

Metallo- β -lactamases

Primeira submissão em 31/03/05
Última submissão em 29/07/05
Aceito para publicação em 03/04/05
Publicado em 20/04/06

Metallo- β -lactamases

Rodrigo Elisandro Mendes, Ph.D.; Mariana Castanheira, Ph.D.; Antonio Carlos Campos Pignatari, Ph.D.; Ana Cristina Gales, Ph.D.

unitermos	resumo
Bacilo Gram-negativo	<p>Nos últimos anos tem sido observada maior incidência de bacilos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de espectro ampliado no ambiente hospitalar, ocasionando, assim, maior uso de betalactâmicos mais potentes, como os carbapenens. A utilização de carbapenens exerce maior pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar, o que pode ocasionar aumento da resistência a esses agentes. Entre os mecanismos de resistência a carbapenens mais comumente identificados estão a produção de betalactamases, como, por exemplo, as pertencentes à classe D de Ambler e as que pertencem à classe B de Ambler, ou metallo-β-lactamases (MβL). Essas últimas hidrolisam todos betalactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam aztreonam. Desde o início da década de 1990, novos genes que codificam MβLs têm sido descritos em microrganismos clinicamente importantes, como <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp. e membros da família <i>Enterobacteriaceae</i>. O encontro desses microrganismos não-sensíveis a carbapenens pode ser submetido a metodologias fenotípicas para detecção da produção de MβL com o intuito de auxiliar a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e prevenir a disseminação desses determinantes de resistência, uma vez que genes que codificam MβLs estão contidos em estruturas genéticas que propiciam sua mobilidade de forma muito efetiva, sendo então facilmente disseminados.</p>
Resistência a carbapenens	
Metallo- β -lactamase	
Integron	
Cassete gênico	

abstract key words

Increase isolation of Gram-negative bacilli resistant to broad-spectrum cephalosporin has been observed during the last few years, thus determining the use of more potent β -lactams, such as carbapenems. The use of these antimicrobial agents may lead to the emergence of carbapenem resistant Gram-negative bacilli in the nosocomial environment. Carbapenem resistance may be due to the production of Ambler class D β -lactamase or Ambler class B β -lactamase, also called metallo- β -lactamase (M β L). Apart from the monobactam aztreonam, this class of enzyme virtually hydrolyze all the commercially available β -lactams. Since 90s, several clinical important nosocomial microorganisms, including members of *Enterobacteriaceae* family, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., have been found to produce M β Ls enzymes. When these carbapenem non-susceptible strains are found, they may be submitted to phenotypic M β L detection test in the microbiology laboratory in order to help infection control practioners and prevent the M β L gene dissemination, once these genes are embedded in mobile genetic elements, which can spread rapidly to other Gram-negative species.

Gram-negative bacilli
Carbapenem resistance
Metallo- β -lactamase
Integron
Gene cassette

Introdução

Nos últimos anos tem sido observada maior incidência de bacilos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de espectro ampliado no ambiente hospitalar, ocasionando, assim, maior uso de betalactâmicos mais potentes, como os carbapenens⁽⁵⁹⁾. Atualmente esses agentes são importantes opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções nosocomiais. Isso se deve a sua elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2), estabilidade a muitas betalactamases, incluindo as de espectro ampliado (ESBL) e as cromossômicas (AmpC), e excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana⁽⁷⁸⁾.

A maior utilização de carbapenens no ambiente hospitalar acaba por ocasionar maior pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, o que favorece a seleção de subpopulações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos. Atualmente, amostras bacterianas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes a grande maioria dos agentes antimicrobianos e sensíveis somente à polimixina B têm sido isoladas pelos laboratórios de microbiologia clínica na maior parte dos hospitais brasileiros⁽²³⁾.

A produção de betalactamase cromossômica, a qual pode ser induzível, é responsável pela resistência intrínseca de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. aos betalactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas^(38, 54). Entretanto a resistência às cefalosporinas de espectro ampliado pode ser decorrente da hiperexpressão de betalactamase cromossômica associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa (mediada pela perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, conhecidas como porinas), ou, ainda, hiperexpressão de bombas de efluxo, as quais reduzem a concentração do antimicrobiano na célula bacteriana por meio da extrusão do mesmo^(37, 38, 54).

Outros mecanismos que conferem resistência aos betalactâmicos de espectro ampliado e carbapenens têm sido descritos⁽⁵⁶⁾, como a produção das betalactamases pertencentes à classe D de Ambler^(1, 6, 22, 27) e as que pertencem à classe B de Ambler, também denominadas metalo- β -lactamases (MBL). Adicionalmente, a produção dessas enzimas tem sido comumente responsável pelo fenótipo de resistência a esses betalactâmicos⁽⁷²⁾. As MBLs são betalactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros e hidrolisam todos os betalactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam, aztreonam⁽⁷⁾. Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica, por terem a mes-

ma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes⁽⁴⁴⁾. Além disso, essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (i.e., ácido 2-mercaptopropiônico), não sendo impedidas por inibidores de serino-betalactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam⁽⁸⁾.

Epidemiologia das metalo- β -lactamases

As MBLs são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*^(3, 19, 65), *Bacillus cereus*⁽⁶⁷⁾, *Chryseobacterium meningosepticum*⁽⁶³⁾, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus*⁽⁶⁴⁾ e *Aeromonas* spp.^(39, 75, 76). Contudo, desde o início da década de 1990, novos genes que codificam MBLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae*^(55, 61, 80). A **Tabela 1** contém os dados dos primeiros exemplares de cada uma das variantes encontradas entre as cinco subclasses de MBLs adquiridas descritas até o momento.

Estes novos genes que codificam as MBLs foram encontrados inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene, fazendo com que essas enzimas passassem a ser conhecidas como MBLs móveis ou MBLs adquiridas. Atualmente são conhecidas cinco subclasses de MBL adquiridas: IMP (imipenemase)⁽⁴⁶⁾, VIM (Verona imipenemase)⁽³³⁾, SPM (São Paulo metalo- β -lactamase)⁽⁷²⁾, GIM (German imipenemase)⁽¹⁰⁾ e, mais recentemente, SIM-1, codificada pelo gene *bla*_{SIM-1} detectado em sete *A. baumannii* isolados de um hospital terciário em Seul, Coréia⁽³⁵⁾.

O primeiro relato de MBL adquirida ocorreu em 1994⁽⁴⁶⁾, quando foi descrita uma nova subclasse denominada IMP-1. Essa enzima foi detectada em uma cepa clínica de *Serratia marcescens* isolada no Japão, a qual apresentava fenótipo de resistência a imipenem e cefalosporinas de espectro ampliado. Durante muitos anos a ocorrência de isolados produtores de IMP-1 foi restrita a esse país, entretanto, atualmente, a IMP-1 tem sido detectada em diferentes microrganismos, como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* isolados de diferentes regiões geográficas^(11, 20, 21, 28, 29, 43, 61, 69, 82).

As variantes pertencentes à subclasse IMP parecem ser mais prevalentes na Ásia, sendo comumente encontradas em bacilos Gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) (*Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas* spp. e

Tabela 1 Dados dos primeiros exemplares de cada uma das variantes encontradas nas cinco subclasses de MBLs adquiridas descritas até o momento

Enzima	Variante	Nº de acesso	Microrganismo	País	Localização	Referência	
IMP	IMP-1	S71932	<i>S. marcescens</i>	Japão	Cromossomial	46	
	IMP-2	AJ243491	<i>A baumannii</i>	Itália	Cromossomial	61	
	IMP-3	AB010417	<i>S. flexneri</i>	Japão	Plasmidial	28	
	IMP-4	AF244145	<i>Acinetobacter</i> spp.	Japão	Cromossomial	11	
	IMP-5	AF290912	<i>A baumannii</i>	Portugal	Cromossomial	20	
	IMP-6	AB040994	<i>S. marcescens</i>	Japão	Plasmidial	82	
	IMP-7	AF318077	<i>P. aeruginosa</i>	Canadá	Não determinado	25	
	IMP-8	AF322577	<i>K. pneumoniae</i>	Taiwan	Plasmidial	80	
	IMP-9	AY033653	<i>P. aeruginosa</i>	China	Não determinado	Xiong, J., et al.*	
	IMP-10	AB074433	<i>P. aeruginosa</i>	Japão	Plasmidial	29	
	IMP-11	AB074437	<i>P. aeruginosa</i>	Japão	Não determinado	Iyobe, S. et al.*	
	IMP-12	AJ420864	<i>P. putida</i>	Itália	Plasmidial	21	
	IMP-13	AJ550807	<i>P. aeruginosa</i>	Itália	Não determinado	69	
	IMP-16	AJ586617	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil	Cromossomial	43	
	VIM	VIM-1	Y18050	<i>P. aeruginosa</i>	Itália	Cromossomial	33
		VIM-2	AF191564	<i>P. aeruginosa</i>	França	Plasmidial	55
VIM-3		AF300454	<i>P. aeruginosa</i>	Taiwan	Cromossomial	79	
VIM-4		AY135661	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia	Não determinado	57	
VIM-5		AY144612	<i>K. pneumoniae</i>	Turquia	Não determinado	4	
VIM-6		AY165025	<i>P. putida</i>	Cingapura	Plasmidial	30	
VIM-7		AJ536835	<i>P. aeruginosa</i>	EUA	Plasmidial	71	
VIM-8		AY524987	<i>P. aeruginosa</i>	Colômbia	Não determinado	18	
VIM-9		AY524988	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido	Não determinado	Woodford, N et al.*	
VIM-10		AY524989	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido	Não determinado	Woodford, N et al.*	
VIM-11		AY605049	<i>P. aeruginosa</i>	Argentina	Cromossomial	49	
SPM	SPM-1	PAE492820	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil	Plasmidial	72	
GIM	GIM-1	AJ620678	<i>P. aeruginosa</i>	Alemanha	Plasmidial	10	
SIM	SIM-1	AY887066	<i>A. baumannii</i>	Coréia	Cromossomial	35	

*Não publicado.

Acinetobacter spp.). No entanto, já houve relatos da produção dessas enzimas por microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*^(32, 46, 80).

O primeiro relato de uma MBL no continente americano ocorreu em 2002 por Gibb et al.⁽²⁵⁾. Os autores descreveram a detecção de uma cepa de *P. aeruginosa* num hospital canadense que apresentava alto grau de resistência a ceftazidima e carbapenems. Análises posteriores revelaram a presença de uma nova enzima, denominada IMP-7.

Em 1999, a segunda subclasse de MBL adquirida descrita foi denominada VIM-1. A presença dessa enzima

foi observada numa amostra de *P. aeruginosa* isolada em Verona, Itália⁽³³⁾. As enzimas pertencentes a essa subclasse apresentam menor número de variantes atualmente descritas, bem como distribuição concentrada em determinadas regiões geográficas, quando comparadas às pertencentes à subclasse IMP.

As variantes de VIM foram encontradas tanto em microrganismos fermentadores de glicose quanto naqueles não-fermentadores. Essas enzimas são mais prevalentes na Europa, região onde foi originariamente encontrada em 1999⁽³³⁾. Posteriormente houve diversos relatos dessas

enzimas em microrganismos isolados em países da Comunidade Européia^(4, 50, 52, 55, 58, 77). No entanto, variantes de VIM também foram relatadas na Ásia^(79, 83) e, mais recentemente, nos EUA⁽⁷¹⁾, no Chile e na Venezuela⁽⁴¹⁾.

A SPM-1, terceira subclasse de MBL adquirida, foi identificada em amostra de *P. aeruginosa* 48-1997 recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Essa amostra bacteriana foi enviada ao programa SENTRY, que, em parceria com o laboratório Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation (BCARE), da Universidade de Bristol, Inglaterra, caracterizou esse novo determinante de resistência⁽⁷²⁾. O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi detectado em demais microrganismos nosocomiais^(23, 53). Posteriormente, a mesma parceria avaliou cinco cepas de *P. aeruginosa* provenientes de Dusseldorf, Alemanha, encontrando uma nova e quarta subclasse de MBL adquirida, denominada GIM-1⁽¹⁰⁾.

Epidemiologia das metalo- β -lactamases no Brasil

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de amostras produtoras de MBL adquirida ocorreu em 2002⁽⁵¹⁾. Entretanto, esse relato não caracterizou o determinante de resistência envolvido. Mais tarde, em 2003, uma variante de IMP foi relatada por Gales *et al.*⁽²⁴⁾. Esses autores descreveram o achado de uma cepa de *A. baumannii* isolada no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP produtora de IMP-1. A análise do resultado de seqüenciamento dos 400-bp (pares de base) provenientes da reação da polimerase em cadeia (PCR) revelou tratar-se de um gene apresentando 100% de similaridade genética com a seqüência do gene *bla*_{IMP-6} anteriormente publicada no GenBank sob o número S71932.

Em trabalho realizado na UNIFESP, investigou-se a presença de MBL adquirida em *Acinetobacter* spp. isolados de pacientes internados no Hospital São Paulo, no período entre maio de 1993 e novembro de 2001. Entre as amostras que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenens, 54,8% (40/73) eram produtoras de IMP-1, sendo que a emergência desse determinante de resistência foi detectada em amostras bacterianas isoladas a partir de 1998. Além disso, após este ano, a produção de MBL adquirida pareceu ser o mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência aos carbapenens nas amostras avaliadas⁽⁶⁸⁾.

Mais recentemente, em estudo realizado em amostras bacterianas isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo durante os anos de 2002 e 2003, foi detectado o gene *bla*_{IMP-1} em sete *Acinetobacter* spp. e uma *P. aeruginosa*⁽⁹⁾. Posteriormente, uma *P. aeruginosa* apresentando fenótipo de resistência a todos os betalactâmicos, inclusive imipenem e meropenem, foi isolada de um paciente internado no Hospital de Base de Brasília, em 2002. Estudos posteriores revelaram tratar-se da presença de uma nova variante de IMP, designada IMP-16⁽⁴³⁾.

Mais recentemente, uma amostra bacteriana de *Klebsiella pneumoniae*, isolada no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), foi caracterizada como produtora de IMP-1⁽³⁶⁾. Este foi o primeiro relato de MBL adquirida em membros da família *Enterobacteriaceae* na América Latina. Entre 2003 e 2004 também foi evidenciada a primeira ocorrência de um surto hospitalar numa UTI causado por um clone de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem e, mais tarde, testes moleculares confirmaram a presença do gene *bla*_{IMP-1} nessas amostras⁽²⁶⁾. Além disso, uma amostra bacteriana de *P. aeruginosa* produtora de IMP-16 isolada de paciente internado no Hospital São Paulo e amostras bacterianas de *A. baumannii* produtoras de IMP-1 isoladas do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo (HSPE) têm sido detectadas nos últimos anos (dados não publicados).

Como descrito anteriormente, SPM-1 foi detectada numa amostra bacteriana de *P. aeruginosa* isolada em 2001. Desde então, amostras produtoras dessa enzima têm sido isoladas em diversos centros no Brasil, como São Paulo, Brasília, Salvador, Fortaleza, Santo André, Londrina, Curitiba e Maringá⁽²³⁾, e, atualmente, a detecção de SPM-1 em hospitais brasileiros eventualmente tem sido observada em locais, como o Hospital São Paulo e o Hospital 9 de Julho, ambos localizados em São Paulo, e o Hospital Santa Catarina, em Blumenau (dados não publicados).

Contexto genético das MBL adquiridas

As MBL adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeo bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo^(72, 53), as demais MBL adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1^(41, 43, 50, 69, 77).

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

Membros dessas classes possuem suas respectivas integrases (intI1, intI2, intI3 e intI4), as quais compartilham similaridade entre 35% e 94%⁽¹⁷⁾. A classe 1 tem sido extensivamente estudada, e membros dela foram originalmente descritos como integrons. A classe 2 constitui-se de uma estrutura genética encontrada em transposon Tn7 e elementos relacionados, porém essa classe é composta por uma integrase defeituosa e incapaz de promover a mobilização de cassetes gênicos. A classe 3 é composta de um único exemplo até hoje descrito^(5, 16).

Integrons de classe 1

Integrons de classe 1 são elementos genéticos constituídos de uma região conservada 5' (5'-CS), formada por um gene *intI1*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*attI1*) e uma região conservada 3' (3'-CS) (**Figura 1**). Essa última região é geralmente composta do gene *qacEΔ1* conjugado ao gene *sul1*, sendo que esses genes codificam resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente^(5, 13-15, 48, 60).

Na região *upstream* ao gene *intI1*, integrons apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos cassetes gênicos inseridos entre as regiões conservadas 5' e 3'⁽⁴⁷⁾. Essa região é formada por um promotor denominado P_{ant'} constituído por duas seqüências de seis bases nas posições -35 e -10, respectivamente, sendo elas intercaladas por exatos 17-bp. Variações dessas seqüências já foram encontradas e podem ocasionar diferenças nas taxas de transcrição dos cassetes gênicos⁽⁶⁶⁾. Alguns integrons de classe 1 podem também apresentar um segundo promotor, localizado 119-bp *downstream* de P_{ant'}⁽¹⁵⁾.

Assim como diferentes promotores apresentam distinções nas taxas de transcrição do gene, a posição onde o cassete gênico encontra-se inserido, entre as regiões conservadas 5' e 3', também influencia sua taxa de trans-

crição. Experimentos evidenciaram que a transcrição dá-se de forma mais eficiente à medida que o cassete gênico encontra-se mais próximo à região promotora. Sendo assim, genes localizados nas primeiras posições apresentam maiores taxas de transcrição⁽¹⁵⁾.

Entre as regiões conservadas 5' e 3' integrons podem apresentar quantidade variável de cassetes gênicos, que são inseridos e extraídos pela IntI1 codificada pelo *intI1* (**Figura 2**). Cassetes gênicos usualmente codificam resistência a antimicrobianos e desinfetantes; no entanto é importante salientar que o maior número de genes de resistência encontrado provavelmente deve estar associado ao maior interesse em pesquisar amostras bacterianas resistentes aos antimicrobianos, uma vez que essa mobilização genética acontece de forma aleatória^(5, 60).

Cassetes gênicos têm normalmente entre 500 e 1.000-bp e são constituídos por dois componentes funcionais: um gene, responsável pela codificação de alguma proteína, e um sítio de recombinação, conhecido como 59 elementos de base (59-be). Esses genes não possuem promotor, sendo, portanto, o evento de expressão gênica dependente do promotor presente no integron, no qual o cassete gênico se encontra inserido^(13, 14).

A integrase, enzima codificada pelo *intI1*, é uma recombinase sítio-específica e possui como substrato preferencial dois sítios de ação, um na porção do 59-be, pertencente ao cassete gênico, e outro no receptor do cassete gênico ou *attI1*, localizado no integron^(15, 48). Usualmente as reações de recombinação ocorrem entre *attI1* (localizado no integron) e 59-be (localizado no cassete gênico), no entanto também foram demonstradas, em eventos experimentais, reações entre *attI1* e *attI1*, 59-be e 59-be, mas com frequência bastante reduzida (Figura 2)^(13, 14).

Paralelamente à disseminação de genes de MBL, observou-se também a ocorrência da disseminação de outros determinantes de resistência, entre eles genes codificadores

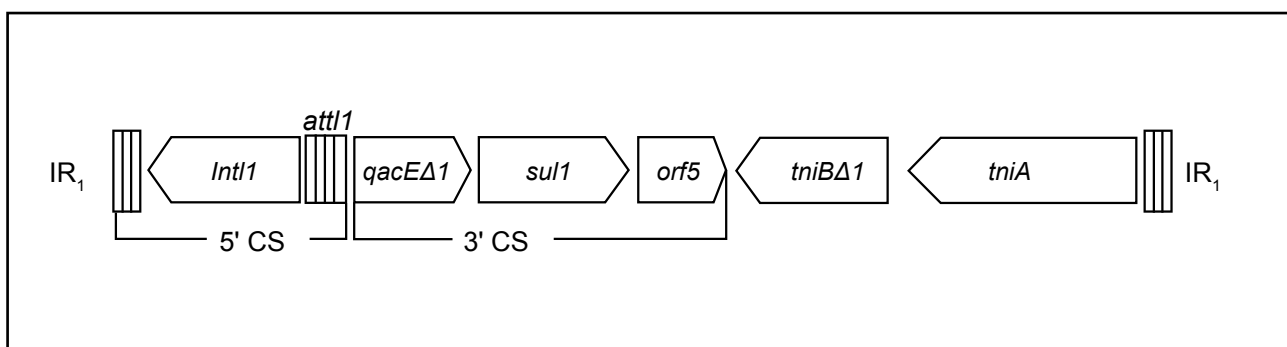


Figura 1 – Estrutura esquemática de integron de classe 1. IR representam terminais de repetição invertidos. A região conservada 5' consiste em *intI1* e sítio de inserção *attI1*. A seta dos respectivos genes indica a direção de sua transcrição. A região conservada 3' consiste nos genes *qacEΔ1*, *sul1* e *orf5* de função desconhecida, seguidos do módulo *tni*

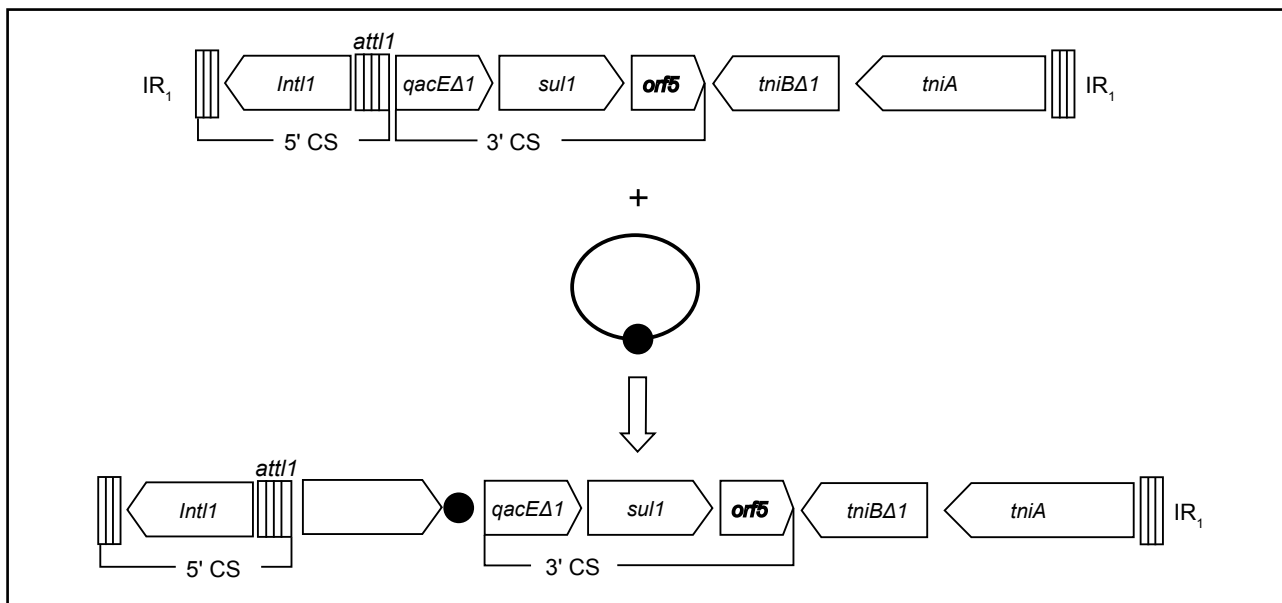


Figura 2 – Representação esquemática da inserção de cassete gênico na primeira posição em integron de classe 1. IR representam terminais de repetição invertidos. A região conservada 5' do integron consiste em *int1* e sítio de inserção *attI1*. O círculo de preenchimento preto representa 59-be do respectivo cassete gênico. A seta dos respectivos genes indica a direção da transcrição. A região conservada 3' consiste nos genes *qacEΔ1*, *sul1* e *orf5* de função desconhecida, seguidos do módulo *tni*

de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em integrons de classe 1. Grande número dos genes de MBL que tiveram seu contexto genético pesquisado encontrava-se associado a um ou mais genes de resistência a aminoglicosídeos, explicando em parte os casos de multirresistência em *P. aeruginosa*^(52, 62, 69, 70).

Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos têm sido comumente descritas como provenientes de genes de resistência a aminoglicosídeos em *P. aeruginosa* desde as décadas de 1960 e 1970, no entanto esse cenário mantém-se em constante movimento, uma vez que genes, como *aac(3')*, *aac(6')* e *aadA1* são freqüentemente encontrados em integrons de classe 1 e uma variedade de novas enzimas continuam a ser caracterizadas^(43, 52).

Detecção

Devido aos inúmeros encontros de amostras produtoras de MBL 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. Uma vez que as MBLs necessitam de íons divalentes (i.e., Zn⁺²) como co-fator para a reação de hidrólise do anel betalactâmico, essas enzimas podem ser detectadas por meio de testes fenotípicos com o auxílio de um agente quelante, como EDTA, derivados de ésteres de tiol (ácidos mercaptoacético, mercaptocarboxílico, 2-mercaptopropiônico [MPA]

e mercaptoetanol), *p*-clorometilbenzoato, metais pesados, como Hg (II), Fe (II), Fe (III) Cu (II), e ácido succínico.

Entre as metodologias fenotípicas desenvolvidas, o teste de disco-aproximação pode apresentar boas sensibilidade e especificidade, porém esses resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato e o agente quelante utilizado. Em estudo realizado por Arakawa *et al.*⁽²⁾, o agente quelante MPA apresentou melhor sensibilidade (100%), quando comparado aos demais agente utilizados na detecção de amostras produtoras de MBLs utilizando-se ceftazidima como substrato.

Em estudo posterior realizado por Lee *et al.*⁽³⁴⁾, o ácido mercaptoacético apresentou melhor sensibilidade (100%) na detecção de amostras de *Acinetobacter* spp. produtoras de MBLs, porém esse mesmo quelante falhou em detectar 10,5% das amostras de *Pseudomonas* spp. testadas. Em contrapartida, o EDTA apresentou melhor detecção da produção de MBLs em amostras de *P. aeruginosa* (100%), mas falhou em detectar 6% das amostras de *Acinetobacter* spp.

De forma geral, a metodologia de disco-aproximação consiste da inoculação do espécime clínico em uma placa de Mueller Hinton ágar, tal qual as recomendações preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (formalmente National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]) para a realização de antibiograma⁽⁴⁵⁾. Em seguida, discos contendo substratos, como ceftazidima (30µg) e imipenem (10µg), são posicionados na placa, ao

lado de um disco estéril de papel de filtro adicionado de uma solução de agente quelante, conforme representação esquemática demonstrada na **Figura 3**. Em amostras produtoras de MBL observam-se uma distorção e a ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria teste na região do ágar onde houve a difusão do agente quelante (**Figura 4**). Já em testes negativos não se observa a alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria teste (**Figura 5**).

Com base no mesmo princípio da difusão em ágar, desenvolveu-se uma fita de Etest®, a qual é incorporada de imipenem em uma das extremidades e imipenem associado ao EDTA na outra. Essa metodologia é bastante simples e apresenta praticidade, podendo também ser utilizada para rastreamento de amostras produtoras de MBL, porém apresenta custo mais elevado⁽⁷⁴⁾. Para essa metodologia considera-se amostra produtora de MBL aquela que apresentar

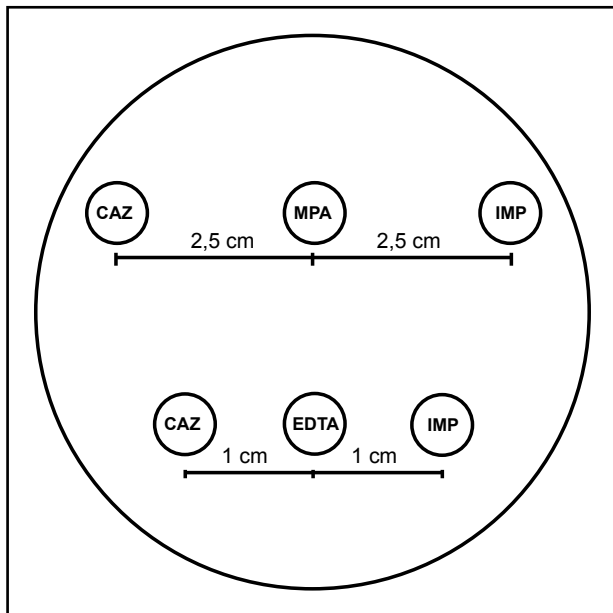


Figura 3 – Representação esquemática de distâncias, substratos e agentes quelantes sugeridos para a detecção fenotípica de amostras produtoras de MBLs. Caz = ceftazidima; IMP = imipenem; MPA = ácido 2-mercaptopropiônico⁽⁶⁸⁾.

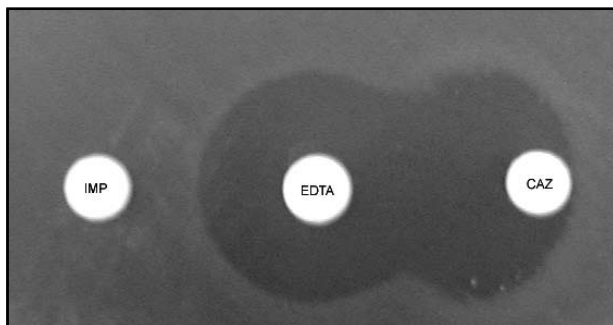


Figura 4 – Amostra clínica apresentando teste fenotípico positivo para a produção de MBL. O teste demonstra a distorção e a ampliação do halo de inibição do crescimento da bactéria testada na região do ágar onde houve a difusão do agente quelante (EDTA)

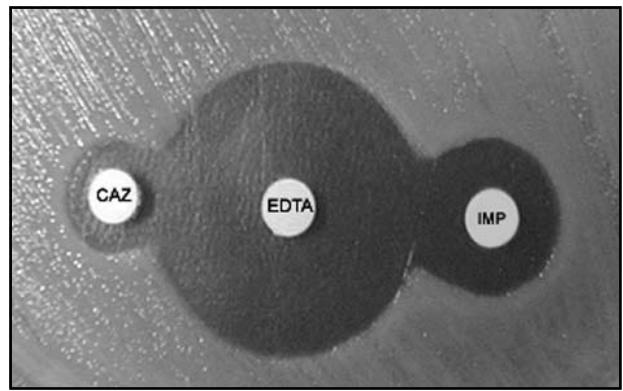


Figura 5 – Amostra clínica apresentando teste fenotípico negativo para a produção de MBL. O teste não evidencia alteração no halo de inibição do crescimento da bactéria testada na região do ágar onde houve a difusão do agente quelante (EDTA)

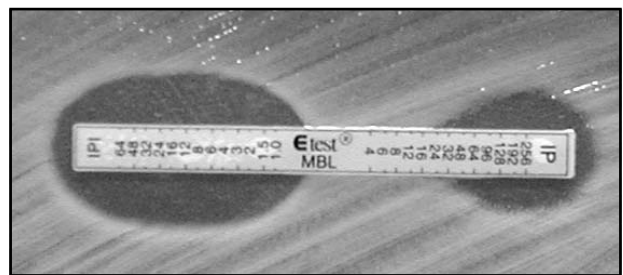


Figura 6 – Amostra clínica apresentando teste fenotípico positivo para a produção de MBL por meio da metodologia de Etest®. A CIM observada pela amostra-teste na extremidade da fita contendo somente imipenem (IP) é de 48µg/ml, ao passo que, na outra extremidade, a amostra testada demonstrou uma CIM ≤ 1µg/ml contra imipenem associado ao EDTA. Uma diferença na CIM superior a três diluições.

uma concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem associado ao EDTA três diluições menor ou inferior àquela demonstrada pela amostra frente ao imipenem (**Figura 6**).

Essas metodologias demonstram facilidade em detectar amostras produtoras de MBL que apresentam fenótipo de resistência ao imipenem, pois a diferença observada entre o halo de inibição de crescimento bacteriano com o agente quelante e sem a presença desse é bastante visível. Entretanto, a expressão fenotípica de MBL em membros da família *Enterobacteriaceae* geralmente não ocasiona o mesmo fenótipo de resistência ao imipenem demonstrado por BGN-NF, o que pode dificultar a detecção⁽⁸¹⁾.

Até o presente momento, o CLSI não sugere nenhum teste para detecção de amostras produtoras de MBL, uma vez que esse mecanismo de resistência não é prevalente nos EUA⁽¹²⁾. No entanto, recentemente foi constatado que 41,3% das amostras de *P. aeruginosa* (85/206) resistentes a carbapenems isoladas de distintos hospitais brasileiros eram produtoras de MBL, evidenciando uma realidade diferente daquela encontrada nos EUA e enfatizando a necessidade da realização de testes de detecção para esse fenótipo de resistência em nossos laboratórios de microbiologia.

Já o controle de qualidade do teste fenotípico de detecção da produção de MBL pode utilizar a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controle negativo. Uma cepa sabidamente produtora de MBL, tal qual a cepa *P. putida* 48-12346, pode vir a ser utilizada como controle positivo. Essa última cepa foi isolada de hemocultura de paciente internado no Hospital São Paulo e demonstrou resistência a todos os betalactâmicos testados, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, sendo sensível somente à polimixina. Estudos moleculares posteriores evidenciaram a presença de um integron de classe 1, o qual continha três cassetes gênicos. O gene *bla_{IMP-1}* foi encontrado na primeira posição, seguido de dois genes que conferem resistência a aminoglicosídeos (*aadA31* e *aadA1*). Esta cepa encontra-se à disposição daqueles interessados no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) ou Laboratório ALERTA⁽⁴²⁾.

Vale a pena ressaltar que o teste fenotípico para detecção de amostras produtoras de MBL somente deve ser realizado quando houver objetivos bem estabelecidos, visto que o conhecimento do mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência a carbapenens, por si só, não fornece benefício adicional à terapêutica antimicrobiana. Na presença de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* não-sensíveis a carbapenens, testes fenotípicos para detecção de MBL seriam importantes para se ter conhecimento da prevalência de amostras produtoras de MBL entre as amostras não-sensíveis a carbapenens e,

uma vez que esses microrganismos sejam detectados, pode auxiliar os membros da CCIH para que medidas de controle de infecção possam ser implantadas com o intuito de prevenir a disseminação desses determinantes de resistência, visto que eles estão contidos em estruturas genéticas que propiciam sua mobilidade de forma muito efetiva.

Conclusões

O encontro de diferentes enzimas em diferentes espécies bacterianas evidencia a real capacidade de disseminação desses elementos genéticos e causa grande preocupação, uma vez que esses eventos de disseminação podem alcançar maiores proporções. Isso acarretaria importante impacto clínico e as opções terapêuticas para os casos de infecção nosocomial por BGN-NF e membros da família *Enterobacteriaceae* poderiam se tornar limitadas.

Adicionalmente, como a troca de informações genéticas entre microrganismos nunca deixará de ocorrer, medidas de racionalização do uso de agentes antimicrobianos de espectro ampliado também devem ser implantadas com o intuito de minimizar a seleção de subpopulações bacterianas resistentes a carbapenens devido à produção de MBL⁽⁴⁰⁾. Uma vez selecionadas essas subpopulações, metodologias fenotípicas podem ser utilizadas para detecção desses microrganismos para que então, posteriormente, auxiliem as condutas de controle de infecção e, assim, possam prevenir a disseminação desses determinantes de resistência^(38, 73).

Referências

1. AFZAL-SHAH, M. et al. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 2, p. 583-8, 2001.
2. ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 1, p. 40-3, 2000.
3. AVISON, M. B. et al. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 2, p. 413-9, 2001.
4. BAHAR, G. et al. Detection of VIM-5 metallo-β-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*, v. 54, n. 1, p. 282-3, 2004.
5. BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother*, v. 43, n. 1, p. 1-4, 1999.
6. BOU, G. et al. OXA-24, a novel class D β-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 6, p. 1556-61, 2000.
7. BUSH, K. Metallo-β-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis*, v. 27, suppl. 1, p. S48-S53, 1998.
8. BUSH, K. et al. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, n. 6, p. 1211-33, 1995.
9. CASTANHEIRA, M. et al. Characterisation of mobile elements carrying metallo-β-lactamase genes, *bla_{IMP-1}*, *bla_{IMP-16}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-2}* from Latin American Medical Centres: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, n. C2-2023, p. 153, 2003.

10. CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1'}, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 12, p. 4654-61, 2004.
11. CHU, Y. W. et al. IMP-4, a novel metallo-β-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 3, p. 710-4, 2001.
12. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Fifteenth informational supplement*. v. Fifteenth, n. 25, p. 1-172, 2005.
13. COLLIS, C. M. et al. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol*, v. 9, n. 1, p. 41-52, 1993.
14. COLLIS, C. M.; HALL, R. M. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol*, v. 174, n. 5, p. 1574-85, 1992.
15. COLLIS, C. M.; HALL, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, n. 1, p. 155-62, 1995.
16. COLLIS, C. M. et al. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol*, v. 184, n. 11, p. 3017-26, 2002.
17. COLLIS, C. M. et al. Integron-encoded Int1 integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Mol Microbiol*, v. 46, n. 5, p. 1415-27, 2002.
18. CRESPO, M. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-β-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 11, p. 5094-101, 2004.
19. CROWDER, M. W. et al. Overexpression, purification and characterization of the cloned metallo-β-lactamase LI from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, n. 4, p. 921-6, 1998.
20. DA SILVA, G. J. et al. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5'}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett*, v. 215, n. 1, p. 33-9, 2002.
21. DOCQUIER, J. D. et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-β-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 5, p. 1522-8, 2003.
22. DONALD, H. M. et al. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 1, p. 196-9, 2000.
23. GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.
24. GALES, A. C. et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 45, n. 1, p. 77-9, 2003.
25. GIBB, A. P. et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 1, p. 255-8, 2002.
26. GRINBAUM, R. S. et al. IMP-1 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a Brazilian teaching hospital. *44th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. C2-1355, p. 112, 2004.
27. HERITIER, C. et al. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 1, p. 268-73, 2003.
28. IYOBE, S. et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 8, p. 2023-7, 2000.
29. IYOBE, S. et al. Detection of a variant metallo-β-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 6, p. 2014-6, 2002.
30. KOH, T. H. et al. IMP-1 and a novel metallo-β-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 6, p. 2334-6, 2004.
31. LARAKI, N. et al. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-β-lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 4, p. 902-6, 1999.
32. LARTIGUE, M. F. et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an *Enterobacteriaceae* isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 12, p. 4929-30, 2004.
33. LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 7, p. 1584-90, 1999.
34. LEE, K. et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 10, p. 4623-9, 2003.
35. LEE, K. et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, *bla*_{SIM-1'}, in a class I integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.
36. LINCOPAN, N. et al. First isolation of metallo-β-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 1, p. 516-9, 2005.
37. LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*, v. 47, n. 3, p. 247-50, 2001.
38. LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002.
39. MASSIDDA, O. et al. The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-β-lactamases. *J Bacteriol*, v. 173, n. 15, p. 4611-7, 1991.

40. MENDES, R. E. *Caracterização dos elementos móveis responsáveis pela disseminação de genes associados à resistência bacteriana em Pseudomonas spp. isoladas na América Latina*. 2005. Tese (doutoramento) – Disciplina de Infectologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
41. MENDES, R. E. et al. First isolation of bla_{VIM-2} in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 4, p. 1433-4, 2004.
42. MENDES, R. E. et al. Characterization of novel insertion sequences in bla_{IMP-1} integrons among gram-negative clinical isolates in São Paulo, Brazil. *44th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. CI-298, p. 66, 2004.
43. MENDES, R. E. et al. Integron Carrying a novel metallo- β -lactamase gene, bla_{IMP-16} and a Fused form of aminoglycoside-resistant gene $aac(6')-30/aac(6')-Ib'$: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 12, p. 4693-702, 2004.
44. MURPHY, T. A. et al. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 2, p. 582-7, 2003.
45. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Approved standard M2-A8: performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. 8th ed. 2003. n. 20.
46. OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 38, n. 1, p. 71-8, 1994.
47. PARTRIDGE, S. R. et al. Characterization and movement of the class I integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 5, p. 1288-94, 2002.
48. PARTRIDGE, S. R. et al. Definition of the *attI* site of class I integrons. *Microbiology*, v. 146 (Pt 11), p. 2855-64, 2000.
49. PASTERAN, F. et al. Novel variant bla_{VIM-11} of the metallo- β -lactamase bla_{VIM} family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 1, p. 474-5, 2005.
50. PATZER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual bla_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). *J Antimicrob Chemother*, v. 53, n. 3, p. 451-6, 2004.
51. PELLEGRINO, F. L. et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 2420-4, 2002.
52. POIREL, L. et al. Characterization of class I integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 2, p. 546-52, 2001.
53. POIREL, L. et al. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene bla_{SPM-1} -surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 4, p. 1406-9, 2004.
54. POIREL, L. et al. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 1, p. 202-8, 2005.
55. POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 4, p. 891-7, 2000.
56. POIREL, L.; NORDMANN, P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 3, n. 2, p. 117-27, 2002.
57. POURNARAS, S. et al. Novel variant bla_{VIM-4} of the metallo- β -lactamase gene bla_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 12, p. 4026-8, 2002.
58. PRATS, G. et al. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 3, p. 932-3, 2002.
59. QUINTEIRA, S. et al. Characterization of In100, a new integron carrying a metallo- β -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 1, p. 451-3, 2005.
60. RECCHIA, G. D.; HALL, R. M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol*, v. 5, n. 10, p. 389-94, 1997.
61. RICCIO, M. L. et al. 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 Chemother*, v. 44, n. 5, p. 1229-35, 2000.
62. RICCIO, M. L. et al. Clonal relatedness and conserved integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo- β -lactamase from different Italian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 1, p. 104-10, 2005.
63. ROSSOLINI, G. M. et al. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile. *Biochem J*, v. 332 (Pt 1), p. 145-52, 1998.
64. SIMM, A. M. et al. A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett*, v. 509, n. 3, p. 350-4, 2001.
65. SPENCER, J. et al. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic β -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- β -lactamase. *J Biol Chem*, v. 276, n. 36, p. 33638-44, 2001.
66. STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, v. 3, n. 12, p. 1669-83, 1989.
67. THOMPSON, J. S.; MALAMY, M. H. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between

- CfiA and *Bacillus cereus* β-lactamase II. *J Bacteriol*, v. 172, n. 5, p. 2584-93, 1990.
68. TOGNIM, M. C. Dissemination of IMP-1 metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006. In press.
69. TOLEMAN, M. A. et al. Genetic characterization of a novel metallo-β-lactamase gene, *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 4, p. 583-90, 2003.
70. TOLEMAN, M. A. et al. Italian metallo-β-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*, v. 55, n. 1, p. 61-70, 2005.
71. TOLEMAN, M. A. et al. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo-β-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 1, p. 329-32, 2004.
72. TOLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*, v. 50, n. 5, p. 673-9, 2002.
73. URBAN, C. et al. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*, v. 36, n. 10, p. 1268-74, 2003.
74. WALSH, T. R. et al. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-β-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 8, p. 2755-9, 2002.
75. WALSH, T. R. et al. Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo-β-lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *J Antimicrob Chemother*, v. 37, n. 3, p. 423-31, 1996.
76. WALSH, T. R. et al. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-β-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, n. 2, p. 436-9, 1998.
77. WALSH, T. R. et al. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*, v. 52, n. 1, p. 116-9, 2003.
78. WOODFORD, N. et al. Carbapenemases of *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution of *bla*_B and characterization of a novel metallo-β-lactamase gene, *bla*_{B3}, in the type strain, NCTC 10016. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 6, p. 1448-52, 2000.
79. YAN, J. J. et al. Metallo-β-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 8, p. 2224-8, 2001.
80. YAN, J. J. et al. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1 and a variant of IMP-2 metallo-β-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 8, p. 2368-71, 2001.
81. YAN, J. J. et al. Comparison of the double-disk, combined disk and Etest methods for detecting metallo-β-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 49, n. 1, p. 5-11, 2004.
82. YANO, H. et al. Plasmid-encoded metallo-β-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 5, p. 1343-8, 2001.
83. YUM, J. H. et al. Molecular characterization of metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J Antimicrob Chemother*, v. 49, n. 5, p. 837-40, 2002.

Endereço para correspondência

Rodrigo Elisandro Mendes
 Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
 Laboratório ALERTA
 Rua Leandro Dupret, 188 – Vila Clementino
 CEP 04025-010 – São Paulo-SP
 Fone/Fax: + 55 (11) 5576-4591/5571-5180/5576-4393
 E-mail: rodrigo.mendes@lemc.com.br
 Site: www.lemc.com.br