Divisão de Laboratório Central
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E	Especificidade
EDTA	Etilenodiaminotetracetic Acid
FEP	Cefepime
GIM-1	German Imipenemase
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMP-1	Imipenemase
MAA	2-Mercaptoacetic Acid
MBL	Metallo- β -lactamase
MEM	Meropenem

MH	Mueller-Hinton
MPA	2-Mercaptopropionic Acid
OPM	Outer Membrane Protein
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP _s	Proteínas Ligadoras de Penicilinas
PCR	Polimerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PIP	Piperacilina
PM	Peso Molecular
RPM	Rotações por minuto
S	Sensibilidade
SIM-1	Seoul Imipenemase
SPM-1	São Paulo Metalo- β -lactamase
THM	Teste de Hodge Modificado
TIC/AC	Ticarcilina / Ácido clavulânico
TOB	Tobramicina
TSB	Tryptic Soy Broth
VIM-1	Verona Imipenemase
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$<$	Menor
$\geq$	Maior ou igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
59 be	59 elementos de pares de base
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
cm	Centímetros
et al	e outros
gr	Gramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
®	Marca registrada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.....	10
Tabela 2 - “Primers” utilizados para detecção das Metallo- β -lactamases e tamanho dos produtos esperados.....	40
Tabela 3 - Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular.	45
Tabela 4 - Interpretação do índice kappa.....	46
Tabela 5 - Positividade das combinações substrato-inibidor utilizadas no método de Disco Aproximação para detecção de Metallo- β -lactamases em 53 cepas de <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabela 6 - Resultado da análise molecular por Eletroforese em Campo Pulsado dos 21 isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores de Metallo- β -lactamases e suas respectivas clínicas de origem.	59
Tabela 7 - Comparação entre os métodos fenotípicos e Reação em Cadeia da Polimerase na detecção de Metallo- β -lactamases entre os 69 isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenem isolados de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.....	62
Tabela 8 - Perfil de sensibilidade das 69 cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de hemoculturas e dos isolados produtores e não produtores de Metallo- β -lactamases.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura esquemática de integron de classe 1.....	18
Figura 2. Painel Neg Combo Type 32 - sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring®, EUA).....	29
Figura 3. Representação esquemática das distâncias entre os discos de substratos e inibidores utilizados no método de Disco Aproximação para detecção fenotípica de Metallo- β -lactamases.....	34
Figura 4. Esquema de realização do Teste de Hodge Modificado.....	37
Figura 5. Distribuição cronológica das 69 cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.....	48
Figura 6. Distribuição das clínicas de origem das 69 cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.....	49
Figura 7. Perfil de sensibilidade das 69 cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.....	50
Figura 8. Amostras 56, 59, 60 e 63 demonstrando suscetibilidade reduzida à colistina.....	51
Figura 9. Disco Aproximação positivo: distorção e a ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria teste.	53

Figura 10. Disco Aproximação negativo: não houve alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria teste.	53
Figura 11. Etest [®] MBL positivo: relação da CIM de IP/IPI $\geq$ 8.....	54
Figura 12. Etest [®] MBL negativo: não demonstrou relação da CIM de IP/IPI $\geq$ 8.....	54
Figura 13. Teste de Hodge Modificado positivo: distorção na zona de inibição do imipenem.	55
Figura 14. Teste de Hodge Modificado negativo: zona de inibição do imipenem inalterada.....	55
Figura 15. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) na amostra 6 (Anexo C).....	85
Figura 16. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) na amostra 20 (Anexo C)...	85
Figura 17. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) nas amostras 24, 28 e 29 (Anexo C).....	85
Figura 18. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) na amostra 39 (Anexo C)...	86
Figura 19. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) nas amostras 41, 45, 46 e 49 (Anexo C).....	86
Figura 20. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) nas amostras 54, 56, 57 e 60 (Anexo C).....	86
Figura 21. Detecção do gene <i>bla</i> _{SPM-1} (650 pb) nas amostras 66, 67 e 69 (Anexo C).....	87

Figura 22. Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-2} (865 pb) na amostra 21 (Anexo C)...	87
Figura 23. Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-2} (865 pb) na amostra 26 (Anexo C)...	87
Figura 24. Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-2} (865 pb) na amostra 43 (Anexo C)...	88
Figura 25. Detecção do gene <i>bla</i> _{VIM-2} (865 pb) na amostra 55 (Anexo C)...	88
Figura 26. Padrões moleculares encontrados em 17 isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores do gene <i>bla</i> _{SPM-1}	57
Figura 27. Padrões moleculares encontrados em quatro isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores do gene <i>bla</i> _{VIM-2}	58
Figura 28. Distribuição das clínicas de origem dos 17 isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores do gene <i>bla</i> _{SPM-1}	60
Figura 29. Distribuição das clínicas de origem dos quatro isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores do gene <i>bla</i> _{VIM-2}	61
Figura 30. Comparação entre o perfil de sensibilidade dos isolados produtores e não produtores de Metallo-β-lactamases.....	64

RESUMO

Franco MRG. Detecção de Metallo- β -lactamases em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecções sistêmicas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 138p.

INTRODUÇÃO: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) produtoras de Metallo- β -lactamase (MBL) tem sido reportadas como sendo uma importante causa de infecções nosocomiais assim como um grande problema terapêutico mundial. No complexo HC-FMUSP, o maior hospital universitário do Brasil, a prevalência de PA resistente aos carbapenêmicos também se apresenta de forma crítica. No entanto, a prevalência de MBL em nossa instituição e a padronização para detecção fenotípica deste mecanismo de resistência ainda não foram estabelecidos.

OBJETIVOS: Determinar a prevalência de MBL em cepas de PA resistentes ao imipenem; comparar métodos fenotípicos e moleculares na detecção de MBL; avaliar a clonalidade dos isolados produtores de MBL e determinar o perfil de suscetibilidade de todos os isolados incluídos no estudo.

MÉTODOS: Foi realizado um estudo retrospectivo com 69 cepas de PA resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005. Os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade pelo método de microdiluição e Etest[®] para colistina. Estes foram testados para a produção de MBL pelos métodos fenotípicos de Disco Aproximação (DA), Etest[®] MBL e Teste de Hodge Modificado (THM). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para detecção dos seguintes genes: (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}). A clonalidade dos isolados produtores de MBL foi avaliada por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).

RESULTADOS: Cinquenta e três cepas (76.8%) foram positivas pelos métodos de

DA e Etest[®] MBL, e 19 cepas (27.5%) foram positivas pelo THM. Vinte e um isolados (30.4%) demonstraram o gene *bla*_{MBL} por PCR, sendo que 17 (81%) foram positivos para o gene *bla*_{SPM-1} e 4 (19%) para o gene *bla*_{VIM-2}. Os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2} e *bla*_{VIM-1} não foram detectados. O inibidor ácido 2-mercaptoacético (MAA) e o THM mostram a melhor concordância com a PCR, com índices de kappa variando de 0.81 a 0.86 e 0.79, respectivamente. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), demonstrou alta sensibilidade (100%), baixa especificidade (33.3%), e pobre concordância com a PCR. Entre os isolados positivos para o gene *bla*_{SPM-1}, 5 foram indistinguíveis, 11 foram estreitamente relacionados e 1 possivelmente relacionado. Entre os isolados positivos para o gene *bla*_{VIM-2}, 2 foram indistinguíveis, 1 foi estreitamente relacionado e 1 diferente. Entre os isolados produtores de MBL, a colistina e o aztreonam foram as drogas mais ativas com 90.5% e 85.7% de sensibilidade, respectivamente. CONCLUSÃO: Este é o primeiro relato de PA produtora de MBL no HC-FMUSP, reforçando a epidemiologia brasileira onde a enzima SPM-1 é a mais prevalente entre isolados de PA. Os métodos de DA com o inibidor MAA e o THM mostraram-se boas opções para detecção fenotípica de MBL em laboratórios de microbiologia. Os produtores de MBL demonstraram fenótipo multiresistente com um padrão clonal, enfatizando a necessidade de práticas de controle de infecções em nossa instituição.

SUMMARY

Franco MRG. Metallo- β -lactamases detection among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bloodstream infections at Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [dissertation]. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 138p.

INTRODUCTION: *Pseudomonas aeruginosa* (PA) strains Metallo- β -lactamase (MBL) producing have been reported as an important cause of nosocomial infection, also becoming a critical therapeutic problem worldwide. At HC-FMUSP complex, the largest teaching hospital in Brazil, the prevalence of PA resistant to carbapenems is also presented as a critical problem. However, MBL prevalence and the standardization for phenotypical detection of this resistance mechanism still had not been established. PURPOSE: To determine MBL prevalence in PA resistant to imipenem; to compare phenotypic and molecular methods to detect MBL; to evaluate the clonality of the MBL producers strains and to determine the susceptibility profile of all isolates included in this study. METHODS: A retrospective study was carried analyzing 69 PA strains resistant to imipenem isolated from blood cultures of patients at HC-FMUSP during 2005. They were submitted to the susceptibility profile test by microdilution method and Etest[®] to colistin. The isolates were also tested for MBL production by phenotypic methods like Double Disk Synergy (DDS), Etest[®] MBL, Modified Hodge Test (MHT). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect the following genes: (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-2}). The clonality of the MBL producers was evaluated by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). RESULTS: Fifty-three isolates (76.8%) had positive results with DDS and Etest[®] MBL, and 19 isolates (27.5%) were positive by

MHT. Twenty-one isolates (30.4%) had a *bla*_{MBL} gene by PCR, being 17 (81%) positive for *bla*_{SPM-1} and 4 (19%) for *bla*_{VIM-2}. The *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2} and *bla*_{VIM-1} genes had not been detected. Mercaptoacetic acid (MAA) inhibitor and MHT showed the best agreement with PCR, with kappa value ranging from 0.81 to 0.86 and 0.79, respectively. Etilenodiaminotetracetic acid (EDTA) inhibitor showed high sensibility (100%), low specificity (33.3%), and poor agreement with PCR. Among isolates producing *bla*_{SPM-1} gene, 5 were indistinguishable, 11 were closely related and 1 was possibly related. Among isolates producing *bla*_{VIM-2} gene, 2 were indistinguishable, 1 closely related and 1 was different. Among MBL-producing strains, colistin and aztreonam were the most active drugs with 90.5% and 85.7% of sensitivity, respectively. CONCLUSION: This is the first report of PA MBL producers at HC-FMUSP, reinforcing the Brazilian epidemiology where SPM-1 enzyme is the most prevalent among PA isolates. The DDS method with MAA inhibitor and MHT had the best agreement with PCR, showing themselves as good options for MBL phenotypical detection in microbiology laboratories. The MBL producers had shown multiresistant phenotype with a clonal standard, reinforcing the necessity of infection control practices in our institution.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

É um bacilo Gram-negativo não fermentador, considerado atualmente um dos principais agentes de infecção hospitalar e um dos mais freqüentemente isolados nos laboratórios de microbiologia clínica em diferentes materiais. Taxonomicamente encontra-se dentro da família *Pseudomonadaceae*. Microscopicamente a bactéria é definida como um bacilo Gram-negativo reto, de 0,5 a 0,7 μm de espessura por 1,5 a 3,0 μm de comprimento, não esporulado e móvel por um simples flagelo polar. Sua obtenção de energia a partir dos carboidratos implica num metabolismo oxidativo, o que define a sua inclusão no grupo dos microorganismos não fermentadores. Possui grande versatilidade nas necessidades nutricionais e energéticas, o que lhe permite crescer rapidamente, isolando-se em praticamente todos os meios de cultura usados em laboratório, numa ampla variedade de temperaturas (4°C a 42°C). Macroscopicamente, as cepas de PA demonstram colônias iridescentes e irregulares sendo que a maioria produz pigmentos hidrossolúveis, difusíveis no meio de cultura, tais como a piocianina (azul), pioverdina (esverdeada), e com menos freqüência, piomelanina (marrom) e piorrubina (vermelho). Esta observação, assim como a produção de odor de frutas, é uma característica de grande importância na identificação de rotina. Pode apresentar um fenótipo mucóide

devido ao aumento da produção de alginato e freqüentemente infecta pacientes com fibrose cística (Murray et al., 2003).

É um dos microrganismos mais ubiqüitários, pois é encontrada no solo, água, vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares. Raramente causa infecção num indivíduo imunocompetente, porém é um dos principais agentes de infecção em indivíduos com defesas diminuídas (Trabulsi et al., 2003).

No Brasil, segundo um estudo de vigilância de resistência aos antimicrobianos, PA foi a causa mais freqüente de infecções do trato respiratório, a segunda causa mais freqüente de infecções urinárias e infecções de ferida cirúrgica e o sexto agente associado a infecções sistêmicas (Sader et al., 2001). Nos Estados Unidos, é o segundo patógeno responsável por pneumonias hospitalares e ainda é a terceira causa mais comum de infecções urinárias, a quarta causa de infecção de sítio cirúrgico e o sétimo patógeno mais freqüente isolado em corrente sanguínea (NNIS, 2004).

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no ano de 2005, foi o agente mais isolado a partir de culturas obtidas de processos infecciosos do trato respiratório; terceiro agente isolado de infecções urinárias; e quinto agente causador de infecções sistêmicas. Pode estar associada a diferentes tipos de infecções como otites externas, foliculites, ceratites seguidas do uso de lentes de contato e infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. É causa importante de infecções nosocomiais do trato respiratório, incluindo

pneumonia associada à ventilação, e infecções em pacientes queimados. Sua importância clínica está relacionada com a ampla expressão de fatores de virulência, assim como resistência intrínseca e adquirida a várias classes de antibióticos decorrente de distintos mecanismos, que podem ser expressos isoladamente ou combinados (Trabulsi et al., 2003).

O Programa de Vigilância Antibacteriana, SENTRY, analisou isolados brasileiros de PA de 1997-1999, destacando uma reduzida sensibilidade a ceftazidima (59,5%), fluorquinolonas (50%) e imipenem (69,8%) (Sader et al., 2001). Numa análise realizada no Laboratório de Microbiologia do HC-FMUSP em 2005, determinando o perfil de suscetibilidade de 2228 cepas de PA isoladas de diversos materiais, demonstraram um perfil de sensibilidade bastante preocupante: aztreonam 55%, ciprofloxacina 55%, gentamicina 61%, imipenem 63%, amicacina 66%, ceftazidima 71%, piperacilina/tazobactam 71% e cefepime 77%. Altos níveis de resistência antimicrobiana em PA são reflexos da resistência intrínseca associadas ao aparecimento de distintos mecanismos de resistência adquirida nesse patógeno. A resistência intrínseca em PA está freqüentemente associada com a presença de β -lactamase cromossomal induzível (AmpC) e múltiplos sistemas de bombas de efluxo. As drogas afetadas são ampicilina, amoxacilina, amoxacilina / ácido clavulânico, cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações, cefotaxima, ceftriaxona, ácido nalidíxico, ácido pipemídico, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol e sulfametoxazol / trimetoprim (Livermore et al., 2002).

O aumento nos níveis de resistência para antibióticos considerados de primeira escolha terapêutica é preocupante. Carbapenêmicos aparecem como escolha terapêutica empírica no tratamento de infecções graves por PA, entretanto o uso desta classe tem sido ameaçado pelo aumento da incidência de β -lactamases que podem hidrolisar este antibiótico e pela disseminação de clones multiresistentes (Gales et al., 2003). A resistência aos carbapenêmicos pode estar relacionada à diversos mecanismos em PA: (i) alterações de proteínas de membrana externa - porinas; (ii) hiperexpressão de bombas de efluxo; (iii) alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs); (iv) produção de β -lactamases.

1.2. Alterações de proteínas de membrana externa

As proteínas de membrana externa (OMP) dos microrganismos Gram-negativos, também chamadas de porinas, são proteínas capazes de formar canais constituídos de água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. A perda ou a diminuição da expressão dos genes que codificam as OMPs causam a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do antimicrobiano conferindo resistência (Quin et al., 1988).

Em PA a proteína de membrana mais importante é a OprD e a perda desta, assim como sua expressão reduzida, causa resistência ao imipenem, e pode levar a susceptibilidade reduzida ao meropenem, embora não leve a

resistência como definido pelos “breakpoints” convencionais. A perda de OprD não confere resistência a outros β -lactâmicos a não ser aos carbapenêmicos. A perda mutacional de OprD ocorre freqüentemente durante a terapia com imipenem (Livermore, 1992). Em alguns estudos clínicos, a resistência ao imipenem apareceu durante o tratamento de infecções causadas por PA em aproximadamente 25% dos pacientes tratados com esta droga (Zanetti et al, 2003).

1.3. Hiperexpressão de sistemas ou bombas de efluxo

Os sistemas de efluxo estão aparecendo como importante causa de multiresistência em PA. A terminologia comumente utilizada nos sistemas de efluxo é composta das designações para uma bomba (MexB), uma lipoproteína ligadora (MexA) e uma proteína de membrana que age como portal de saída (OprM), formando o sistema MexAB-OprM. Este sistema quando hiperexpresso leva a resistência as quinolonas, penicilinas e cefalosporinas. A susceptibilidade ao meropenem pode diminuir, mas a do imipenem não é usualmente afetada (Livermore et al., 2002). A hiperexpressão do sistema MexXY-OprM afeta a susceptibilidade dos aminoglicosídeos e é co-regulada pela proteína OprD, levando a resistência a múltiplas drogas, incluindo imipenem, meropenem, quinolonas, penicilinas, aztreonam e cefalosporinas (Ochs et al., 1999).

1.4. Alterações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)

As proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) são carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática que atuam em uma etapa importante da estruturação do peptideoglicano das bactérias, catalisando a transpeptidação entre duas subunidades de mureína. O peptideoglicano é um constituinte essencial da parede celular bacteriana (Spratt e Cromie, 1988). As PBPs são os sítios-alvo para a atividade dos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos que se ligam covalentemente a essas estruturas, impedindo a formação da parede celular e causando a lise osmótica da célula. A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, devido a alterações de PBPs, é mais comum em microrganismos Gram-positivos que em Gram-negativos. Entretanto, apesar de pouco freqüentes, alterações nas PBPs já foram reportadas em isolados clínicos de PA (Gotoh et al., 1998).

Um estudo no qual foram avaliados mutantes laboratoriais mostrou que a resistência aos β -lactâmicos em PA estava associada à expressão reduzida da PBP-3. Um outro estudo demonstrou que a resistência a carbapenêmicos neste patógeno estaria associada a alterações na PBP-4 (Bellido et al., 1990).

1.5. Produção de β -lactamases

Dentre os diferentes mecanismos de resistência que já foram descritos a produção de β -lactamases é um dos mais prevalentes e importantes em PA. As penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos podem ser hidrolisados por vários tipos de β -lactamases, e a interação entre essas enzimas e seus substratos resulta em compostos inativos que permitem a sobrevivência da célula bacteriana (Bush, 2001). Diferentes tipos de β -lactamases já foram descritos e classificados mas atualmente, duas têm sido consideradas como de maior importância, a classificação de Ambler e a de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush et al., 1995). A classificação de Bush (1989) foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima. Em 1995, foi proposta uma atualização da classificação de Bush que combina características estruturais e funcionais das β -lactamases (Bush et al., 1995). A classificação de Ambler foi proposta com base na estrutura molecular das β -lactamases, de acordo com a sequência de aminoácidos. Quatro classes moleculares foram descritas: A, B, C e D (Ambler, 1980). A Tabela 1 apresenta de modo simplificado a correlação entre a classificação molecular de Ambler (1980) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (1995).

Entre as amostras de PA, a produção de AmpC, β -lactamases de espectro-estendido (ESBLs), Oxacilinases (OXA) e as Metallo- β -lactamases (MBLs) desempenham papéis importantes na resistência aos

antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por esse agente (Jacoby e Munhoz-Price, 2005).

Tabela 1 - Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.

Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, 1995		Classificação de Ambler, 1980	Características
Grupo Funcional	Subgrupo	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais dos gram-negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenêmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A, D	Grande maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.
	2a	A	Penicilinasas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas.
	2b	A	β -lactamases de espectro reduzido de bactérias gram-negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1.
	2be	A	β -lactamases de espectro estendido e conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. São inibidas pelo ácido clavulânico.
	2br	A	β -lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de β -lactamases (IRT)
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina), oximinocefalosporinas e carbapenêmicos; pouco inibidas pelo ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinasas inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenêmicos e todos os outros β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico.
4		Não determinada	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos

Fonte: Adaptado do artigo de Bush et al. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1995;39:1211-33.

1.5.1. Classe A

- **β -lactamases de espectro estendido (ESBL)**

As β -lactamases de espectro estendido são inibidas pelo ácido clavulânico e pertencem em sua maior parte à classe A de Ambler, estão distribuídas no grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros e conferem resistência a diversas cefalosporinas de amplo espectro (Ambler, 1980; Bush et al., 1995).

As ESBLs do tipo TEM e SHV raramente são descritas em PA (Chanawong et al., 2001), e a enzima CTX-M, que é o tipo predominante de ESBL entre as enterobactérias, foi relatada em PA em 2004, isolada em Amsterdam (Al Naiemi et al., 2006). A presença da PER-1 foi reportada na Turquia e outros países (Claeys et al., 2000; DeChamps et al., 2002). Outras ESBLs menos comuns como VEB, GES e IBC também têm sido descritas em PA. A VEB-1 foi identificada na França (Naas et al., 1999), IBC-1 e GES-1 tem sido isoladas na França, Grécia e África do Sul (Dubois et al., 2002; Poirel et al., 2001b; Poirel et al., 2002). Essas enzimas são remotamente relacionadas do ponto de vista genético, no entanto, elas compartilham o mesmo perfil bioquímico de hidrólise e inibição pelos diferentes compostos da classe dos β -lactâmicos (Weldhagen et al., 2003).

- **Carbapenemases da Classe A**

São β -lactamases do grupo funcional 2 ou da classe molecular A, subgrupo 2f, são inibidas pelo ácido clavulânico e conferem resistência aos carbapenêmicos (Ambler, 1980; Bush et al., 1995).

São serino-carbapenemases e incluem três famílias principais: NMC/IMI, SME e KPC. A família GES, inicialmente identificada como ESBL, passou a ser classificada como carbapenemases da classe A (Queenan e Bush, 2007). Esta tem sido isolada de enterobactérias e PA e são encontradas no sudoeste da Ásia, América do Sul, África e Europa (Walsh, 2008). Até recentemente a enzima KPC tinha sido detectada apenas em enterobactérias, no entanto, há pouco tempo foi detectada em um isolado de PA na Colômbia (Villegas et al., 2007). Ao contrário da enzima GES, todas as enzimas KPC demonstram atividade carbapenemase (Ke et al., 2007), e embora os relatos destas enzimas continuarem a crescer, não há dados recentes das carbapenemases NMC/IMI e SME em isolados de PA (Walsh, 2008).

1.5.2. Classe C - Cefalosporinases cromossomais ou AmpC

As β -lactamases do grupo funcional 1 ou da classe molecular C, chamadas cefalosporinases cromossomais ou AmpC e não são inibidas pelo ácido clavulânico (Ambler, 1980; Bush et al., 1995). São encontradas constitutivamente em PA e nas enterobactérias. Na ausência de β -lactâmicos, a AmpC é normalmente produzida em baixos níveis, mas a presença de alguns antibióticos, como os carbapenêmicos podem “desreprimir” esta enzima, sendo considerados fortes indutores destas β -lactamases, mas felizmente são estáveis à atividade hidrolítica desta enzima. Interessantemente, o clavulanato pode induzir a expressão da

AmpC resultando em antagonismo da atividade bactericida da ticarcilina. Alguns autores sugerem que o antimicrobiano ticarcilina/clavulanato seja evitado como antibiótico β -lactâmico anti-pseudomonas (Lister et al., 1999). Quando esses antimicrobianos indutores são retirados do meio, a produção pode voltar a níveis basais que, normalmente, são baixos (Juan et al., 2005).

Em amostras de PA, a expressão do gene *ampC* leva à produção de β -lactamases indutivas, podendo também originar mutantes que passam a produzir essas β -lactamases constitutivamente em grandes quantidades. Os mecanismos de indução e desrepressão têm sido amplamente estudados em enterobactérias, entretanto, mecanismos regulatórios similares regulam também a expressão da β -lactamase AmpC em PA (Bagge et al., 2000). O gene *ampC* está sob o controle regulatório de outros genes designados como *ampR*, *ampD* e *ampG*. Mutações ou deleções no gene *ampD* resultam na hiperexpressão de AmpC. Poucos casos de isolados com mutações em *ampR* que apresentam hiperexpressão de AmpC foram descritos em PA (Langae et al., 2000; Normark, 1995).

O mais importante é que a terapia antimicrobiana seleciona mutantes desreprimidos que permanentemente hiperproduzem a β -lactamase AmpC, levando a resistência a ticarcilina, piperacilina e cefalosporinas de 3ª geração (Livermore, 1987).

1.5.3. Classe D - Oxacilinases

As Oxacilinases pertencem ao grupo funcional 2, classe molecular D, subgrupo 2d. São enzimas que hidrolisam as oxacilinas, oximino-cefalosporinas e carbapenêmicos, e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico (Ambler, 1980; Bush et al., 1995). Embora tenham sido reportadas em outros bacilos Gram-negativos, elas ocorrem predominantemente em PA e espécies de *Acinetobacter* (Poirel et al., 2001a). O nível da atividade carbapenemase exibida pelas oxacilinases é consideravelmente mais fraco comparado à atividade hidrolítica das Metallo- β -lactamases, e isolados que exibem as oxacilinases requerem mecanismos adicionais de resistência para causar um aumento da CIM dos carbapenêmicos (Towner et al., 2008).

Cinco grupos distintos de oxacilinases tem sido descritos em PA: OXA grupo I que inclui (OXA-5, OXA-7, OXA-10 e OXA-13); OXA grupo II (OXA-2, OXA-3, OXA-15 e OXA-20); OXA grupo III (OXA-1, OXA-4, OXA-30 e OXA-31); OXA grupo IV (OXA-9) e finalmente OXA grupo V que inclui apenas a enzima LCR-1 (Bert et al., 2002).

1.5.4. Classe B - Metallo- β -lactamases (MBL)

Dentre as diferentes classes de enzimas que degradam os β -lactâmicos, as Metallo- β -lactamases (MBLs) são notáveis pelo seu amplo espectro de atividade contra a maioria dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e também pela resistência que essas enzimas apresentam

aos inibidores de β -lactamases (Laraki et al., 1999). As MBLs, são agrupadas na classe B de Ambler e no grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush et al., 1995), e possuem quatro características principais: (i) atividade hidrolítica frente os carbapenêmicos; (ii) não hidrolisam os monobactâmicos, como o aztreonam; (iii) não são inibidas por inibidores de β -lactamases, mas são inibidas por agentes quelantes como o EDTA, e derivados do tiol; (iv) requerem íons Zn^{2+} ou outros cátions divalentes como co-fator (Laraki et al., 1999).

As MBLs podem ser constitutivas sendo normalmente carregadas pelo microrganismo em cromossomo, ou podem ser adquiridas. As carregadas por cromossomos são usualmente derivadas de organismos cujo habitat é predominantemente o meio ambiente, e estes microrganismos são raramente patogênicos (Walsh et al., 1994; Chen et al., 2003). São produzidas constitutivamente por algumas espécies bacterianas como *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. e *Chryseobacterium meningosepticum* (Nordmann e Poirel, 2002). No entanto, desde o início da década de 90, genes que codificam MBLs tem sido mundialmente descritos em patógenos clinicamente relevantes como diferentes espécies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e também em membros da família *Enterobacteriaceae* (Riccio et al., 2000; Yan et al., 2001).

A primeira MBL móvel (IMP-1) foi caracterizada em um isolado de *Serratia marsecens*, no Japão, (Watanabe et al., 1991), onde os carbapenêmicos são amplamente utilizados. Em 1999, a segunda MBL,

denominada VIM-1, foi caracterizada em uma amostra de PA isolada em Verona, Itália (Lauretti et al., 1999). Desde então já foram descritas 18 variantes de IMP em diferentes regiões geográficas e 14 diferentes tipos de VIM, a maior parte na Europa, mas algumas variantes também foram encontradas na América do Norte, América Latina e Ásia (Walsh et al., 2005). A família SPM-1 foi isolada em uma amostra urinária de PA em São Paulo (Toleman et al., 2002), e até o presente momento, foi identificada somente em amostras isoladas no Brasil, no entanto estas amostras estão disseminadas por diversos estados brasileiros (Gales et al., 2003). No sul do país a enzima SPM-1 foi detectada em 19.6% dos isolados de PA resistentes ao imipenem ou ceftazidima (Martins et al., 2007). Já no norte a enzima SPM-1 foi encontrada em apenas 7.5% das PA resistentes ao imipenem (Vieira et al., 2005).

A quarta família descrita é a GIM-1 que foi isolada na Alemanha em 2002 e tem características similares às das outras MBLs adquiridas. Até o momento, não foi reportada em outro lugar do mundo (Castanheira et al., 2004). A quinta família de MBLs adquiridas é a SIM-1 descrita na Korea e tem de 64 a 69% de similaridade com a família IMP (Lee et al., 2005). Por fim, a última família de MBLs adquiridas recentemente descrita, é a AIM-1, descoberta na Austrália como publicado por Grupta (2008).

Desde seus relatos iniciais, as MBLs pertencentes às famílias SPM, GIM, SIM e AIM não tem se disseminado além de seus países de origem. No entanto, as famílias IMP e VIM continuam sendo detectadas ao redor do

mundo inclusive em membros do grupo de enterobactérias (Queenan e Bush, 2007).

A maioria das MBLs adquiridas é carregada por elementos genéticos que auxiliam seu movimento de um elemento genético para outro. Genes codificadores das enzimas IMP, VIM, GIM e SIM se apresentam como cassetes gênicos contidos em integrons de classe 1 (Lee et al., 2005; Castanheira et al., 2004; Lauretti et al., 1999; Senda et al., 1996). No entanto, enzimas do tipo IMP também já foram encontradas em integrons da classe 3 (Collis et al., 2002). Integrons são capazes de captar genes cassetes através de um evento de recombinação sítio-específico entre dois sítios de DNA, um no integron e outro no cassete gênico (Bennett, 1999).

Integrons de classe 1 são elementos genéticos constituídos por uma região conservada 5', composta por um gene *intI1* que codifica a enzima integrase que faz a inserção e extração dos cassetes gênicos, uma região promotora e um sítio de recombinação *attI1*; região conservada 3' composta pelo gene *qacEΔ1*, que codifica a resistência a compostos de amônio quaternário, pelo gene *sul1*, que codifica resistência a sulfonamidas, e pelo gene *orf5* de função desconhecida; e pelo módulo *tni*, como demonstrado na Figura 1 (Mendes et al., 2006).

Figura 1. Estrutura esquemática de integron de classe 1.

Fonte: Mendes RE, et al. Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42:103-13.

Entre as regiões conservadas existe uma região variável onde genes cassetes, codificadores de determinantes de resistência podem ser inseridos, podendo apresentar quantidade variável de cassetes gênicos, sendo que a posição onde o cassete gênico encontra-se inserido, entre as regiões conservadas 5' e 3' influenciam na sua taxa de transcrição, ou seja, ela ocorre de forma mais eficiente à medida que o cassete gênico encontra-se mais próximo à região promotora (Collis e Hall, 1995). Cassetes gênicos têm normalmente entre 500 e 1000 pares de base (bp), e são constituídos por dois componentes funcionais: um gene responsável pela codificação de uma proteína (pode ser um gene de resistência); e um sítio de recombinação conhecido como “59 elementos de pares de base” (59 be). Esses genes não possuem promotores, sendo que a expressão gênica depende do promotor presente no integron no qual o cassete gênico encontra-se inserido (Collis et al., 1993). Paralelamente à disseminação de genes de MBLs, observou-se também a ocorrência da disseminação de outros determinantes de resistência, entre eles genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em integrons de classe 1. Grande número de genes de

MBL que tiveram seu contexto genético pesquisado encontrava-se associado a um ou mais genes de resistência a aminoglicosídeos (*aacA4*) (Toleman et al., 2005).

Os integrons não são estruturas genéticas que se movem por si só. Eles são localizados, usualmente em transposons, que podem mobilizar os integrons entre diferentes estruturas genéticas. Estes são geralmente constituídos de elementos genéticos que codificam as transposases (*tnpA*), responsável pelo movimento do transposon, e resolvases (*tnpR*), responsável pela recombinação ao sítio específico, e um sítio de recombinação (*res*) (Liebert et al., 1999).

Enquanto a maioria dos genes codificadores de MBL são mobilizados por integrons/transposons, uma minoria parece ser mobilizada por “commons regions” (CRs) que também tem sido associada com elementos chamados regiões SXT. O gene que codifica a enzima SPM-1 é associado com dois tipos de elementos CR (Toleman et al., 2002). Análises adicionais de isolados brasileiros de PA demonstraram que os DNAs continham os elementos CR, neste caso, CR4 (Poirel et al., 2004). Comparado aos integrons e transposons, muito pouco se sabe sobre os elementos CR, principalmente como eles promovem a mobilização dos genes de resistência (Walsh et al., 2005).

A grande mobilidade destes genes sugere que a resistência aos carbapenêmicos e cefalosporinas continuará a aumentar e poderá conferir um enorme potencial de disseminação destes genes em outros patógenos nosocomiais (Lincopan et al., 2005). Por este motivo, sua detecção é

importante para o controle de infecções e para a orientação adequada da terapêutica (Filho et al., 2002).

Não há, no momento, métodos de detecção fenotípica de MBL padronizados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), no entanto, devido ao grande número de amostras produtoras de MBLs em diferentes regiões do mundo, houve a necessidade de se desenvolver testes simples, práticos e de baixo custo que propiciassem o rastreamento de amostras produtoras de MBLs pelo laboratório de rotina microbiológica.

Alguns métodos fenotípicos são baseados na inibição da atividade da MBL por agentes quelantes do Zn^{+2} como EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e por derivados do tiol que agem no sítio ativo da enzima, como os ácidos 2-mercaptoacético (MAA) e ácido 2-mercaptopropiônico (MPA). Entre as metodologias fenotípicas, o método de Disco Aproximação (DA), descrito por Arakawa et al. (2000), pode apresentar alta sensibilidade e especificidade, porém esses resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o tipo de enzima, o substrato e o inibidor utilizado (Mendes et al., 2006).

Com base no mesmo princípio da difusão em ágar, desenvolveu-se uma fita de Etest[®] MBL (AB BIODISK[®] - Solna, Sweden), que é incorporada de imipenem (IP) em uma das extremidades, e imipenem associado ao EDTA (IPI) na outra extremidade. É um método simples e prático, porém apresenta custo mais elevado (Walsh et al., 2002). Para “screening” da atividade carbapenemase, incluindo as MBLs, o Teste de Hodge Modificado

(THM), descrito por Lee et al. (2001), pode ser aplicado na rotina de laboratórios de microbiologia.

A PCR (“Polimerase Chain Reaction”) – Reação em cadeia da polimerase, é a técnica de referência para detecção dos diferentes genes que codificam as MBLs (Walsh et al., 2005). Ela visa reproduzir um determinado trecho de DNA (“Deoxyribonucleic acid”) a ser estudado, e a reação ocorre em termociclador que, através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação: desnaturação, anelamento e extensão. No entanto, este método tem seu uso prático limitado em virtude do elevado custo e indisponibilidade em laboratórios de rotina microbiológica (Filho et al., 2002).

O uso de técnicas moleculares em investigação de surtos de infecção hospitalar permite, além da identificação do patógeno, a tipagem ou caracterização de padrões moleculares capazes de distinguir cepas que tenham ou não relação clonal. Um clone caracteriza as cepas de uma mesma espécie que possuem as mesmas características genéticas. A necessidade de avaliar esta relação é muito importante na investigação de surtos e na avaliação da disseminação clonal de um microrganismo em infecções hospitalares (Sader et al., 1995; Olive e Bean, 1999).

O “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) - Eletroforese em Campo Pulsado, é uma das técnicas mais conhecidas e utilizadas pelo poder discriminatório e pela sua aplicabilidade à maioria das espécies bacterianas. Esta técnica baseia-se na migração de fragmentos de DNA

através do uso de diversos campos elétricos gerados em posições diferentes e alternadamente (Southern e Elder, 1995).

Atualmente os isolados de PA de nossa instituição se apresentam com índices de resistência aos carbapenêmicos bastante relevantes, porém a prevalência de MBL bem com sua caracterização molecular ainda não foi estudada em nosso hospital e o presente estudo visa responder a estas questões bem como definir um método de detecção fenotípica de MBL em nosso serviço.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Determinar a prevalência e tipos de Metallo- β -lactamases em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem, isoladas de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no ano de 2005;
- Comparar a detecção de Metallo- β -lactamases por métodos fenotípicos e moleculares;
- Avaliar a clonalidade dos isolados produtores de Metallo- β -lactamases;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados incluídos no estudo;

3. MÉTODOS

3.1. Local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), um hospital universitário, de nível terciário, formado por 8 institutos, com aproximadamente 2500 leitos.

3.2. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo onde foram analisadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) resistentes ao imipenem, isoladas de hemoculturas de pacientes do complexo HC-FMUSP, no período de janeiro a dezembro de 2005.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP.

3.3. Microbiologia

3.3.1. Coleta e processamento das hemoculturas

As hemoculturas foram coletadas a critério médico e processadas no sistema automatizado Bactec 9240[®] (Becton Dickinson[®], EUA), utilizando

frascos Bactec Plus Aerobic/F[®], Bactec Plus Anaerobic/F[®] e Bactec Peds Plus/F[®], conforme rotina da Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central (DLC) do HC-FMUSP.

Os frascos de hemoculturas permaneceram incubados à 35°C sob agitação e monitorização contínua por cinco dias. As amostras positivas foram submetidas à coloração de Gram e semeadas nos meios de ágar Sangue, ágar Chocolate e ágar MacConkey para identificação.

3.3.2. Identificação dos isolados e inclusão no estudo

Conforme rotina da Seção de Microbiologia da DLC do HC-FMUSP, as cepas de PA isoladas de hemoculturas foram identificadas através crescimento em ágar MacConkey e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico das colônias, metodologias manuais convencionais como produção de pigmento característico, produção de oxidase e redução do nitrato. Os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão, de acordo com as recomendações e interpretações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), documentos M2-A8 (2003) e M100-S15 (2005).

Os isolados resistentes ao imipenem foram armazenados em caldo TSB (“Tryptic Soy Broth” - Caldo Triptcaseína de Soja) + glicerol a - 70 °C, no banco de cepas da Seção de Microbiologia.

Na ocasião do estudo, os isolados foram repicados em ágar MacConkey, e os que se apresentaram viáveis foram submetidos à re-

identificação e teste de suscetibilidade pelo método de microdiluição através do sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring®, EUA), Etest® para colistina, métodos fenotípicos e moleculares para detecção de Metallo- β -lactamases (MBL) e determinação da clonalidade dos isolados produtores de MBL.

3.3.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os isolados que se apresentaram inviáveis ou que não confirmaram identificação e perfil de resistência ao imipenem definidos inicialmente.

3.4. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

3.4.1. Método de microdiluição

Foi realizado através do sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring®, EUA), utilizando o painel Neg Combo Type 32, de acordo com as recomendações do fabricante e interpretado segundo o documento M100-S16 (CLSI, 2006).

Foram analisados os seguintes agentes antimicrobianos, nas respectivas diluições: amicacina (4-32 $\mu\text{g/mL}$), aztreonam (8-16 $\mu\text{g/mL}$), ceftazidima (2-16 $\mu\text{g/mL}$), cefepime (2-16 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (1-8 $\mu\text{g/mL}$), imipenem (4-8 $\mu\text{g/mL}$), meropenem (4-8 $\mu\text{g/mL}$), piperacilina (16, 64 $\mu\text{g/mL}$),

ciprofloxacina (1-2 µg/mL), tobramicina (1-8 µg/mL), e ticarcilina / ácido clavulânico (16, 64 µg/mL), como ilustrado na Figura 2.

C	G	P4	<u>GLU</u>	RAF	INO	<u>URE</u>	<u>LYS</u>	TDA	CIT	TAR	OF/G
NIT	K4	CI4	SUC	RHA	ADO	<u>H2S</u>	<u>ARG</u>	ESC	MAL	ACE	OF/B
2/38 T/S	Cf8	Fd64	SOR	ARA	MEL	IND	<u>ORN</u>	VP	ONPG	CET	<u>DCB</u>
4	8	16	32 Ak	4	8	16 Cfz	ESBL- a	8	16 Am	8	16 Azt
1	2	4	8 Gm	4	8	16 Crm	ESBL- b	8/4	16/8 A/S	1	2 Cp
1	2	4	8 To	8	16	64 P/T	LOC	16	64 Pi	2	4 Lvz
4	8	16	32 Cft	16	32 Ctn	8	32 Cax	16	64 Tim	2	4 Mxf
2	4	8	16 Caz	2	4	8	16 Cpe	4	8 Imp	4	8 Mer

Figura 2. Painel Neg Combo Type 32 - sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring®, EUA).

Legenda: Ak: amicacina (4-32µg/mL); Gm: gentamicina (1-8µg/mL); To:tobramicina (1-8µg/mL); Caz: ceftazidima (2-16µg/mL); Cpe: cefepime (2-16µg/mL); Pi: piperacilina (16, 64µg/mL); Tim: ticarcilina / ácido clavulânico (16, 64µg/mL); Imp: imipenem (4-8µg/mL); Azt: aztreonam (8-16µg/mL); Cp: ciprofloxacina (1-2µg/mL).

A) Preparo do inóculo

Com auxílio da agulha de inoculação, de 4 a 5 colônias foram adicionadas na suspensão Prompt-D (Dade Behring®, EUA), composta de 30

mL de NaCl 0.85%. Este sistema é utilizado para padronizar o inóculo nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição.

B) Colocação do inóculo nas placas de microdiluição

O inóculo foi despejado numa bandeja chamada calha inoculadora (Dade Behring[®], EUA), tomando o devido cuidado de que todas as cânulas estejam tomadas pelo mesmo nível da suspensão. Foi colocada a tampa com ponteiros e encaixado o sistema de inoculação Renok-D (Dade Behring[®], EUA) sobre a calha inoculadora. Cuidadosamente o inóculo foi aspirado (100 µL) e despejado no painel específico, checando se todos os poços do painel continham o mesmo volume do inóculo.

C) Leitura dos painéis

Com auxílio de uma tampa própria, denominada CoverTray (Dade Behring[®], EUA) o painel inoculado foi vedado e inserido no aparelho MicroScan WalkAway para leitura automatizada dos resultados de microdiluição. As placas ficaram à 35°C ± 2 em atmosfera ambiente por aproximadamente 48 horas.

3.4.2. Método de Etest® para colistina

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da colistina foi determinada por Etest® (AB BIODISK® - Solna, Sweden), que consiste de uma fita plástica contendo um gradiente de colistina que varia de 0.064 a 1024 µg/mL. Foi realizado conforme as recomendações do fabricante e os resultados interpretados de acordo com o documento M100-S17 (CLSI, 2007).

A) Preparo do inóculo e colocação das fitas Etest® de colistina

A suspensão bacteriana foi realizada em solução salina até atingir a turvação correspondente à escala 0.5 de McFarland e inoculada em uma placa de ágar Mueller-Hinton (MH) de 15 cm (OXOID®, EUA). As fitas foram adicionadas na placa e incubadas a 37 °C por 24 horas.

3.4.3. Controle de qualidade

Foram utilizadas cepas controles de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, para todos os testes de suscetibilidade realizados, segundo recomendações do CLSI, documento M2-A8 (2003).

3.5. Métodos fenotípicos para detecção de MBL

Foram realizados três métodos fenotípicos para detecção de MBL: Disco Aproximação (DA), Etest[®] MBL e Teste de Hodge Modificado (THM).

3.5.1. Disco Aproximação (DA)

Realizado e interpretado segundo Arakawa et al. (2000), com algumas modificações baseadas em Mendes et al. (2006).

A) Preparo do inóculo

Realizada suspensão bacteriana em solução salina até atingir a turvação correspondente à escala 0.5 de McFarland e inoculada em uma placa de ágar MH de 15 cm (OXOID[®], EUA).

B) Inibidores de MBL e substratos

Os inibidores de MBL utilizados foram o ácido 2-mercaptopropiônico (MPA), ácido 2-mercaptoacético (MAA) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) - (Sigma[®], EUA), nas respectivas concentrações, 11.2 mM, 14.4 mM, e 100 mM. Como substratos foram utilizados discos de ceftazidima (CAZ - 30 µg) e imipenem (IMP - 10 µg) - (OXOID[®], EUA).

C) Preparo dos discos de papel filtro

Os discos de papel filtro foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos para conferir esterilidade ao material. No momento do uso foram adicionados das soluções de inibidores de MBL, nas quantidades de: 3 µL dos ácidos MPA e MAA e 5 µL de EDTA.

D) Colocação dos discos na placa

Os discos de papel filtro contendo os inibidores MAA, MPA e EDTA foram adicionados no centro da placa de ágar MH previamente inoculada com a suspensão bacteriana. Ao lado deles, foram colocados os discos de CAZ e IMP a uma distância de 2 cm (centro a centro) dos discos contendo MAA e MPA e a 1 cm (centro a centro) do disco contendo EDTA, conforme representação esquemática demonstrada na Figura 3. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

E) Interpretação

Foram consideradas sugestivas de MBL as cepas que apresentaram sinergismo entre os antibióticos CAZ e/ou IMP e pelo menos um dos inibidores utilizados. Em amostras produtoras de MBL observou-se uma distorção e a ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria na região do ágar onde houve a difusão do inibidor de MBL. Em testes

negativos não se observou a alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria teste.

Figura 3. Representação esquemática das distâncias entre os discos de substratos e inibidores utilizados no método de Disco Aproximação para detecção fenotípica de Metallo- β -lactamases.

Legenda: CAZ: ceftazidima; IMP: imipenem; MPA: ácido 2-mercaptopropiônico; MAA: ácido 2-mercaptoacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

3.5.2. Etest[®] MBL

Consiste de uma fita plástica contendo imipenem (IP) em uma das extremidades, em um gradiente que varia de 4 a 256 µg/mL, e imipenem associado ao EDTA (IPI) na outra extremidade, num gradiente que varia de 1 a 64 µg/mL (AB BIODISK[®] - Solna, Sweden). Realizado e interpretado segundo instruções do fabricante.

A) Preparo do inóculo

Realizada suspensão bacteriana em solução salina até atingir a turvação correspondente à escala 0.5 de McFarland e inoculada em uma placa de ágar MH de 15 cm (OXOID[®], EUA), sendo as fitas de Etest[®] MBL adicionadas às placas e estas incubadas a 37°C por 24 horas.

B) Interpretação

Foi considerada amostra produtora de MBL quando a relação da CIM (µg/mL) entre IP/IPI foi maior ou igual a 8, ou se houve uma diminuição de 3 diluições entre IP/IPI. O aparecimento de uma zona fantasma, ou deformação da elipse, também foi considerado como sugestivo de produção de MBL.

3.5.3. Teste de Hodge Modificado (THM)

A) Preparo do Inóculo e realização do teste

Realizado e interpretado segundo Lee et al. (2001). Foi preparada uma suspensão bacteriana adicionando-se a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (“American Type Culture Collection”) em solução salina até atingir a turvação correspondente à escala 0.5 de McFarland. Esta suspensão foi inoculada em uma placa de ágar MH de 15 cm (OXOID®, EUA). Em seguida, um disco de IMP-10 µg (OXOID®, EUA) foi adicionado no centro da placa, e a partir da borda do disco, estriou-se a cepa teste em direção à borda da placa, conforme Figura 4. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

B) Interpretação

O crescimento da *E. coli* ATCC 25922 dentro do halo de inibição do imipenem formou uma zona distorcida e foi interpretada como produção de carbapenemase. Nos testes considerados negativos, o halo de inibição do imipenem permaneceu inalterado.

Figura 4. Esquema de realização do Teste de Hodge Modificado.

Legenda: ATCC: “American Type Culture Collection”; IMP: imipenem.

3.5.4. Controle de qualidade

Foram utilizadas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produtora da enzima SPM-1 (48-1997A) como controle positivo e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controle negativo para todos os métodos fenotípicos.

3.6. Método molecular para detecção de MBL

3.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A) Extração do DNA bacteriano

Uma alçada do crescimento bacteriano foi dissolvida e homogeneizada em 25 µL de água estéril, até atingir a turvação da escala 0.5 de McFarland. Na sequência, esta suspensão foi levada a 95 °C por 10 minutos para a extração do DNA bacteriano (Gales et al., 2003).

B) Preparo do Master Mix

O Master Mix foi preparado com as seguintes substâncias, nas respectivas quantidades e concentrações:

- 2 µL Tampão (10 x);
- 0.2 µL Gelatina (0,1%);
- 2 µL dNTPs (2 mM) ;
- 0.1 µL “Primer” 1 (100 mM);
- 0.1 µL “Primer” 2 (100 mM);
- 1 µL MgCl₂ (50 mM);
- 4.6 µL de água estéril livre de nucleases.

Cada reação ocorreu com um volume final de 20 μL , sendo 19 μL da suspensão (Master Mix + Taq + água) e 1 μL do DNA bacteriano extraído.

Para cada 10 μL do Master Mix, utilizamos 0,1 μL da enzima DNA Taq polimerase.

C) Condições de amplificação do DNA

Os ensaios foram realizados para amplificar seqüências dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}.

As condições para a reação de amplificação do gene *bla*_{SPM-1} segundo Gales et al. (2003) foram:

- 95°C iniciais por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de:
- desnaturação a 95°C por 1 minuto;
- anelamento a 40°C por 1 minuto;
- extensão a 68°C por 1 minuto;
- 72°C finais por 7 minutos.

Para os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} segundo Yan et al. (2001) as condições foram:

- 94°C iniciais por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de:
- desnaturação a 94°C por 1 minuto;
- anelamento a 55°C por 1 minuto;
- extensão a 72°C por 2 minutos;
- 72°C finais por 7 minutos.

D) “Primers” utilizados

As seqüências dos “primers” utilizados para a amplificação dos genes, assim como o tamanho dos produtos esperados (pb), são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - “Primers” utilizados para detecção das Metallo- β -lactamases e tamanho dos produtos esperados.

Genes	“Primers”	Produtos esperados (pb)
<i>bla</i> _{SPM-1}	5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3'	650 pb
	5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3'	
<i>bla</i> _{IMP-1}	5' TGAGCAAGTTATCTGTATTC 3'	740 pb
	5' TTAGTTGCTTGGTTTTGATG 3'	
<i>bla</i> _{IMP-2}	5' GGCAGTCGCCCTAAAACAAA 3'	737 pb
	5' TAGTTACTTGGCTGTGATGG 3'	
<i>bla</i> _{VIM-1}	5' TTATGGAGCAGCAACGATGT 3'	920 pb
	5' CAAAAGTCCCGCTCCAACGC 3'	
<i>bla</i> _{VIM-2}	5' AAAGTTATGCCGCACTCACC 3'	865 pb
	5' TGCAACTTCATGTTATGCCG 3'	

Fonte: Adaptado do artigo de Queenan e Bush. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.

E) Eletroforese

Com os produtos da PCR realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 gr agarose + 100 mL tampão) contendo 5 μ L de brometo de etídio por aproximadamente 50 minutos a 140 volts. Estes foram visualizados através de luz ultravioleta e fotografados para análise posterior.

3.6.2. Controle de qualidade

Como controle positivo foram utilizadas cepas domésticas conhecidamente produtoras de MBL, tipos SPM-1, IMP-1, IMP-2, VIM-1 e VIM-2, fornecidas pela Seção de Biologia Molecular do HC-FMUSP. Como controle negativo foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.7. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Os isolados que apresentaram resultados positivos para os genes codificadores de MBL através da PCR, foram submetidos à PFGE para avaliação da clonalidade. Foi realizado de acordo com os protocolos descritos por Kaufmann (1998) e Ridley (1998).

A) Preparo da suspensão bacteriana

As bactérias foram repicadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. De 2 a 4 colônias foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo TSB e incubados a 37°C por 24 horas. Cerca de 1 mL do caldo com crescimento bacteriano foi transferido para microtubos previamente pesados e identificados. Estes foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, o sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de solução fisiológica estéril e, após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado restando somente o “pellet” e o microtubo foi pesado em balança analítica. Adicionamos uma solução de EDTA 25 mM (pH 8.0) em volume (µL) equivalente ao peso das células do “pellet” em mg [peso do microtubo com o “pellet” – peso do microtubo vazio x 1000] para padronizar a quantidade de DNA entre os diferentes microtubos. Homogeneizamos no vórtex.

B) Preparo dos blocos de agarose

Os blocos de DNA foram obtidos pela mistura de 225 μL de tampão TEN (Tris 100 mM – pH 7.5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM) acrescidos de 25 μL da suspensão (massa bacteriana + EDTA) com 250 μL de agarose “low melting” (BioRad[®], EUA) a 2% em tampão 0.5XTBE (Tris 0.089 M; ácido bórico 0.089 M; EDTA 0.002 M). Esta mistura foi colocada em moldes específicos (BioRad[®], EUA) e refrigerados a 4°C por 15 minutos.

C) Extração do DNA bacteriano

Os blocos de agarose foram removidos dos moldes e incubados em 2 mL de tampão EC (Tris 6 mM – pH 7.5; NaCl 1 M; EDTA 0.01 M; Sarcosil 0.5%; Deoxicolato 0.2%) por 5 horas a 37°C, sob agitação suave. Após este período, o tampão foi retirado e foi acrescentado 2 mL de tampão CHEF-TE (Tris 0.1 M – pH 7.5; EDTA 0.1 M). Foi realizada uma lavagem utilizando este tampão e em seguida os blocos foram tratados “overnight” a 50°C com 100 μL de proteinase K (InVitrogen Life Technologies[®]) em 2 mL de tampão ES (EDTA 0.4 M – pH 9.3; Sarcosil 1%). Após este período de incubação os blocos foram lavados cinco vezes com 2 mL de tampão CHEF-TE sob leve agitação com intervalos de uma hora entre as lavagens. Após a última lavagem, os blocos foram guardados a 4°C.

D) Etapa da restrição enzimática

Antes de realizar o tratamento enzimático, os blocos de agarose foram lavados cinco vezes com 200 µL do tampão DNS (Tris 0.1 M – pH 8.0; Cloreto de magnésio 5 mM), com intervalos de uma hora entre as lavagens. A restrição enzimática foi realizada com 5U da enzima de restrição *SpeI* (New England BioLabs®, EUA) por amostra num período de 12 a 20 horas, a uma temperatura de incubação de 37°C.

E) Preparo do gel de agarose e eletroforese

Após remoção do tampão com a enzima de restrição, colocamos os blocos contendo o DNA em 500 µL de tampão TBE 0.5X deixando por 20 minutos e lavando mais uma vez deixando mais 20 minutos. Os blocos tratados foram inseridos em gel de agarose a 1% (em TBE 0.5X). A eletroforese foi realizada no sistema CHEF-DRII (BioRad®, EUA) e o tampão de corrida utilizado foi 3 L de TBE 0.5X. Os padrões de variação da corrente elétrica (“switch time”) foram estabelecidos de acordo com o microrganismo estudado. Para PA, as condições de corrida foram de 5 a 90 segundos (“switch time” inicial-final), 6 volts/cm (corrente elétrica) e período de corrida de 24 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (250 µL água + 12.5 µL de brometo) por 30 minutos, descorados em água destilada por mais 30 minutos, sendo visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

F) Interpretação dos resultados

As bandas foram interpretadas por inspeção visual e categorizadas em: indistinguíveis (padrão predominante), estreitamente relacionadas, possivelmente relacionadas ou diferentes, baseados nos critérios propostos por Tenover et al. (1995), Tabela 3.

Tabela 3 - Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular.

Interpretação microbiológica baseada nos resultados de tipagem	Número de diferenças genéticas comparadas com determinado isolado	Número de fragmentos diferentes comparados ao padrão de determinado isolado	Correlação epidemiológica
Indistinguíveis	0	0	Isolado faz parte do surto
Estreitamente relacionados	1	2-3	Isolado provavelmente faz parte do surto
Possivelmente relacionados	2	4-6	Isolado possivelmente faz parte do surto
Diferentes	3	≥ 7	Isolado não faz parte do surto

Fonte: Tenover et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.

3.8. Análise Estatística

Para aferir o desempenho dos métodos fenotípicos, avaliamos a sensibilidade, especificidade, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e índice kappa, calculado para medir a concordância entre os métodos fenotípicos e a PCR, estabelecida como padrão ouro na detecção de MBL.

Os dados foram digitados em planilha Excel e posteriormente transferidos para o programa BioEstat versão 3.0 (Ayres et al., 2003), para cálculo do índice kappa. Sua interpretação é descrita na Tabela 4 (Vieira e Garrett, 2005).

Tabela 4 - Interpretação do índice kappa.

Índice kappa	Concordância entre os métodos
< 0	Menor que o esperado pelo acaso
0.01 – 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Ligeira
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Substancial
0.81 - 1	Excelente

Fonte: Viera e Garrett. Understanding interobserver agreement: The Kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37:360-3.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Durante o período estudado, foram isoladas 238 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Destas, oitenta e duas (34.5%) apresentaram resistência ao imipenem e 13 foram excluídas, pois perderam a viabilidade. Desta forma, 69 isolados foram então avaliados neste estudo. A distribuição cronológica destes isolados e suas respectivas clínicas de origem, estão ilustradas, respectivamente, nas Figuras 5 e 6.

Figura 5. Distribuição cronológica das 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.

Figura 6. Distribuição das clínicas de origem das 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.

Legenda: A1MR: ambulatório do serviço de nefrologia; ATMO: ambulatório do transplante de medula óssea; E1MH: enfermaria do serviço de hematologia; E2CL: enfermaria do serviço de cirurgia laparoscópica; EICO: enfermaria do incor; EMIN: enfermaria da clínica de moléstias infecciosas e parasitárias; EURO: enfermaria da clínica de urologia; U1CC: UTI da clínica cirúrgica I; U1MR: UTI do serviço de nefrologia; UMIN: UTI da clínica de moléstias infecciosas e parasitárias; UPSM: UTI do serviço da clínica médica de urgência.

4.1. Perfil geral de suscetibilidade

O teste de suscetibilidade por microdiluição confirmou em 100% a resistência ao imipenem nos 69 isolados incluídos no estudo, entre eles,

cinco apresentaram sensibilidade ao meropenem. Os antibióticos mais ativos frente a estes isolados foram a colistina, a piperacilina e os aminoglicosídeos, com sensibilidade de 94.2%, 47.8% e 43.5%, respectivamente. O aztreonam mostrou 40.6% de sensibilidade frente aos isolados incluídos no estudo. A ceftazidima e o cefepime foram os β -lactâmicos que mostraram a mais baixa suscetibilidade frente aos isolados resistentes aos carbapenêmicos, com 14.5% e 13% de sensibilidade, respectivamente. O perfil de sensibilidade dos isolados frente a todos os antimicrobianos analisados pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Perfil de sensibilidade das 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do HC-FMUSP no ano de 2005.

Legenda: ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; AK: amicacina; CN: gentamicina; TOB: tobramicina; IMP: imipenem; MEM: meropenem; CIP: ciprofloxacina; PIP: piperacilina; TIC/AC: ticarcilina/ácido clavulânico e CT: colistina.

Quatro isolados mostraram sensibilidade reduzida a colistina. Dentre eles, três apresentaram CIM de 6 $\mu\text{g/mL}$ e um apresentou CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados podem ser observados na Figura 8.

Figura 8. Amostras 56, 59, 60 e 63 demonstrando suscetibilidade reduzida à colistina.

4.2. Métodos fenotípicos para detecção de MBL

4.2.1. Disco Aproximação (DA)

Cinquenta e três (76.8%) cepas apresentaram sinergismo com pelo menos uma das combinações de substrato-inibidor e foram consideradas positivas por DA. A combinação IMP-EDTA foi positiva em 98.1% dos isolados (52/53) e a combinação IMP-MPA foi positiva em 13.2% (7/53) dos isolados positivos por DA. Dezesesseis isolados (23.2%) foram considerados negativos para a produção de MBL pelo método de DA.

Os resultados individuais dos isolados testados por DA estão no Anexo A. A positividade das combinações substrato-inibidor está sumarizada na Tabela 5 e o resultado das diferentes combinações substrato-inibidor para cada isolado positivo por DA, apresenta-se no Anexo B.

Tabela 5 - Positividade das combinações substrato-inibidor utilizadas no método de Disco Aproximação para detecção fenotípica de Metallo- β -lactamases em 53 cepas de *P. aeruginosa*.

Combinação	Nº de cepas positivas	%
IMP + EDTA	52	98.1%
CAZ + EDTA	47	88.7%
CAZ + MAA	27	50.9%
CAZ + MPA	23	43.4%
IMP + MAA	19	35.8%
IMP + MPA	7	13.2%

IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; MAA: ácido 2-mercaptoacetato; MPA: ácido 2-mercaptopropiônico; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

As Figuras 9 e 10 exemplificam, respectivamente, uma amostra positiva e uma negativa pelo método de DA.

Figura 9. Disco Aproximação positivo: distorção e a ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria teste.

Figura 10. Disco Aproximação negativo: não houve alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria teste.

4.2.2. Etest® MBL

Cinqüenta e três isolados (76.8%) foram positivos pelo método de Etest® MBL e dezesseis isolados (23.2%) foram negativos para produção de MBL por este método. As Figuras 11 e 12 exemplificam, respectivamente, uma amostra positiva e uma negativa pelo método de Etest® MBL.

Os resultados individuais dos isolados testados pelo método de Etest® MBL apresentam-se no Anexo A.

Figura 11. Etest® MBL positivo: relação da CIM de IP/IPI ≥ 8 .

Figura 12. Etest® MBL negativo: não demonstrou relação da CIM de IP/IPI ≥ 8 .

4.2.3. Teste de Hodge Modificado (THM)

Dezenove isolados (27.5%) foram positivos pelo THM e cinquenta isolados (72.5%) foram negativos. As Figuras 13 e 14 exemplificam, respectivamente, uma amostra positiva e uma negativa pelo THM.

Os resultados individuais dos isolados testados pelo THM apresentam-se no Anexo A.

Figura 13. Teste de Hodge Modificado positivo: distorção na zona de inibição do imipenem.

Figura 14. Teste de Hodge Modificado negativo: zona de inibição do imipenem inalterada.

4.3. Método molecular para detecção de MBL

4.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Vinte e um isolados (30.4%) foram positivos pela PCR, sendo que o gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em 17 (81%) isolados, e o gene *bla*_{VIM-2} detectado em quatro isolados (19%). Os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2} e *bla*_{VIM-1} não foram detectados entre os isolados estudados. Em 48 (69.6%) isolados, nenhum dos genes pesquisados foi identificado.

Os resultados individuais dos isolados testados por PCR apresentam-se no Anexo A.

As Figuras 15 a 25, ilustram as fotos das PCRs com 17 amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, e quatro amostras produtoras do gene *bla*_{VIM-2} e podem ser visualizadas no Anexo C.

4.4. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Entre os 17 isolados que demonstraram a presença do gene *bla*_{SPM-1}, cinco apresentaram um mesmo padrão molecular denominado padrão predominante ou padrão A. Onze isolados demonstraram padrões distintos do padrão A e foram considerados estreitamente relacionados ao padrão predominante, e um isolado foi classificado como possivelmente relacionado ao padrão predominante A, como demonstra a Figura 26.

Figura 26. Padrões moleculares encontrados em 17 isolados de *P. aeruginosa* produtores do gene *bla*_{SPM-1}.

Legenda: isolados 28, 29, 39, 41, 49 (amarelo) padrão predominante A; isolados 6, 20 e 24 (azul), 45, 46 e 57 (vermelho), 54, 56 e 69 (verde), e 60 e 67 (rosa), estreitamente relacionados; isolado 66 (laranja) possivelmente relacionado; PM: peso molecular.

Entre os quatro isolados produtores do gene *bla*_{VIM-2}, dois isolados apresentaram um mesmo padrão molecular denominado padrão predominante ou padrão B. Um isolado apresentou um padrão distinto do padrão B, e foi considerado estreitamente relacionado ao padrão predominante e um isolado foi classificado como diferente do padrão predominante B, como demonstra a Figura 27.

Figura 27. Padrões moleculares encontrados em quatro isolados de *P. aeruginosa* produtores do gene *bla*_{VIM-2}.

Legenda: isolados 26 e 55 (amarelo) padrão predominante B; isolado 43 (azul) estreitamente relacionado; isolado 21 (vermelho) diferente; PM: peso molecular.

A Tabela 6 sumariza o resultado da análise molecular por PFGE, e as respectivas clínicas de origem dos 21 isolados de PA produtores de MBL. Os resultados individuais para cada isolado testado por PFGE são observados no Anexo A.

Tabela 6 - Resultado da análise molecular por Eletroforese em Campo Pulsado dos 21 isolados de *P. aeruginosa* produtores de Metallo- β -lactamases e suas respectivas clínicas de origem.

Amostra	PCR	Padrão Molecular	Clínica de isolamento
6	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	E1MH
20	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	EICO
21	<i>bla</i> _{VIM-2}	Diferente (B)	U1MH
24	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	EICO
26	<i>bla</i> _{VIM-2}	Padrão predominante B	UQUE
28	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A	EICO
29	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A	EICO
39	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A	UPSM
41	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A	UPSM
43	<i>bla</i> _{VIM-2}	Estreitamente relacionado (B)	E1MH
45	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	UPSM
46	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	UPSM
49	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A	EICO
54	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	EICO
55	<i>bla</i> _{VIM-2}	Padrão predominante B	ATMO
56	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	EICO
57	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	E1MH
60	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	EICO
66	<i>bla</i> _{SPM-1}	Possivelmente relacionado (A)	EUTR
67	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	EICO
69	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)	U1CC

E1MH: enfermaria do serviço de hematologia; EICO: enfermaria do incor; UPSM: UTI do serviço de clínica médica de urgência; EUTR: enfermaria do serviço de transplante renal; U1CC: UTI da clínica cirúrgica I; U1MH: UTI do serviço de hematologia; UQUE: UTI do serviço de queimados; ATMO: ambulatório do transplante de medula óssea.

As Figuras 28 e 29 demonstram a distribuição das clínicas de origem dos 21 isolados produtores de MBL.

Figura 28. Distribuição das clínicas de origem dos 17 isolados de *P. aeruginosa* produtores do gene *bla*_{SPM-1}.

Legenda: E1MH: enfermaria do serviço de hematologia; EICO: enfermaria do incor; EUTR: enfermaria do serviço de transplante renal; U1CC: UTI da clínica cirúrgica I; UPSM: UTI do serviço de clínica médica de urgência.

Figura 29. Distribuição das clínicas de origem dos quatro isolados de *P. aeruginosa* produtores do gene *bla*_{VIM-2}.

Legenda: ATMO: ambulatório do transplante de medula óssea; E1MH: enfermaria do serviço de hematologia; U1MH: UTI do serviço de hematologia; UQUE: UTI do serviço de queimados.

4.5. Análise dos resultados

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), assim como a concordância (índice Kappa) dos métodos de Disco Aproximação (DA), Etest® MBL e Teste de Hodge Modificado (THM) para detecção dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-2} em relação à PCR, estão resumidos na Tabela 7. Os cálculos que deram origem à estes resultados estão disponíveis no Anexo D.

Tabela 7 - Comparação entre os métodos fenotípicos e a Reação em Cadeia da Polimerase na detecção de Metallo- β -lactamases entre os 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isolados de hemoculturas do HC-FMUSP no ano de 2005.

Métodos Fenotípicos (+)	PCR (padrão ouro)					Kappa
	Genes (+)	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	
IMP-EDTA (52)	<i>bla</i> _{SPM-1}	100	32.7	32.7	100	0.19
	<i>bla</i> _{VIM-2}	100	26.2	7.7	100	0.04
	Ambos	100	35.4	40.4	100	0.25
IMP-MAA (19)	<i>bla</i> _{SPM-1}	100	96.2	89.5	100	0.92
	<i>bla</i> _{VIM-2}	25	72.3	5.3	94	-0.009
	Ambos	85.7	97.9	94.7	94	0.86
IMP-MPA (7)	<i>bla</i> _{SPM-1}	35.3	98.1	85.7	82.3	0.42
	<i>bla</i> _{VIM-2}	25	90.8	14.3	95.2	0.12
	Ambos	33.3	100	100	77.4	0.41
CAZ-EDTA (47)	<i>bla</i> _{SPM-1}	94.1	40.4	34	95.5	0.22
	<i>bla</i> _{VIM-2}	100	33.8	8.5	100	0.06
	Ambos	95.2	43.8	42.6	95.5	0.29
CAZ-MAA (27)	<i>bla</i> _{SPM-1}	100	80.8	62.9	100	0.67
	<i>bla</i> _{VIM-2}	100	64.6	14.8	100	0.17
	Ambos	100	87.5	77.8	100	0.81
CAZ-MPA (23)	<i>bla</i> _{SPM-1}	70.6	78.8	52.2	89.1	0.44
	<i>bla</i> _{VIM-2}	100	70.8	17.4	100	0.22
	Ambos	76.2	85.4	69.6	89.1	0.60
Etest® MBL (53)	<i>bla</i> _{SPM-1}	100	30.8	32.1	100	0.17
	<i>bla</i> _{VIM-2}	100	24.6	7.5	100	0.04
	Ambos	100	33.3	39.6	100	0.23
THM (19)	<i>bla</i> _{SPM-1}	82.4	90.4	73.7	94	0.70
	<i>bla</i> _{VIM-2}	75	75.4	15.8	98	0.18
	Ambos	80.9	95.8	89.5	92	0.79

IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; MAA: ácido mercaptoacético; MPA: ácido 2-mercaptopropiônico; THM: Teste de Hodge Modificado; S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Os métodos de Etest[®] MBL e DA, utilizando o EDTA como inibidor de MBL (IMP-EDTA e CAZ-EDTA), demonstraram sensibilidade elevada, baixa especificidade e valores de kappa muito baixos, indicando pobre correlação com a PCR na detecção de ambas enzimas, assim como na detecção isolada de SPM-1 e/ou VIM-2.

O método de DA, utilizando o MAA como inibidor (IMP-MAA e CAZ-MAA), e o THM, demonstraram boa sensibilidade e especificidade, com elevados valores de kappa, demonstrando excelente correlação com a PCR na detecção fenotípica de ambas enzimas, assim como na detecção isolada da enzima SPM-1. No caso da detecção fenotípica de VIM-2, os valores de sensibilidade e especificidade mais elevados foram encontrados com o inibidor MPA.

4.6. Perfil de suscetibilidade dos isolados produtores e não produtores de MBL

A Figura 30 ilustra o perfil de sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos de acordo com a produção de MBL. Em cepas produtoras de MBL (n=21), tivemos 100% de resistência a ceftazidima, cefepime, gentamicina, ciprofloxacina, meropenem e tobramicina. A colistina e o aztreonam foram os antibióticos mais ativos frente a estes isolados, com 90.5% e 85.7% de sensibilidade, respectivamente. Dentre eles, dois isolados

apresentaram CIM intermediários a colistina (4 e 6 µg/mL). Entre os isolados não produtores de MBL (n=48) os antibióticos mais ativos foram a colistina, tobramicina, amicacina e gentamicina, com 95.8%, 62.5%, 60.4% e 50% de sensibilidade, respectivamente. Cinco isolados não produtores de MBL (10.4%) que apresentaram resistência ao imipenem, foram sensíveis ao meropenem.

Figura 30. Comparação entre o perfil de sensibilidade dos isolados produtores e não produtores de Metallo-β-lactamases.

Legenda: ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; AK: amicacina; CN: gentamicina; TOB: tobramicina; IMP: imipenem; MEM: meropenem; CIP: ciprofloxacina; PIP: piperacilina; TIC/AC: ticarcilina/ácido clavulânico e CT: colistina.

A tabela 8 resume o perfil de sensibilidade de todos os isolados incluídos no estudo, assim como a análise decomposta de acordo com a produção de MBL.

Tabela 8 - Perfil de sensibilidade das 69 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de hemoculturas e dos isolados produtores e não produtores de Metallo- β -lactamases.

Antimicrobianos	Perfil de Sensibilidade (%)		
	Total (n=69)	MBL positiva (n=21)	MBL negativa (n=48)
Aztreonam	40.6%	85.7%	20.8%
Ceftazidima	14.5%	0%	20.8%
Cefepime	13%	0%	18.8%
Amicacina	43.5%	4.8%	60.4%
Gentamicina	34.8%	0%	50%
Tobramicina	43.5%	0%	62.5%
Imipenem	0%	0%	0%
Meropenem	7.2%	0%	10.4%
Ciprofloxacina	14.5%	0%	20.8%
Piperacilina	47.8%	76.2%	35.4%
Ticarcilina / Ácido Clavulânico	29.9%	33.3%	27.1%
Colistina	94.2%	90.5%	95.8%

O anexo E apresenta dados referentes às clínicas de isolamento, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por microdiluição e Etest[®] para colistina, Disco Aproximação, Etest[®] MBL, Teste de Hodge Modificado, Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese em Campo Pulsado das 69 cepas de PA resistentes ao imipenem, isoladas de hemoculturas do HC-FMUSP no ano de 2005.

5. DISCUSSÃO

Os isolados de *P. aeruginosa* (PA) provenientes de hemoculturas no ano de 2005, dos pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), apresentaram 34.5% de resistência ao imipenem, índice bastante preocupante, uma vez que este antimicrobiano é usualmente utilizado empiricamente como primeira escolha em infecções graves causadas por PA. Estudos de vigilância realizados na América Latina também apontam para uma resistência elevada a este antimicrobiano relatando taxas de 44.8% de resistência ao imipenem entre os isolados brasileiros (Sader et al., 2005a).

A resistência aos carbapenêmicos em PA pode ser decorrente de múltiplos mecanismos (Livermore, 1992; Livermore, 2001), dentre eles, a produção de enzimas, incluindo as Metallo- β -lactamases (MBL), que em nosso estudo foi detectada em 30.4% dos isolados de PA resistentes ao imipenem. A resistência em PA causada por MBL tem aumentado significativamente, sendo responsável por até 40% dos casos de resistência aos carbapenêmicos, com uma ampla disseminação mundial (Walsh et al., 2005).

A prevalência de PA produtora de MBL entre as publicações brasileiras, varia de 7.5% à 44% entre as diferentes regiões geográficas, sendo a mais baixa prevalência reportada na região Norte do país (Sader et al., 2005b; Gales et al., 2003; Martins et al., 2007; Vieira et al., 2005; Marra et al., 2006). Em estudo realizado em São Paulo com isolados de hemoculturas

de 2000 e 2001, foi relatada uma das mais altas prevalências, onde 43.9% das PA resistentes ao imipenem foram produtoras de MBL, sendo que destas, 55.6% eram produtoras da enzima SPM-1, 30.6% de VIM-2 e 8.3% de IMP-1 (Sader et al., 2005b).

A enzima SPM-1 descrita por Toleman et al. (2002) é a enzima mais freqüente no Brasil (Sader et al., 2005b; Gales et al., 2003; Marra et al. 2006), e em nosso estudo, foi detectada em 81% dos isolados produtores de MBL, seguida da enzima VIM-2, detectada em 19% dos casos. Até o momento, não há dados publicados sobre a existência da enzima SPM-1 fora do Brasil, seu país de origem (Queenan e Bush, 2007), no entanto, a enzima VIM-2 tem se destacado e pode ser encontrada em 37 países e 5 continentes (Walsh, 2008), sendo considerada a segunda enzima mais freqüente também por alguns estudos brasileiros (Sader et al., 2005a; Sader et al., 2005b). Estes resultados indicam uma disseminação de genes codificadores de MBL, não só no Brasil, mas também mundialmente (Gales et al., 2003).

Entre os genes pesquisados no presente estudo, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2} e *bla*_{VIM-1} não foram detectados. No entanto, o gene *bla*_{IMP-1} tem sido detectado por outros estudos brasileiros como uma das MBLs mais freqüentes entre PA resistentes aos carbapenêmicos (Sader et al., 2005a; Martins et al., 2007; Marra et al., 2006).

O perfil de suscetibilidade dos 69 isolados de PA do HC-FMUSP demonstrou altos níveis de resistência à maioria dos antimicrobianos analisados, onde os mais ativos foram a colistina, a piperacilina e os

aminoglicosídeos, mesmo perfil observado por Sader et al. (2005b). Quando analisamos somente os isolados produtores de MBL, estes apresentaram fenótipo multiresistente com 100% de resistência à ceftazidima, cefepime, gentamicina, tobramicina, meropenem e ciprofloxacina. A multiresistência em PA podem ser explicada pelo fato de que grande parte dos genes codificadores de MBL está associada a um ou mais genes de resistência aos aminoglicosídeos ou β -lactâmicos (Toleman et al., 2005).

Os isolados produtores de MBL são freqüentemente resistentes à todas as opções de tratamento, logo, drogas como a colistina acabam sendo utilizadas com bastante freqüência como escolha terapêutica (Fritsche et al., 2005). Em nosso estudo, a colistina foi o antimicrobiano mais ativo frente aos isolados produtores de MBL com 90.5% de sensibilidade onde, dois isolados demonstraram Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 4 e 6 $\mu\text{g/mL}$, determinados por Etest[®]. Estes valores de CIM foram reavaliados e os resultados confirmados, no entanto, vale ressaltar que isolados de PA intermediários ou resistentes a colistina são ainda raros. Apesar do Etest[®] ser uma metodologia validada, existem estudos que demonstram uma possível elevação das CIMs da colistina quando comparada com métodos tradicionais de microdiluição em caldo (van der Heijden, 2005).

O aztreonam foi o segundo agente antimicrobiano que demonstrou maior atividade “in vitro” entre os isolados de PA produtores de MBL, com índice de sensibilidade de 85.7%. Este perfil é compatível com a produção de MBL pois o aztreonam não é hidrolisado por estas β -lactamases (Walsh et al., 2005). No entanto, 14.3% dos isolados produtores de MBL foram

resistentes ou intermediários ao aztreonam, sugerindo possível associação com outros mecanismos de resistência em nossos isolados, como produção de ESBL (β -lactamase de espectro estendido) (Toleman et al., 2002).

Quarenta e oito isolados (69.9%) de PA resistentes ao imipenem, neste estudo, não foi produtora de MBL. Dentre eles, cinco foram sensíveis ao meropenem. A resistência aos carbapenêmicos em PA, além de estar relacionada à produção de carbapenemases, pode ser resultado de múltiplos mecanismos de resistência (Livermore, 1992; Livermore, 2001), e a sensibilidade ao meropenem sugere mecanismos relacionados à perda de porinas específicas e não à produção de enzimas.

A inconsistência entre a presença do gene MBL e a resistência aos carbapenêmicos pode causar um problema na interpretação da detecção fenotípica de isolados produtores de MBL (Livermore e Woodford, 2000). Embora as MBLs tenham atividade hidrolítica entre os carbapenêmicos, a correlação entre a presença do gene MBL e o perfil fenotípico é freqüentemente imperfeita e alguns isolados produtores de MBL tem sido reportados como sensíveis aos carbapenêmicos (Yan et al., 2001; Martins et al., 2007), por isso, métodos de “screening” de MBL não devem ser limitados a isolados resistentes ao imipenem (Franklin et al., 2006). Em nosso estudo, todos os isolados produtores de MBL, além da resistência aos carbapenêmicos, também demonstraram resistência às cefalosporinas e aminoglicosídeos. Em contraste, a resistência somente ao imipenem não foi associada com a presença de nenhum dos genes de MBL pesquisados. Percebemos então que, tais fenótipos são um indicativo preliminar de

produção de MBL, que poderia ser ajustado de acordo com o perfil fenotípico encontrado em cada instituição.

A detecção de MBL por PCR é considerada padrão ouro, no entanto, possui custo mais elevado que os métodos fenotípicos e requer instrumentos e pessoal especializado, tornando mais difícil a implementação destes testes na rotina de laboratórios de microbiologia clínica (Walsh et al., 2005). Por este motivo, a detecção fenotípica de MBL é mais facilmente aplicável, podendo auxiliar na racionalização do uso de antimicrobianos e nas medidas para controle de infecções.

Testes fenotípicos com alta sensibilidade e especificidade e de fácil de realização são desejáveis e necessários, no entanto, a detecção fenotípica de MBL ainda é controversa na literatura e não existe padronização pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) ou por outro grupo oficial desta área. Esta dificuldade pode estar relacionada às variações inerentes ao tipo de bactéria produtora de MBL, tipo e concentração dos inibidores utilizados no teste e o tipo de enzima mais prevalente em cada região geográfica.

Considerando a PCR como padrão ouro, quando analisamos em nosso estudo a performance dos testes fenotípicos na detecção das enzimas SPM-1 e VIM-2, o método de DA demonstrou os melhores resultados com as combinações CAZ-MAA e IMP-MAA, com sensibilidade de 100% e 85.7% e especificidade de 87.5% e 97.9%, respectivamente. Estes resultados são contrastantes com trabalhos publicados, onde a combinação CAZ-MPA demonstrou os melhores resultados na detecção fenotípica de MBL (Picão et

al., 2008, Arakawa et al., 2000). No entanto, temos que ter cautela na comparação destes dados, pois Arakawa et al. (2000), obtiveram estes resultados analisando apenas isolados produtores do gene *bla*_{IMP-1}, que podem apresentar características fenotípicas diferentes dos genes detectados em nosso estudo. Temos ainda que levar em consideração que no trabalho publicado por Picão et al. (2008), o inibidor MPA, que apresentou os melhores resultados, foi utilizado na concentração de 1.4 mM, e em nosso estudo este inibidor foi utilizado na concentração de 11.2 mM, ou seja, não diluído, como publicado por Arakawa et al. (2000). E sabe-se que dependendo da concentração testada, os inibidores de MBL podem possuir seus próprios efeitos bactericidas, que podem resultar em zonas de inibição expandidas, não associadas com a verdadeira produção de MBL (Picão et al., 2008). Esta diferença na concentração do MPA poderia explicar as diferenças encontradas entre os resultados obtidos.

Quando analisamos a detecção fenotípica da enzima SPM-1 por DA observamos que as combinações IMP-MAA e CAZ-MAA também obtiveram excelente sensibilidade (ambas com 100%) e elevada especificidade, 96.2% e 80.8%, respectivamente, reforçando o que foi publicado por Picão et al. (2008). Quanto à detecção da enzima VIM-2, a combinação CAZ-MPA demonstrou sensibilidade de 100% e especificidade de 70.8%, reforçando o que já foi relatado por alguns autores, onde esta combinação seria uma boa opção na detecção fenotípica de MBL do tipo VIM-2 através do método de DA (Yan et al., 2001).

Os índices de kappa mais baixos foram encontrados com as combinações IMP-EDTA, CAZ-EDTA e com o método Etest® MBL indicando baixa concordância com a PCR, e estas mesmas combinações, utilizando o EDTA como inibidor, demonstraram respectivamente, 59.6%, 57.4% e 60.4% de falsos positivos na detecção fenotípica de MBL em PA. Martins et al. (2007), relatou um percentual de 30.3% de falsos positivos na detecção fenotípica de MBL utilizando estas metodologias. Marra et al. (2006), publicou que dos 23 isolados de PA produtores de MBL utilizando EDTA, apenas seis também foram positivos com o inibidor MPA e somente sete isolados confirmaram a presença de MBL por PCR. Uma consideração a ser feita com relação ao EDTA, é que este inibidor possui seu próprio efeito bactericida, no entanto, este efeito não foi observado em nosso estudo, pois a concentração utilizada foi de 100 mM, que de acordo com Picão et al. (2008), é a concentração que leva ao mais baixo nível de inibição do crescimento bacteriano. O EDTA pode também agir na permeabilidade da membrana, criando um ambiente favorável para o imipenem e assim ter um maior efeito sobre PA, diminuindo sua CIM sem ser resultado da inibição de uma MBL (Denny et al., 2003; Baxter e Lambert, 1997). Além disso, pode ter ação sobre outras carbapenemases como as Oxacilinases (Danel et al., 2005). Alguns destes fatores pode ter ocasionado os resultados falsos positivos para produção de MBL através dos métodos de DA utilizando EDTA e Etest® MBL entre nossos isolados.

As diferenças entre nossos resultados e os dados encontrados em outras publicações, poderiam também ser explicadas pelo fato do zinco ter

um efeito direto sobre o imipenem, favorecendo sua hidrólise (Denny et al., 2003; Baxter e Lambert, 1997). O ágar Mueller-Hinton contém concentrações variáveis de zinco, dependendo da marca e do lote, podendo afetar a acurácia da detecção de MBL e fornecer diferentes resultados entre os trabalhos (Walsh et al., 2002).

O DA é um método simples de realizar, de baixo custo e que pode ser incorporado facilmente à rotina de um laboratório de microbiologia, onde um disco contendo o inibidor pode ser colocado na placa do antibiograma de rotina a 2 cm de distância dos discos de imipenem e ceftazidima (Picão et al., 2008). Uma das desvantagens deste método é a interpretação subjetiva e a conservação dos inibidores utilizados que são voláteis e odoríferos.

O método de Etest[®] MBL apesar de fácil execução pode ser usado apenas para detecção em isolados resistentes ao imipenem, e as fitas de Etest[®] têm um alto custo. Por essa razão, este método pode não ter custo efetivo para instituições onde a prevalência de MBL entre isolados resistentes ao imipenem é baixa (Yan et al., 2004).

O método de DA e o Etest[®] MBL também foram avaliados por Chu et al. (2005), que consideraram os métodos utilizando EDTA altamente sensíveis, mas com baixa especificidade, superestimando assim o número de isolados produtores de MBL, recomendando cautela em classificar isolados como produtores de MBL utilizando apenas estas metodologias.

O Teste de Hodge Modificado (THM) é utilizado para “screening” da atividade carbapenemase, não especificamente das enzimas do tipo MBL, sendo que, outras enzimas como as Oxacilinases e enzimas do Grupo A de

Ambler (1980) são passíveis de serem detectadas por este método (Lee et al., 2003). Em nosso estudo, esta metodologia apresentou 80.9% de sensibilidade e 95.8% de especificidade, demonstrando uma alta concordância com a PCR com um valor de kappa de 0.79. Lee et al. (2001) avaliaram esta metodologia e obtiveram ótimos resultados, indicando a possibilidade de sua utilização na rotina de laboratórios clínicos como um bom indicador de produção de carbapenemases. Em nosso estudo, o THM foi negativo em quatro isolados de PA que foram detectados como produtores de MBL por PCR. Falsos negativos pelo THM são descritos e alguns autores sugerem a adição de 10 µL de uma solução de sulfato de zinco a 50 mM ao disco de imipenem ou utilizar ágar MH com sulfato de zinco numa concentração final de 70 µg/mL para minimizar este falso resultado (Lee et al., 2003).

A seleção do melhor método de “screening” para MBL deve ser baseada no tipo de bactéria pesquisada, na prevalência local dos produtores de MBL e na habilidade dos técnicos para interpretar corretamente a detecção fenotípica de MBL.

A tipagem molecular vem sendo amplamente utilizada como ferramenta importante para auxiliar o entendimento e controle das infecções nosocomiais. Os resultados deste estudo mostraram que a presença de diferentes grupos de PA multiresistentes pode ser facilmente identificada por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) e o conhecimento da distribuição geográfica destes microrganismos pode levar a um melhor entendimento da disseminação da resistência bacteriana e favorecer seu controle.

A análise molecular das PA do HC-FMUSP por PFGE, baseada nos critérios propostos por Tenover et al. (1995) evidenciou que, entre os 17 produtores do gene *bla*_{SPM-1}, houve a presença de cinco isolados com um padrão predominante, denominado padrão A, 11 isolados estreitamente relacionados e um isolado possivelmente relacionado ao padrão predominante A. Nove destas PA eram provenientes de uma mesma clínica do Complexo HC-FMUSP, mas foram isoladas em distintos meses no ano de 2005. Entre os produtores do gene *bla*_{VIM-2}, dois isolados apresentaram um padrão predominante, denominado padrão B, um isolado foi considerado estreitamente relacionado e um diferente do padrão predominante B, todos de distintas clínicas de origem. Em estudo realizado por Pellegrino et al. (2002), foi caracterizada a presença de um genótipo predominante em isolados de PA produtores de MBL multiresistentes em 27% dos isolados obtidos de quatro hospitais privados do Rio de Janeiro. Em outro estudo publicado por Gales et al. (2003), analisando 43 isolados de PA resistentes aos carbapenêmicos coletados de 12 hospitais brasileiros, 39.5% dos isolados demonstraram um mesmo padrão genotípico, evidenciando um padrão clonal de PA resistente aos carbapenêmicos e produtores de MBL entre diferentes hospitais brasileiros.

A possível existência de um genótipo predominante entre nossos isolados, reforça a importância de medidas de intervenção que diminuam a infecção cruzada, como isolamento de contato, melhor adequação da área física das clínicas do complexo e maior aderência às medidas básicas de controle de infecção hospitalar.

A detecção precoce de isolados produtores de MBL pode ser de extrema importância para minimizar a ampla disseminação intra-hospitalar destes isolados, pois a maioria dos genes codificadores de MBL estão em elementos genéticos de alta mobilidade. Além disso, uma vez que as MBLs hidrolisam todas as classes de β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e que a implementação de um inibidor de MBL terapêutico aparece ainda como promessa distante, sua contínua disseminação entre diferentes tipos de bactérias pode ocasionar uma catástrofe terapêutica.

O conhecimento da prevalência e tipos de MBL poderá trazer subsídios para políticas no uso racional de antibióticos e medidas de controle de infecção com o intuito de prevenir a disseminação desses genes de resistência no complexo hospitalar HC-FMUSP.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A prevalência de Metallo- β -lactamases entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas de pacientes do complexo HC-FMUSP no ano de 2005, foi de 30.4%, sendo detectadas as enzimas do tipo SPM-1 e VIM-2;
- Comparados aos métodos moleculares, a Disco Aproximação utilizando o ácido 2-mercaptoacético como inibidor, e o Teste de Hodge Modificado apresentaram a melhor sensibilidade e especificidade na detecção fenotípica de Metallo- β -lactamases;
- Os isolados produtores de Metallo- β -lactamases apresentaram um padrão clonal, com distribuição homogênea ao longo do ano, no entanto, a maioria dos casos foi proveniente de uma mesma clínica do complexo HC-FMUSP;
- Os isolados produtores de Metallo- β -lactamases demonstraram um fenótipo multiresistente, sendo a colistina e o aztreonam as drogas com maior ação “in vitro” frente à estes isolados;

7. ANEXOS

Anexo A - Resultado dos métodos de Disco Aproximação, Etest® MBL, Teste de Hodge Modificado, Reação em Cadeia da Polimerase e tipagem molecular por Eletroforese em Campo Pulsado para as 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas no HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	DA	Etest® MBL	THM	PCR	PFGE
1	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
2	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
3	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
4	positiva	positiva	positiva	negativa	NR
5	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
6	positiva	positiva	negativa	<i>bla_{SPM-1}</i>	Estreitamente relacionado (A)
7	negativa	negativa	negativa	negativa	
8	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
9	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
10	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
11	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
12	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
13	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
14	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
15	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
16	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
17	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
18	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
19	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
20	positiva	positiva	negativa	<i>bla_{SPM-1}</i>	Estreitamente relacionado (A) Diferente (B)
21	positiva	positiva	negativa	<i>bla_{VIM-2}</i>	
22	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
23	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
24	positiva	positiva	positiva	<i>bla_{SPM-1}</i>	Estreitamente relacionado (A)
25	positiva	positiva	negativa	negativa	
26	positiva	positiva	positiva	<i>bla_{VIM-2}</i>	Padrão Predominante B
27	negativa	negativa	negativa	negativa	
28	positiva	positiva	positiva	<i>bla_{SPM-1}</i>	Padrão Predominante A
29	positiva	positiva	positiva	<i>bla_{SPM-1}</i>	
30	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
31	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
32	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
33	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
34	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
35	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
36	positiva	positiva	negativa	negativa	NR

“continua”

Anexo A - “Conclusão”. Resultado dos métodos de Disco Aproximação, Etest® MBL, Teste de Hodge Modificado, Reação em Cadeia da Polimerase e tipagem molecular por Eletroforese em Campo Pulsado para as 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas no HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	DA	Etest® MBL	THM	PCR	PFGE
37	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
38	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
39	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A
40	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
41	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A
42	positiva	positiva	positiva	negativa	NR
43	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{VIM-2}	Estreitamente relacionado (B)
44	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
45	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
46	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
47	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
48	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
49	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Padrão Predominante A
50	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
51	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
52	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
53	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
54	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
55	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{VIM-2}	Padrão Predominante B
56	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
57	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
58	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
59	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
60	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
61	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
62	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
63	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
64	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
65	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
66	positiva	positiva	negativa	<i>bla</i> _{SPM-1}	Possivelmente relacionado (A)
67	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)
68	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
69	positiva	positiva	positiva	<i>bla</i> _{SPM-1}	Estreitamente relacionado (A)

NR: não realizado; DA: Disco Aproximação; THM: Teste de Hodge Modificado; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; PFGE: Eletroforese em Campo Pulsado; MBL: Metallo-β-lactamase.

Anexo B - Positividade das diferentes combinações substrato-inibidor na detecção de Metallo- β -lactamases entre 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas no HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	Disco Aproximação					
	IMP-MAA	IMP-MPA	IMP-EDTA	CAZ-MAA	CAZ-MPA	CAZ-EDTA
1	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
2	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
3	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
4	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
5	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
6	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa
7	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
8	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa
9	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
10	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
11	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
12	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
13	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
14	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
15	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
16	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva
17	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
18	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
19	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
20	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
21	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
22	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
23	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
24	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
25	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
26	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
27	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
28	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
29	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
30	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
31	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
32	negativa	negativa	positiva	negativa	positiva	positiva
33	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
34	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
35	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
36	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
37	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
38	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa

“continua”

Anexo B - “Conclusão”. Positividade das diferentes combinações substrato-inibidor na detecção de Metallo-β-lactamases entre 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de hemoculturas no HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	Disco Aproximação					
	IMP-MAA	IMP-MPA	IMP-EDTA	CAZ-MAA	CAZ-MPA	CAZ-EDTA
39	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
40	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
41	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
42	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
43	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
44	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
45	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
46	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
47	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
48	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
49	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva
50	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
51	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
52	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
53	negativa	negativa	negativa	negativa	positiva	negativa
54	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva
55	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
56	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
57	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva
58	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
59	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa
60	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva
61	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa
62	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
63	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
64	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva
65	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
66	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
67	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva
68	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
69	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva
Total de positivos por combinação (n / %)	19 / 35.8%	7 / 13.2%	52 / 98.1%	27 / 50.9%	23 / 43.4%	47 / 88.7%
Total de positivos no DA (n / %)	53 / 76.8%					

IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; MAA: ácido 2-mercaptoacetato; MPA: ácido 2-mercaptopropiônico; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; DA: Disco Aproximação.

Anexo C - Fotos da Reação em Cadeia da Polimerase demonstrando 17 amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, e quatro amostras produtoras do gene *bla*_{VIM-2}.

Figura 15. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) na amostra 6.

Figura 16. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) na amostra 20.

Figura 17. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) nas amostras 24, 28 e 29.

Anexo C - “Continuação”. Fotos da Reação em Cadeia da Polimerase demonstrando 17 amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, e quatro amostras produtoras do gene *bla*_{VIM-2}.

Figura 18. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) na amostra 39.

Figura 19. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) nas amostras 41, 45, 46 e 49.

Figura 20. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) nas amostras 54, 56, 57 e 60.

“continua”

Anexo C - “Continuação”. Fotos da Reação em Cadeia da Polimerase demonstrando 17 amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, e quatro amostras produtoras do gene *bla*_{VIM-2}.

Figura 21. Detecção do gene *bla*_{SPM-1} (650 pb) nas amostras 66, 67 e 69.

Figura 22. Detecção do gene *bla*_{VIM-2} (865 pb) na amostra 21.

Figura 23. Detecção do gene *bla*_{VIM-2} (865 pb) na amostra 26.

Anexo C - “Conclusão”. Fotos da Reação em Cadeia da Polimerase demonstrando 17 amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, e quatro amostras produtoras do gene *bla*_{VIM-2}.

Figura 24. Detecção do gene *bla*_{VIM-2} (865 pb) na amostra 43.

Figura 25. Detecção do gene *bla*_{VIM-2} (865 pb) na amostra 55.

Anexo D - Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo-β-lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

IMP-EDTA x PCR (*bla_{SPM-1}*)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	17	35	52
	Negativo	0	17	17
	Total	17	52	69

S = 17/17 = 100%
E = 17/52 = 32.7%

VPP = 17/52 = 32.7%
VPN = 17/17 = 100%

Kappa = 0.19

IMP-EDTA x PCR (*bla_{VIM-2}*)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	4	48	52
	Negativo	0	17	17
	Total	4	65	69

S = 4/4 = 100%
E = 17/65 = 26.2%

VPP = 4/52 = 7.7%
VPN = 17/17 = 100%

Kappa = 0.04

IMP-EDTA x PCR (ambos)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	21	31	52
	Negativo	0	17	17
	Total	21	48	69

S = 21/21 = 100%
E = 17/48 = 35.4%

VPP = 21/52 = 40.4%
VPN = 17/17 = 100

Kappa = 0.25

“continua”

Anexo D - “Continuação”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo-β-lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

IMP-MAA x PCR (*bla*_{SPM-1})

IMP-MAA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	17	2	19
	Negativo	0	50	50
	Total	17	52	69

$$S = 17/17 = 100\%$$

$$E = 50/52 = 96.2\%$$

$$VPP = 17/19 = 89.5\%$$

$$VPN = 50/50 = 100\%$$

$$Kappa = 0.92$$

IMP-MAA x PCR (*bla*_{VIM-2})

IMP-MAA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	1	18	19
	Negativo	3	47	50
	Total	4	65	69

$$S = 1/4 = 25\%$$

$$E = 47/65 = 72.3\%$$

$$VPP = 1/19 = 5.3\%$$

$$VPN = 47/50 = 94\%$$

$$Kappa = -0.009$$

IMP-MAA x PCR (ambos)

IMP-MAA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	18	1	19
	Negativo	3	47	50
	Total	21	48	69

$$S = 18/21 = 85.7\%$$

$$E = 47/48 = 97.9\%$$

$$VPP = 18/19 = 94.7\%$$

$$VPN = 47/50 = 94\%$$

$$Kappa = 0.86$$

“continua”

Anexo D - “Continuação”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo- β -lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

IMP-MPA x PCR (*bla*_{SPM-1})

IMP-MPA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	6	1	7
	Negativo	11	51	62
Total		17	52	69

$$S = 6/17 = 35.3\%$$

$$E = 51/52 = 98.1\%$$

$$VPP = 6/7 = 85.7\%$$

$$VPN = 51/62 = 82.3\%$$

$$Kappa = 0.42$$

IMP-MPA x PCR (*bla*_{VIM-2})

IMP-MPA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	1	6	7
	Negativo	3	59	62
Total		4	65	69

$$S = 1/4 = 25\%$$

$$E = 59/65 = 90.8\%$$

$$VPP = 1/7 = 14.3\%$$

$$VPN = 59/62 = 95.2\%$$

$$Kappa = 0.12$$

IMP-MPA x PCR (ambos)

IMP-MPA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	7	0	7
	Negativo	14	48	62
Total		21	48	69

$$S = 7/21 = 33.3\%$$

$$E = 48/48 = 100\%$$

$$VPP = 7/7 = 100\%$$

$$VPN = 48/62 = 77.4\%$$

$$Kappa = 0.41$$

“continua”

Anexo D - “Continuação”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo- β -lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

CAZ-EDTA x PCR (*bla*_{SPM-1})

CAZ-EDTA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	16	31	47
	Negativo	1	21	22
Total		17	52	69

S = 16/17 = 94.1%
E = 21/52 = 40.4%

VPP = 16/47 = 34%
VPN = 21/22 = 95.5%

Kappa = 0.22

CAZ-EDTA x PCR (*bla*_{VIM-2})

CAZ-EDTA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	4	43	47
	Negativo	0	22	22
Total		4	65	69

S = 4/4 = 100%
E = 22/65 = 33.8%

VPP = 4/47 = 8.5%
VPN = 22/22 = 100%

Kappa = 0,06

CAZ-EDTA x PCR (ambos)

CAZ-EDTA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	20	27	47
	Negativo	1	21	22
Total		21	48	69

S = 20/21 = 95.2%
E = 21/48 = 43.8%

VPP = 20/47 = 42.6%
VPN = 21/22 = 95.5%

Kappa = 0.29

“continua”

Anexo D - “Continuação”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo-β-lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

CAZ-MAA x PCR (*bla*_{SPM-1})

CAZ-MAA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	17	10	27
	Negativo	0	42	42
	Total	17	52	69

S = 17/17 = 100%
E = 42/52 = 80.8%

VPP = 17/27 = 62.9 %
VPN = 42/42 = 100%

Kappa = 0.67

CAZ-MAA x PCR (*bla*_{VIM-2})

CAZ-MAA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	4	23	27
	Negativo	0	42	42
	Total	4	65	69

S = 4/4 = 100%
E = 42/65 = 64.6%

VPP = 4/27 = 14.8%
VPN = 42/42 = 100%

Kappa = 0.17

CAZ-MAA x PCR (ambos)

CAZ-MAA	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	21	6	27
	Negativo	0	42	42
	Total	21	48	69

S = 21/21 = 100%
E = 42/48 = 87.5%

VPP = 21/27 = 77.8%
VPN = 42/42 = 100%

Kappa = 0.81

“continua”

Anexo D - “Continuação”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo-β-lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

CAZ-MPA x PCR (*bla*_{SPM-1})

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	12	11	23
	Negativo	5	41	46
CAZ-MPA	Total	17	52	69

$$S = 12/17 = 70.6\%$$

$$E = 41/52 = 78.8\%$$

$$VPP = 12/23 = 52.2\%$$

$$VPN = 41/46 = 89.1\%$$

$$Kappa = 0.44$$

CAZ-MPA x PCR (*bla*_{VIM-2})

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	4	19	23
	Negativo	0	46	46
CAZ-MPA	Total	4	65	69

$$S = 4/4 = 100\%$$

$$E = 46/65 = 70.8\%$$

$$VPP = 4/23 = 17.4\%$$

$$VPN = 46/46 = 100\%$$

$$Kappa = 0.22$$

CAZ-MPA x PCR (ambos)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	16	7	23
	Negativo	5	41	46
CAZ-MPA	Total	21	48	69

$$S = 16/21 = 76.2\%$$

$$E = 41/48 = 85.4\%$$

$$VPP = 16/23 = 69.6\%$$

$$VPN = 41/46 = 89.1\%$$

$$Kappa = 0.60$$

“continua”

Anexo D - “Continuação”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo-β-lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

Etest® MBL x PCR (*bla_{SPM-1}*)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	17	36	53
	Negativo	0	16	16
	Total	17	52	69

S = 17/17 = 100%
E = 16/52 = 30.8%

VPP = 17/53 = 32.1%
VPN = 16/16 = 100%

Kappa = 0.17

Etest® MBL x PCR (*bla_{VIM-2}*)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	4	49	53
	Negativo	0	16	16
	Total	4	65	69

S = 4/4 = 100%
E = 16/65 = 24.6%

VPP = 4/53 = 7.5%
VPN = 16/16 = 100%

Kappa = 0.04

Etest® MBL x PCR (ambos)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	21	32	53
	Negativo	0	16	16
	Total	21	48	69

S = 21/21 = 100%
E = 16/48 = 33.3%

VPP = 21/53 = 39.6%
VPN = 16/16 = 100%

Kappa = 0.23

“continua”

Anexo D - “Conclusão”. Cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos fenotípicos na detecção de Metallo- β -lactamase em 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem.

Teste de Hodge Modificado x PCR (*bla*_{SPM-1})

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	14	5	19
	Negativo	3	47	50
Hodge	Total	17	52	69

$$S = 14/17 = 82.4\%$$

$$E = 47/52 = 90.4\%$$

$$VPP = 14/19 = 73.7\%$$

$$VPN = 47/50 = 94\%$$

$$Kappa = 0.70$$

Teste de Hodge Modificado x PCR (*bla*_{VIM-2})

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	3	16	19
	Negativo	1	49	50
Hodge	Total	4	65	69

$$S = 3/4 = 75\%$$

$$E = 49/65 = 75.4\%$$

$$VPP = 3/19 = 15.8\%$$

$$VPN = 49/50 = 98\%$$

$$Kappa = 0.18$$

Teste de Hodge Modificado x PCR (ambos)

	PCR			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	17	2	19
	Negativo	4	46	50
Hodge	Total	21	48	69

$$S = 17/21 = 80.9\%$$

$$E = 46/48 = 95.8\%$$

$$VPP = 17/19 = 89.5\%$$

$$VPN = 46/50 = 92\%$$

$$Kappa = 0.79$$

Anexo E - Dados referentes às clínicas de isolamento, resultados de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição e Etest® para colistina, Disco Aproximação, Etest® MBL, Teste de Hodge Modificado, Reação em cadeia da Polimerase e Eletroforese em Campo Pulsado, das 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, isoladas de hemoculturas do HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	Clínica	Microdiluição											Etest® CT	Disco Aproximação (DA)							Etest® MBL	THM	PCR	PFGE	
		AK	ATM	CAZ	FEP	CN	IMP	PIP	CIP	MEM	TOB	TIC/AC		Resultado	IMP+MAA	IMP+MPA	IMP+EDTA	CAZ+MAA	CAZ+MPA	CAZ+EDTA					
1	E1MH	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
2	U1MR	<=4	>16	>16	>16	2	>8	>64	>2	>8	4	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
3	UPNC	8	>16	>16	16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR	
4	APSM	16	>16	>16	>16	8	>8	>64	>2	>8	2	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	negativa	NR	
5	APSM	16	16	16	16	>8	>8	>64	>2	8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
6	E1MH	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	1,5	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	positiva	negativa	SPM -1	ERA	
7	U1MH	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<= 1	>64	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR	
8	EICO	>32	16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	NR	
9	EPSM	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
10	E1MH	8	>16	>16	16	4	>8	64	>2	>8	<=1	>64	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR	
11	E1MH	16	>16	>16	>16	8	>8	>64	>2	>8	2	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
12	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	0,75	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
13	UPNC	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR	
14	EICR	32	>16	>16	>16	8	>8	>64	<=1	>8	2	>64	0,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
15	UQUE	>32	>16	>16	16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	0,75	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
16	EICO	<=4	>16	>16	>16	8	>8	>64	>2	>8	8	>64	0,5	P	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
17	U1CC	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
18	E2CL	16	>16	>16	>16	8	>8	>64	>2	>8	2	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
19	UMIN	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
20	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	2	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	SPM -1	ERA	
21	U1MH	8	>16	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	VIM-2	D	
22	EICR	32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	4	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
23	UQUE	16	16	16	16	4	>8	64	>2	>8	<=1	>64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR	
24	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	1,5	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
25	UCNV	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR	
26	UQUE	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	VIM-2	PPB
27	ECMG	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR	
28	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	PPA
29	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	PPA

Anexo E - “Continuação”. Dados referentes às clínicas de isolamento, resultados de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição e Etest® para colistina, Disco Aproximação, Etest® MBL, Teste de Hodge Modificado, Reação em cadeia da Polimerase e Eletroforese em Campo Pulsado, das 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, isoladas de hemoculturas do HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	Clínica	Microdiluição											Etest® CT	Disco Aproximação (DA)							Etest® MBL	THM	PCR	PFGE
		AK	ATM	CAZ	FEP	CN	IMP	PIP	CIP	MEM	TOB	TIC/AC		Resultado	IMP+MAA	IMP+MPA	IMP+EDTA	CAZ+MAA	CAZ+MPA	CAZ+EDTA				
30	EICO	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
31	UQUE	8	>16	>16	16	4	>8	64	>2	>8	<=1	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
32	UMIN	8	>16	>16	>16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
33	UCNV	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
34	EICR	<=4	16	16	8	<=1	>8	>64	<=1	>8	<=1	64	1	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
35	E2CB	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
36	EMIN	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
37	EICO	8	16	4	8	2	>8	<=16	<=1	>8	<=1	64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
38	CNI	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	NR
39	UPSM	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	PPA
40	EICR	<=4	<=8	<=2	<=2	2	>8	<=16	<=1	<=4	<=1	<=16	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
41	UPSM	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	1,5	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	PPA
42	EURO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	NR
43	E1MH	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	VIM-2	ERB
44	E1MH	>32	16	>16	16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
45	UPSM	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	2	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
46	UPSM	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	2	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
47	UPSM	8	>16	>16	16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
48	U1CC	8	>16	>16	16	4	>8	64	>2	>8	<=1	>64	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
49	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	SPM -1	PPA
50	EUTR	8	<=8	<=2	<=2	2	>8	<=16	<=1	<=4	<=1	<=16	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
51	UQUE	>32	>16	4	16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	1,5	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
52	EMIN	>32	>16	>16	16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
53	EICO	<=4	<=8	<=2	<=2	2	>8	<=16	<=1	<=4	<=1	<=16	2	P	negativa	negativa	negativa	negativa	positiva	negativa	positiva	negativa	negativa	NR
54	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
55	ATMO	>32	16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	VIM-2	PRB
56	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	6	P	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
57	E1MH	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
58	ECMG	<=4	<=8	<=2	4	2	>8	<=16	<=1	8	<=1	64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR

Anexo E - “Conclusão”. Dados referentes às clínicas de isolamento, resultados de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição e Etest® para colistina, Disco Aproximação, Etest® MBL, Teste de Hodge Modificado, Reação em cadeia da Polimerase e Eletroforese em Campo Pulsado, das 69 cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, isoladas de hemoculturas do HC-FMUSP no ano de 2005.

Amostra	Clínica	Microdiluição											Etest® CT	Disco Aproximação (DA)							Etest® MBL	THM	PCR	PFGE
		AK	ATM	CAZ	FEP	CN	IMP	PIP	CIP	MEM	TOB	TIC/AC		Resultado	IMP+MAA	IMP+MPA	IMP+EDTA	CAZ+MAA	CAZ+MPA	CAZ+EDTA				
59	ATMO	>32	<=8	4	16	>8	>8	<=16	>2	>8	>8	64	6	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	NR
60	EICO	>32	16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	4	P	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
61	EPSN	>32	>16	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	NR
62	EICO	8	<=8	<=2	<=2	4	>8	<=16	<=1	<=4	<=1	64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
63	EICO	32	<=8	8	8	8	>8	<=16	<=1	<=4	2	64	6	P	negativa	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
64	EICO	>32	>16	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	negativa	negativa	positiva	negativa	negativa	positiva	positiva	negativa	negativa	NR
65	A1MR	8	16	>16	16	4	>8	>64	>2	>8	<=1	>64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
66	EUTR	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	1,5	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	negativa	SPM -1	PRA
67	EICO	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	>64	>2	>8	>8	>64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
68	EICO	<=4	<=8	8	<=2	4	>8	<=16	<=1	8	<=1	64	2	N	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	NR
69	U1CC	>32	<=8	>16	>16	>8	>8	64	>2	>8	>8	>64	2	P	positiva	negativa	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	positiva	SPM -1	ERA
		43.5%	40.6%	14.5%	13%	34.8%	0%	47.8%	14.5%	7.2%	43.5%	29.9%	94.2%	53/69	19/53	7/53	52/53	27/53	23/53	47/53	53/69	19/69	21/69	
Perfil de Sensibilidade (%)														76.8%	35.8%	13.2%	98.1%	50.9%	43.4%	88.7%	76.8%	27.5%	30.4%	
Resultados dos métodos fenotípicos e moleculares na detecção de MBL																								

Legenda: AK: amicacina; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; CN: gentamicina; IMP: imipenem; PIP: piperacilina; CIP: ciprofloxacina; MEM: meropenem; TOB: tobramicina; TIC/AC: ticarcilina/ácido clavulânico; CT: colistina; P: positivo; N: negativo; MAA: ácido 2-mercaptoacético; MPA: ácido 2-mercaptopropiônico; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; MBL: Metallo-β-lactamase; THM: Teste de Hodge Modificado; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; PFGE: Eletroforese em Campo Pulsado; NR: não realizado; PPA: Padrão Predominante A; ERA: Estreitamente relacionado ao padrão A; PRA: Possivelmente relacionado ao padrão A; PPB: Padrão Predominante B; ERB: Estreitamente relacionado ao padrão B; D: Diferente do padrão B; EICO: enfermaria do incor; U1MR: UTI do serviço de nefrologia; UPNC: UTI do serviço de neurocirurgia de emergência; APSM: ambulatório do serviço de clínica médica de emergência; EPSM: enfermaria do serviço de clínica médica de emergência; EICR: enfermaria do instituto da criança; U1CC: UTI da divisão da clínica cirúrgica I; E2CL: enfermaria do serviço de cirurgia laparoscópica; UMIN: UTI da divisão clínica de moléstias infecciosas e parasitárias; UCNV: UTI do serviço de convênios; ECMG: enfermaria do serviço de clínica geral; E2CB: enfermaria do serviço de cirurgia de vias biliares e pâncreas; EMIN: enfermaria da divisão clínica de moléstias infecciosas e parasitárias; CNI: seção de atendimento a pacientes internados; UPSM: UTI do serviço de clínica médica de emergência; EURO: enfermaria da divisão clínica urológica; EPSN: Enfermaria do serviço de neurologia de emergência; E1MH: enfermaria do serviço de hematologia; UPSM: UTI do serviço de clínica médica de urgência; EUTR: enfermaria do serviço de transplante renal; U1CC: UTI da clínica cirúrgica I; U1MH: UTI do serviço de hematologia; UQUE: UTI do serviço de queimados; ATMO: ambulatório do transplante de medula óssea.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Al Naiemi N, Duim B, Bart A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol*. 2006;55:1607-8.

Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 1980;289:321-31.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000;38:40-3.

Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos AS. Bioestat 3.0: *Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília; 2003. Cap. 12, p. 123-4: *Duas amostras relacionadas*.

Baxter I, Lambert P. The effect of zinc on imipenem. *Antimicrob Agents Chemoter*. 1997;39:838-9.

Bellido F, Veuthey C, Blaser J, Bauernfeind A, Pechere JC. Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemoter*. 1990;25:57-68.

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

Bert F, Branger C, Zechovsky NL. Identification of PSE and OXA β -lactamases genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemoter.* 2002;50:11-8.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1995;39:1211-33.

Bush K. Excitement in the β -lactamases arena. *J Antimicrob Chemoter.* 1989;24:831-6.

Bush K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1085-9.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4654-61.

Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a, and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:839-52.

Chen YH, Succi J, Tenover FC, Koehler TM. β -lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J Bacteriol.* 2003;185:823-30.

Chu YW, Cheung TKM, Ngan JYW, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest[®] and an imipenem-EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26:340-1.

Claeys G, Verschraegen G, de Baere T, Vaneechoutte M. PER-1 β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemoter.* 2000;45:924-5.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 8th ed. Document M2-A8. CLSI, Wayne, PA, USA

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S16. CLSI, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S17. CLSI, Wayne, PA, USA.

Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol.* 1993;9:41-52.

Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:155-62.

Collis CM, Kim JM, Stokes HW, Hall RM. Integron-encoded *IntI* integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Mol Microbiol.* 2002;46:1415-27.

Danel F, Paetzel M, Strynadka NC. Effect of divalent metal cations on the dimerization of OXA-10 and -14 class D β -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 2001;40:9412-20.

DeChamps C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Nordmann P. Prospective survey of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2002;46:3031-4.

Denny B, West P, Panigrahi D. Effects of permeabilizers on antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* spp. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36:72-6.

Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*_{GES-1} and a fused product of *aac3-lb/aac6-lb* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:638-45.

Filho LS, Santos IB, Assis AM, Xavier DE. Detection of metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated in João Pessoa, Paraíba, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38:291-6.

Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3139-44.

Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*. 2005;41:S276-8.

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

Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, Nakahashi M, Nishino T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemoter*. 1998;42:1938-43.

Gupta V. Metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17:131-43.

Jacoby GA, Munhoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med*. 2005;352:380-91.

Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2005;49:4733-8.

Kaufmann ME. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. 1st ed. New Jersey: Ed. Humana Press; 1998. Cap.15. p. 33-50.

Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA, van der Akker F. Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A β -lactamases. *Biochemistry*. 2007;46:5732-40.

Langaee TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hiperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2000;44:583-9.

Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santicci P, Meunier C, de Puw E, Amicosante G, Frere JM, Galleni M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1999;43:902-26.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1584-90.

Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:88-91.

Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4623-9.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4485-91.

Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Bio Rev.* 1999;63:507-22.

Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassetari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005;43:516-9.

Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the bacterial activity of ticarcilin. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1999;43:882-9.

Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000;5:489-95.

Livermore DM. Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in Gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.* 1987;6:439-45.

Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:2046–8.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002;34:634-40.

Livermore DM. *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemoter.* 2001;47:247-50.

Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Souza JMA, Edmond MB, Faro C, Wey SB. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:388-90.

Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. *Infection.* 2007;35:457-60.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari AC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42:103-13.

Murray PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology.* 8nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2003. Cap. 47, p. 719-25: *Pseudomonas*.

Naas T, Poirel L, Nordmann P. Molecular characterization of *In51*, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette, *aadA6*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1489:445–51.

National Nosocomial Infectious Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32:470-85.

Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:321-31.

Normark S. β -lactamase induction in Gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb Drug Resist*. 1995;1:111-4.

Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemoter*. 1999;43:1085-90.

Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1661-9.

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho MMG. Occurrence of a multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2420-4.

Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of Double-Disk synergy versus Combined Disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM- or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2028-37.

Poirel L, Girlich D, Nass T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid-and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2001a;45:447-53.

Poirel L, Magalhães M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1} surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2004;48:1406-9.

Poirel L, Weldhagen GF, DeChamps C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:561-5.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, DeChamps C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001b;45:2598-603.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.

Quinn JP, Studemeister AE, DiVincenzo CA, Lerner SA. Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*: clinical experience and biochemical mechanisms. *Rev Infect Dis.* 1988;10:892-8.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2000;44:1229-35.

Ridley RM. *Genomic Fingerprint by application of REP-PCR*. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. 1st ed. New Jersey: Ed. Humana Press; 1998. Cap.15. p.103-15.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents.* 2005a;25:57-61.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Bras J Infect Dis*. 2001;5:200-14.

Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious disease. *Clin Lab Med*. 1995;15:407-31.

Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2005b;11:73-6.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2909-13.

Southern EM, Elder JK. *Theories of gel electrophoresis of high molecular weight DNA*. In: Rockwood D, Hames BD, editors. *Pulsed Field Gel Electrophoresis - A practical approach*. 1st ed. New York: IRL Press; 1995. Cap 1, p. 1-18.

Spratt BG, Cromie KD. Penicillin-binding proteins of Gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis.* 1988;10:699-711.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.

Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DMC, Jones RN, Walsh TR. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:61-70.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:673-9.

Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:161-7.

Trabulsi LR, Altherthum F, Gompertz OF, Candelas JAN. *Microbiologia.* 4a ed. São Paulo: Ateneu; 2003. Cap. 49, p. 359-68: *Pseudomonas aeruginosa*.

Van der Heijden IM. Perfil de sensibilidade às polimixinas e padrão molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes a partir de amostras de sangue [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Vieira VV, Fonseca EL, Vicente AC. Metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil [letter]. *Clin Microbiol Infect*. 2005.

Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: The Kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37:360-3.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2007;51:1553-5.

Walsh TR, Bolmstorm A, Qwarnstorm A, Gales AC. Evaluation of a new Etest[®] for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2755-9.

Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamases from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1218:199-201.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:306-25.

Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21:367-71.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:147-51.

Weldhagen GF, Poirel L, Nordman P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2003;47:2385-92.

Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2001;45:2224-8.

Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk and Etest[®] methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49:5-11.

Zanetti G, Bally F, Greub G, Garbino J, Kinge T, Lew D, Romand JA, Bille J, Aymon D, Stratchounski L, Krawczyk L, Rubinstein E, Schaller MD, Chiolerio R, Glauser MP, Cometta A. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2003;47:3442-7.