

Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza

Primeira submissão em 16/12/03
Última submissão em 22/05/06
Aceito para publicação em 12/06/06
Publicado em 20/10/06

Metallo-betalactamase producing Pseudomonas spp. strains isolated in the Hospital Geral de Fortaleza

Júlio César Nogueira Torres¹; Everardo Albuquerque Menezes²; Maria Rozellê Ferreira Ângelo³; Inácio Regis Nascimento Oliveira³; Maria Núbia Cavalcante Salviano³; Danilo Elias Xavier⁴; Lauro Santos Filho⁵

unitermos	resumo
<i>Pseudomonas</i> spp.	<p><i>Pseudomonas</i> sp. é um bacilo gram-negativo ubíquo de vida livre e freqüente em ambientes hospitalares. Bactérias produtoras de metalo-betalactamases (MBLs) são em grande parte resistentes aos betalactâmicos de largo espectro, incluindo cefalosporinas e carbapenens. Este trabalho objetivou detectar cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. resistentes ao imipenem e à ceftazidima, assim como identificar aquelas produtoras de MBLs. Foram estudadas (entre junho de 2002 e junho de 2003) 311 cepas isoladas de diversas amostras clínicas no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), bem como foram realizados testes de identificação e sensibilidade pelo sistema de automação MicroScan®/WalkAway, sendo as cepas multirresistentes confirmadas através do método de difusão em disco. A triagem para detecção de amostras produtoras de MBLs foi realizada pelo método de dupla difusão, utilizando discos com mercaptoacetato de sódio. Entre essas amostras, 24 (7,71%) demonstraram produção de MBLs e padrão de multirresistência entre as cepas estudadas. Os antimicrobianos para os quais as cepas apresentaram maior sensibilidade foram a piperacilina/tazobactam com 255 (82%) de sensibilidade, seguido da piperacilina isoladamente, com 229 (73,63%); imipenem com 195 (62,70%); ticarcilina/ácido clavulânico com 193 (62,05%); e ceftazidima com 138 (44,37%). A detecção dessas amostras configura um problema emergente, com importantes implicações na terapêutica antimicrobiana.</p>
Metallo-betalactamases	
Imipenem	
Ceftazidima	

abstract key words

Pseudomonas sp. is a ubiquitous gram-negative bacilli, of free and frequent life in hospital environment. Metallo-betalactamases (MBLs) productive bacteria are largely resistant to betalactamics of wide spectrum, including cephalosporin and carbapenem. The objective of this work was to detect *Pseudomonas* spp. strains resistant to imipenem and ceftazidime, as well as to identify the MBLs producer ones. It was studied 311 isolated strains from several clinical samples at Fortaleza General Hospital (FGH), from June 2002 to June 2003. Identification and sensibility tests were done by the MicroScan®/WalkAway automation system. The multiresisting strains were confirmed by the diffusion method in disk. The triage to detect MBLs productive samples was accomplished by the double diffusion method, using disks containing sodium mercaptoacetat. Among these samples, 24 (7.71%) indicated production of MBLs and multiresistance standard in the midst of the studied strains. The antimicrobials to which the strains presented larger sensibility were piperacillin/tazobactam, with 255 (82%) of sensibility, followed by isolated piperacillin with 229 (73.63%); imipenem with 195 (62.70%); ticarcillin/clavulanic acid with 193 (62.05%); and ceftazidime with 138 (44.37%). The detection of these samples configures an emerging problem, with important implications in the antimicrobial therapeutic.

Pseudomonas sp.
Metallo-betalactamases
Imipenem
Ceftazidime

1. Farmacêutico/bioquímico do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (UFC).

2. Professor de Microbiologia da UFC.

3. Farmacêuticos/bioquímicos do Hospital Geral de Fortaleza.

4. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

5. Professor de Microbiologia da UFPB.

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete gram-negativo ubíquo de vida livre encontrado em ambientes úmidos, como água, solo, plantas e detritos. Embora raramente possam causar patologias em indivíduos saudáveis, essas bactérias são uma grande ameaça a pacientes hospitalizados, particularmente aqueles com sérias doenças de base⁽⁹⁾. É um patógeno oportunista causador de bacteremias em pacientes imunocomprometidos, vítimas de queimaduras, portadores de infecções urinárias associadas ao uso de cateteres e de pneumonias hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva^(19, 26).

A importância clínica dos bacilos gram-negativos não-fermentadores tem aumentado significativamente em razão da gravidade das infecções, das altas taxas de morbimortalidade em pacientes hospitalizados e do grande índice de resistência. Uma das características da *P. aeruginosa* é seu alto nível de resistência intrínseca a agentes antimicrobianos estruturalmente diferentes. Devido ao seu largo espectro de atividade, à estabilidade e à hidrólise na maioria das betalactamases, os carbapenems têm sido considerados as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes às cefalosporinas⁽³⁾.

Bactérias gram-negativas resistentes ao carbapenem, incluindo linhagens de enterobactérias e de *P. aeruginosa*, têm sido isoladas freqüentemente, com capacidade de produzir metalo-betalactamases (MBLs) que são enzimas com atividade sobre vários betalactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenems, e ainda sobre os inibidores de betalactâmicos, como ácido clavulânico e sulbactam^(1, 4). Como na classe dos antibióticos betalactâmicos os carbapenems são os que possuem o mais amplo espectro de atividade, portanto, amostras de *P. aeruginosa* resistentes a esses agentes devem ser registradas⁽⁷⁾.

As MBLs pertencem ao grupo 3 das betalactamases de espectro ampliado, fazendo parte de uma classe funcional comum de metaloenzimas classificadas com base em sua habilidade de hidrolisar o imipenem em um nível mensurável, assim como sua suscetibilidade aos inibidores de betalactamases disponíveis comercialmente^(5, 20).

A propagação e a disseminação desse tipo de microrganismo têm sido confirmadas em vários locais, como Japão, Itália, Cingapura, Inglaterra, Portugal, Grécia, Taiwan e França^(7, 8, 10, 18, 26, 28, 29). No Brasil, foram isoladas as primeiras amostras no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), mas também houve registros na região Nordeste, na cidade

de João Pessoa, e em São Paulo^(17, 21, 25). Inclusive com as caracterizações bioquímica e molecular de uma nova MBL, diferente daquelas classificadas como VIM e IMP, obtida de uma amostra isolada na cidade de São Paulo e denominada SPM-1, que constitui uma nova subfamília com características próprias⁽¹³⁾.

Como os produtores de MBLs tendem a demonstrar resistência a drogas betalactâmicas de amplo espectro, sua detecção preliminar é importante para o controle de infecções e orientação adequada da terapêutica^(1, 5), estabelecendo um método de difusão com duplo disco para triagem de bactérias produtoras de MBLs, através do uso do ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). No entanto, seu uso é limitado devido a sua alta volatilidade, sendo então utilizado em seu lugar o mercaptoacetato de sódio⁽²⁴⁾.

Após considerar os altos índices de resistência de *Pseudomonas* spp. no Hospital Geral de Fortaleza (HGF) e a inexistência de trabalhos sobre o tema nessa região, estudamos a produção de metalo-betalactamases em cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de vários espécimes clínicos de pacientes atendidos no HGF.

Material e métodos

Isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp.

De junho de 2002 a junho de 2003 foram realizadas 311 culturas de vários espécimes clínicos (aspirado traqueal, cateter, hemocultura, urina, ferida cirúrgica e secreções) de pacientes atendidos no HGF, sendo selecionada, de forma consecutiva, uma amostra por cada paciente.

As 311 cepas de *Pseudomonas* spp. foram isoladas no laboratório de patologia clínica em meio ágar sangue e ágar MacConkey (Difco) e a identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos foram feitas pelo aparelho de automação MicroScan® WalkAway (DADE), com as cartelas NC-20 e NU-C2.

Confirmação de cepas resistentes

As cepas multirresistentes, no total de 24, foram assim classificadas quando apresentavam resistência aos antimicrobianos de largo espectro (ceftazidima e imipenem), sendo reisoladas em ágar MacConkey e novamente testadas pelo método de difusão em Ágar, segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^(15, 16), com discos (Oxoid) de sensibilidade à ceftazidima (30mg) e ao imipenem (30mg). As 24 cepas com perfil de multirresistência apre-

sentaram resistência aos antimicrobianos anti-*Pseudomonas*, bem como ao imipenem e à ceftazidima, sendo dessa forma confirmados como verdadeiramente resistentes.

Detecção de cepas produtoras de betalactamases

O método utilizado foi o de dupla difusão com discos em superfície de ágar, utilizando-se discos com ceftazidima, imipenem e meropenem associados a discos padronizados contendo mercaptoacetato de sódio (SMA – Eiken Chemical, Japão), obtendo-se zonas de inibição próximas aos discos nos casos positivos^(14, 21). Não há referências de cepas-controle padronizadas para esse teste.

A dupla difusão com discos consiste em diluir as amostras bacterianas em caldo de Mueller-Hinton (Difco) para se obter uma concentração aproximada de 10^6 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml), sendo então espalhada em uma placa de Petri (10mm x 100mm), com ágar Mueller-Hinton (Difco)⁽¹⁶⁾. Dois discos comerciais de ceftazidima (30mg) foram então colocados sobre a placa inoculada. A distância entre os discos foi de aproximadamente 30mm. Um disco padronizado com 3mg de mercaptoacetato de sódio (SMA – Eiken Chemical, Japão) foi colocado 15mm abaixo do segundo disco. Essa mesma técnica foi realizada com discos (Oxoid) de sensibilidade ao imipenem e ao meropenem. A cepa-teste foi considerada produtora de MBL quando uma diferença de 5mm ou mais era observada entre os diâmetros da zona de inibição, ao se comparar os dois discos de antibióticos⁽¹⁴⁾.

Resultados

No período estudado foram isoladas 311 cepas de *Pseudomonas*, sendo 307 (98,71%) identificadas como *P. aeruginosa* e 4 (1,29%) como *P. stutzeri*.

Em relação aos espécimes clínicos, como observado na **Tabela 1**, o maior percentual de isolados de *Pseudomonas* spp. foi no aspirado traqueal, com 82 amostras (26,36%), na urina 72 (23,15 %) e no sangue 40 amostras (12,86%).

Os locais com maior incidência de infecção por *Pseudomonas* spp. foram a unidade de terapia intensiva (UTI), com 53 amostras (17,04%), e a unidade de tratamento de urgência (UTU), com 53 amostras (17,04%); seguidas pela clínica médica interna, com 44 amostras (14,14%), emergência com 37 (11,89%) e clínica cirúrgica, com 34 amostras (10,97%) (**Tabela 2**). Os outros estão representados por setores que não atingiram a frequência de 1%.

Os antimicrobianos para os quais as 311 cepas apresentaram maior sensibilidade foram piperacilina/tazobactam, com 255 amostras (82%) de sensibilidade; seguido da piperacilina isoladamente, com 229 amostras (73,63%), imipenem com 195 (62,70%), ticarcilina/ácido clavulânico com 193 (62,05%) e ceftazidima, com 138 amostras (44,37%). Os antimicrobianos com menores índices de sensibilidade foram cefotaxima, com apenas 15 amostras (4,82%) de sensibilidade, e ceftriaxona com 28 (9%) (**Tabela 3**).

Das 311 cepas de *Pseudomonas* isoladas de pacientes do HGF, 24 (7,71%) produziram MBLs usando o mercaptoacetato de sódio (SMA) como triagem.

Tabela 1 Espécimes clínicos com isolamento de *Pseudomonas* spp. no Hospital Geral de Fortaleza no período de junho de 2002 a junho de 2003

Espécimes clínicos	%	n
Aspirado traqueal	26,36	82
Urina	23,15	72
Sangue	12,86	40
Cateter vascular	6,11	19
Ferida cirúrgica	6,11	19
Secreção abdominal	3,54	11
Líquido ascítico	1,93	6
Líquido peritoneal	1,29	4
Secreção ocular	1,29	4
Não especificado	1,93	6
Outros	15,43	48

Tabela 2**Setores do Hospital Geral de Fortaleza onde foram isoladas cepas de *Pseudomonas* spp. no período de junho de 2002 a junho de 2003**

Setores do HGF	%	n
UTU	17,04	53
UTI	17,04	53
Clínica Médica Interna	14,15	44
Cirurgia	10,93	34
Emergência	11,89	37
Berçário	8,05	25
Clínica Médica Ambulatorial	1,93	6
Urologia Interna	0,96	3
Transplante Renal	1,93	6
Não especificado	1,93	6
Outros	14,15	44

HGF: Hospital Geral de Fortaleza; UTU: unidade de tratamento de urgência; UTI: unidade de terapia intensiva.

Tabela 3**Perfil de sensibilidade das 311 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de pacientes atendidos no Hospital Geral de Fortaleza**

Antimicrobianos	%	n
Cefotaxima	4,82	15
Ceftriaxona	9	28
Gentamicina	34,73	108
Ciprofloxacina	38,26	119
Tobramicina	40,84	127
Amicacina	44,37	138
Ceftazidima	44,37	138
Cefepime	46,25	144
Ticarcilina/ácido clavulânico	62,05	193
Imipenem	62,70	195
Piperacilina	73,63	229
Piperacilina/tazobactam	82	255

Discussão

A disseminação de bactérias gram-negativas com resistência adquirida a vários betalactâmicos de amplo espectro está se tornando um problema mundial^(1, 6, 11).

É grande o número e a variedade de novas betalactamases que têm surgido, como as de espectro ampliado. Essas enzimas são caracterizadas pela capacidade em degradar praticamente todos os antibióticos betalactâmicos. Com a

introdução de novos betalactâmicos, observaram-se mudanças em betalactamases com aumento na prevalência de enzimas mais antigas, aparecimento e alteração no nível da expressão de enzimas novas⁽²⁾.

Linhagens de bactérias gram-negativas com capacidade de produzir MBLs têm sido isoladas freqüentemente, principalmente cepas de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*. A propagação e a disseminação desse tipo de microrganismo têm sido confirmadas em vários locais,

como Japão, Itália, Cingapura, Inglaterra, Portugal, Grécia e Taiwan^(7, 8, 10, 26, 28, 29).

A situação no Japão é mais preocupante, porque os carbapenêmicos são líderes de mercado entre os antimicrobianos beta-lactâmicos parenterais, contrastando com outras áreas geográficas onde os carbapenens são usados em bases mais restritas^(20, 23).

No Brasil, foram isoladas as primeiras amostras no HUCFF/UFRJ⁽¹⁷⁾. Na literatura nacional temos poucos estudos sobre o assunto, e no nordeste brasileiro apenas o grupo da Paraíba estuda cepas de *P. aeruginosa* resistentes às MBLs⁽²²⁾.

Para testar as cepas de *P. aeruginosa* no HGF usamos as técnicas desenvolvidas por Arakawa et al.⁽¹⁾, e modificadas por Nakajima et al.⁽¹⁴⁾, no Japão. Os autores testaram vários produtos químicos inibidores das MBLs, estabelecendo um método conveniente de difusão com duplo disco para triagem de bactérias produtoras de MBLs, através do uso do 2-MPA. Entre os inibidores de MBLs usados, o 2-MPA apresentou os melhores resultados, pelo fato de que esse agente químico bloqueia a atividade mais efetivamente, mesmo em baixa concentração. No entanto, seu uso é limitado em virtude de sua alta volatilidade.

Como os produtores de MBLs tendem a demonstrar resistência às drogas beta-lactâmicas de largo espectro, incluindo cefalosporinas e carbapenens, sua detecção preliminar é importante para o controle de infecções e a orientação adequada da terapêutica, daí o nosso interesse em realizar este estudo.

O antimicrobiano ceftazidima pareceu ser o substrato mais adequado para esse teste, considerando-se que amostras produtoras de MBLs usualmente demonstram alto nível de resistência à ceftazidima, fato confirmado em estudos anteriores em que um considerável efeito inibitório dos compostos tiólicos geralmente foi observado⁽²⁾.

O método de difusão usando o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para triagem dessas amostras tem sido reportado, contudo, o EDTA inibe, por si mesmo, o crescimento bacteriano de algumas espécies e/ou linhagens bacterianas, dificultando a interpretação dos resultados obtidos⁽¹⁾.

Para atingirmos o principal objetivo deste trabalho foi realizado teste utilizando o SMA (Eiken Chemical, Japão), um composto estabilizado que pode ser incorporado a discos de papel de filtro, na concentração de 3mg/disco, sendo conveniente para triagem de MBLs em rotina de laboratórios clínicos. Além disso, o mercaptoacetato de sódio apresenta um forte efeito inibitório nas MBLs, associado à baixa atividade bactericida (concentração inibitória

mínima [MIC] > 400mg/ml), conferindo ao teste maior especificidade.

Foram identificadas no HGF (de junho de 2002 a junho de 2003) 311 cepas de *Pseudomonas* spp. de vários sítios anatômicos. Em trabalho realizado por Menezes et al.⁽¹²⁾ no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará (UFC) observou-se o isolamento de 110 cepas de *Pseudomonas* spp. no período de seis meses. Em outro estudo Santos Filho et al.⁽²¹⁾ isolaram 198 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* na cidade de João Pessoa. Ao comparar com os nossos resultados, concluímos que no HGF a *Pseudomonas* spp. é mais freqüente do que nos dois locais citados.

Das 311 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de pacientes do HGF, 24 produziram MBLs utilizando o SMA como triagem de MBLs, isto é, 7,71% das cepas são produtoras de MBLs. Em trabalho realizado em João Pessoa por Santos Filho et al.⁽²¹⁾, com a mesma metodologia de triagem, observou-se que 2% das cepas de *Pseudomonas* spp. demonstraram produção de MBLs.

Em trabalho semelhante ao nosso, realizado na Grécia por Tsakris et al.⁽²⁶⁾, verificou-se que 2,8% das cepas de *P. aeruginosa* foram MBLs positivas. Em nosso trabalho obtivemos um percentual superior (7,71%), sugerindo que as cepas isoladas no HGF são mais resistentes.

Em relação aos sítios anatômicos, onde as cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBLs foram isoladas, a urina foi a mais freqüente, seguida do sangue e do aspirado traqueal. Segundo Santos Filho et al.⁽²¹⁾, o trato respiratório foi o local de maior incidência de isolamento de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBLs, em seguida o trato urinário e, por último, o sangue. As diferenças nos índices de isolamento se devem provavelmente ao fato de o nosso trabalho ter estudado cepas de infecções hospitalares e de que Santos Filho et al.⁽²¹⁾ utilizaram cepas hospitalares e comunitárias.

Quanto à procedência das cepas de *P. aeruginosa*, observamos que a UTU foi o setor onde houve maior isolamento de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase. Do total de 24 cepas, tivemos MBLs positivas em nove cepas (37,5%), em seguida aparecem a UTI e a Emergência com quatro cepas positivas cada (16,67%). Na literatura não encontramos relatos sobre a procedência de *P. aeruginosa* produtora de beta-lactamases.

Em relação ao padrão de suscetibilidade e de resistência das 311 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de pacientes do HGF, podemos observar que a cefotaxima e a ceftriaxona foram os antimicrobianos que mostraram as mais altas

taxas de resistência, enquanto imipenem, piperacilina e piperacilina + tazobactam foram os mais sensíveis.

Em trabalho realizado em João Pessoa por Santos Filho et al.⁽²¹⁾, gentamicina, cefpiroma e aztreonam foram os antimicrobianos para os quais as amostras bacterianas mostraram-se mais resistentes, sendo os mais sensíveis a colistina e a ceftazidima. Já em um trabalho realizado por Menezes et al.⁽¹²⁾ no complexo hospitalar da UFC, as cepas de *Pseudomonas* spp. foram mais resistentes à nitrofurantoína e à tetraciclina, e mais sensíveis ao imipenem e à ceftazidima. Ao comparar os resultados, podemos observar que o perfil de resistência do HGF é totalmente diferente dos citados anteriormente.

O uso abusivo de cefalosporinas de terceira geração, especialmente ceftazidima, parece ser a principal causa desse mecanismo de resistência⁽²⁾.

Os carbapenens são antimicrobianos usados geralmente como drogas de reservas no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes a outros agentes betalactâmicos, considerando seu espectro de atividade e estabilidade à hidrólise pela maioria das betalactamases, incluindo as betalactamases de espectro ampliado. Desse modo, recomenda-se restrição no uso de cefalosporinas e de carbapenens como medida de prevenção da disseminação de bactérias gram-negativas do tipo *P. aeruginosa* com capacidade de produzir MBLs⁽²²⁾.

O surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é inevitável devido à conservação e à perpetuação das espécies, mas o controle na utilização dos mesmos pode

limitar o aparecimento de cepas multirresistentes. O combate a esses microrganismos em hospitais pode ser realizado através do conhecimento da microbiota local e da valorização das comissões de controle de infecção hospitalar.

É importante conhecer infecções causadas por bactérias produtoras de MBLs, servindo de alerta para motivar ações necessárias à prevenção da disseminação dessas bactérias.

A resistência mediada por plasmídeos exerce papel importante na expansão e multiplicação das betalactamases de espectro ampliado, que representam resistência às cefalosporinas e aos carbapenens. Portanto, configura-se como necessidade primordial a implantação na rotina laboratorial de testes para detecção preliminar de cepas produtoras de MBLs que sejam práticos e aplicáveis. A implementação desses testes é fundamental na confirmação do mecanismo de resistência, adequando-se aos diversos métodos disponíveis.

A interpretação criteriosa do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é fundamental para detectar essas enzimas, auxiliando o clínico na indicação de um tratamento adequado e eficaz.

Uma limitação deste trabalho é a não-realização da tipagem molecular para caracterização da circulação de clones predominantes ou não.

Agradecimentos

Ao Dr. Kazuhiro Nakajima (Microbiological Reagents Dept., Eiken Chemical Co., Japão), que gentilmente cedeu os discos padronizados de mercaptoacetato de sódio.

Referências

1. ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo β -lactamase: producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 40-3, 2000.
2. BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das betalactamases de espectro ampliado. *NewsLab*, v. 40, p. 86-96, 2000.
3. BRADLEY, J.S. et al. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int J Antimicrob Agents*, v. 11, p. 93-100, 1999.
4. BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 1211-33, 1995.
5. BUSH, K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clinical Infect Dis*, v. 27, p. S48-S53, 1998.
6. BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infect Dis*, v. 32, p. 1085-9, 2001.
7. CARDOSO, O. et al. Carbapenem-hydrolysing from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Portugal. *J Antimicrob Chemother*, v. 44, p. 135-8, 1999.
8. CORNAGLIA, G. et al. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet*, v. 353, p. 899-900, 1999.
9. DUBOIS, V. et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 2072-8, 2001.
10. KOH, T.H. et al. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Lancet*, v. 353, p. 2162-4, 1999.

11. KONEMAN, E.W. et al. *Diagnóstico microbiológico*. São Paulo: Editora MEDSI, 2001.
12. MENEZES, E. A. et al. Cepas de *Pseudomonas* resistentes a antimicrobianos testados no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Bras Anál Clín*, v. 34, p. 27-30, 2002.
13. MURPHY, T.A. et al. Biochemical characterization of acquired metallo- β -lactamase SPM-I from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 582-7, 2003.
14. NAKAJIMA, K. et al. Disk diffusion and microdilution tests for screening metallo- β -lactamase producing bacteria. Abstract C-287. In: 101th ASM General Meeting. Orlando, FL; 2001.
15. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Approved standard M2-A4. Vilanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA; 1984.
16. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA; 1999.
17. PELLEGRINO, F.L.P. et al. Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro. Abstract L-14. In: 101th ASM General Meeting. Orlando, FL; 2001.
18. POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2 carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase, and its plamid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 891-7, 2000.
19. POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin (eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5 ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2000; p. 2310-35.
20. RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem-hidrolizing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 41, p. 223-31, 1997.
21. SANTOS FILHO, L. Determinação da produção de metalo β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J Bras Patol Med Lab*, v. 38, p. 79-84, 2002.
22. SANTOS FILHO, L. *Diagnóstico microbiológico*. 3 ed. João Pessoa, 2003.
23. SENDA, K. et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (^{bla}IMP) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol*, v. 34, p. 2909-13, 1996.
24. SHIBATA, N. et al. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase among Gram-negative rods detected by thiol compounds in Japan. Abstract C-524. In: 101th ASM General Meeting. Orlando, FL; 2001.
25. TOLEMAN, M.A. et al. Molecular characterization of SPM-I, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from SENTRY antimicrobial surveillance programmer. *J. Antimicrob Chemother*, v. 44, p. 891-7, 2000.
26. TSAKRIS, A. et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 1290-2, 2000.
27. WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, p. 147-51, 1991.
28. WOODDFORD, N. et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in UK. *Lancet*, v. 352, p. 546-7, 1998.
29. YAN, J.J. et al. Metallo- β -lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, p. 2224-8, 2001.

Endereço para correspondência

Rua Juazeiro do Norte, 199/302 – Meireles
 CEP: 60165-110 – Fortaleza-CE
 Tel.: (85) 3366-8266
 Fax: (85) 3366-8292