

Detecção molecular de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em um hospital do interior do Rio Grande do Sul.

Molecular detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in a hospital in the interior of Rio Grande do Sul.

Carolina Jahn¹, Clairton Edinei dos Santos¹, Emelin Pappen², Janine de Melo Rauber³,
Luciana de Souza Nunes⁴, Danielly Joani Bullé¹, Jane Dagmar Pollo Renner²

¹ Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul, RS Brasil;

² Programa de Pós Graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil;

³ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil;

⁴ Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil.

Data de submissão: 12/09/2016

Data de aceite: 06/10/2016

janerrenner@unisc.br

RESUMO

Justificativa e objetivo: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é responsável por causar grande variedade de infecções agudas e crônicas. A resistência aos carbapenêmicos está se tornando um problema terapêutico mundial e a produção de metalo-beta-lactamases (MBL) tem surgido como um dos mecanismos responsáveis por esta resistência. Objetivou-se identificar as cepas produtoras de MBL e verificar a presença dos genes codificador *bla*NDM, *bla*SPM e *bla*IMP em isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens. **Métodos:** Foram analisadas 16 cepas de *P. aeruginosa*, isoladas de indivíduos atendidos pelo Hospital do Vale do Rio Pardo-RS, no período de março 2014 a fevereiro de 2015. A identificação bioquímica foi realizada segundo protocolo da ANVISA e o antibiograma pelo método de ágar difusão em disco. A triagem fenotípica foi feita pelo teste modificado de aproximação de discos utilizando o EDTA como inibidor e a presença dos genes através da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Resultados:** O setor clínico com maior prevalência de isolamento de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenens é a unidade de terapia intensiva (62,5%). Em relação aos espécimes clínicos, 62,5% dos isolados foram identificados no trato respiratório inferior. Através do teste fenotípico, 50% das amostras analisadas mostraram ser produtora da enzima MBL, enquanto através da técnica de reação em cadeia da polimerase foi possível identificar a presença do gene *bla*SPM. **Conclusão:** Os isolados de *P. aeruginosa* mostraram serem produtores de MBL e apresentaram o gene de resistência *bla*SPM nesta espécie no interior do Rio Grande do Sul.

Palavras Chaves: *Pseudomonas aeruginosa*; metallo-beta-lactamases; *bla*NDM, *bla*IMP, e *bla*SPM.

ABSTRACT

Background and objective: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is responsible for causing wide variety of acute and chronic infections. The carbapenem resistance is becoming a therapeutic problem worldwide and the production of metallo-beta-lactamase (MBL) has emerged as one of the mechanisms responsible for this resistance. This study aimed to identify the strains producing MBL and verify the presence of *bla*NDM encoding genes, *bla*SPM and *bla*IMP in *P. aeruginosa* isolates resistant to carbapenems. **Methods:** 16 strains of *P. aeruginosa* isolated from different sites of individuals served by the Hospital Pardo Valley, RS River were analyzed from March 2014 to February 2015. The biochemical identification was performed according to protocol ANVISA and antibiogram by the method of agar disc diffusion. Phenotypic screening modified test was made by approaching discs using EDTA as an inhibitor and the presence of genes by polymerase chain reaction technique. **Results:** The clinical sector with higher prevalence of isolation of *P. aeruginosa* resistant to carbapenems is the intensive care unit (50%). Regarding clinical specimens, 62.5% of isolates were identified in the lower respiratory tract. Through the phenotypic test, 50% of the samples were shown to be of MBL producing enzyme. By the polymerase chain reaction technique, it was possible to identify one of the three genes proposed, namely *bla*SPM. **Conclusion:** The isolates of *P. aeruginosa* showed as producers of MBL and showed the *bla*SPM resistance gene in this species within the Rio Grande do Sul.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; metallo-beta-lactamase; *bla*NDM, *bla*IMP and *bla*SPM.

INTRODUÇÃO

A infecção hospitalar (IH) é um problema de saúde pública que envolve muitos custos para o hospital. Recentemente tem sido sugerida a mudança do termo Infecção Hospitalar por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), pois este reflete melhor o risco de aquisição dessas infecções. A definição das IRAS se explica como sendo toda a infecção adquirida pelo indivíduo, seja em hospitais, atendimentos em postos ambulatoriais na modalidade de hospital dia ou domiciliar, e que possa estar associada a algum procedimento assistencial, seja ele terapêutico ou diagnóstico.¹

A *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é um bacilo não fermentador responsável por causar uma grande variedade de infecções agudas e crônicas com níveis significativos de morbidade e mortalidade.² Seu sucesso como patógeno vem de sua plasticidade genética, do seu perfil metabólico, de sua intrínseca resistência aos antimicrobianos, de sua capacidade de formar biofilme e da expressão de diversos fatores de virulência.²

Os antibióticos carbapenêmicos, incluindo o imipenem e meropenem, têm sido considerados para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, já que eles não são hidrolisados pela maioria das beta-lactamase de espectro estendido (ESBL).^{3,4,5} No entanto, a prevalência de resistência aos carbapenêmicos por esta bactéria tem aumentado em todo o mundo, particularmente na América Latina.^{3,4,5} Esta resistência pode estar relacionada diversos mecanismos como à ausência da proteína da membrana externa OprD; sobre expressão da bomba de efluxo MexAB-OprM (como no caso da resistência meropenem), aumento da expressão da AMP-C cromossomal ou pela produção de metalo-beta-lactamases (MBL).^{3,4,5}

O mecanismo de ação hidrolítico das beta-lactamases baseia-se na formação de uma ligação éster entre o seu centro ativo de serina e o anel beta-lactâmico, porém, algumas metalo-enzimas utilizam os íons zinco do centro ativo para romper o anel β -lactâmico.⁶ A classificação das beta-lactamases tem sido dificultada pela sua grande diversidade, pelas suas características e pelo constante aparecimento de novas enzimas. Assim, foram propostas diversas classificações, algumas baseadas nas características cinéticas e bioquímicas das enzimas e outras com base molecular.⁴

A mais ampla disseminação das MBL até agora têm sido VIM, IMP, e mais recentemente, New Delhi metalo-beta-lactamase-1 (NDM-1) que tem sido relatada de vários países inclusive no Brasil.^{5,6}

Entre os genes de MBL, o gene *blaSPM*, *blaIMP* tem se mostrado bastante relevante os quais tem sido relatado em isolados *P. aeruginosa* de regiões como nordeste, centro-oeste, sudeste e estados do sul do Brasil.^{6,7,8,9}

O gene *blaNDM-1* foi isolado em *P. aeruginosa* na Europa^{10,11} e na Índia¹². Sendo que o primeiro caso de NDM-1 no Brasil foi relatado em um *Providencia rettgeri* isolado na cidade de Porto Alegre, em 2013.¹³

Devido o problema das infecções por *P. aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases, a proposta deste estudo foi identificar a presença dos genes que codificam as enzimas de MBL *blaNDM*, *blaSPM* e *blaIMP* em *P. aeruginosa* resistentes a carbapenens.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo-analítico transversal, retrospectivo onde foram analisadas 54 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de diferentes sítios

anatômicos de indivíduos atendidos pelo Hospital Escola do Vale do Rio Pardo-RS, no período de março de 2014 à fevereiro de 2015. O protocolo de investigação (nº 990.301) foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) atendendo à resolução 466/12.

A identificação das amostras e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo laboratório do hospital participante do estudo, segundo protocolos da ANVISA^{14,15} para identificação bioquímica das bactérias e os testes de sensibilidade pelo método de ágar difusão em disco conforme as instruções do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*¹⁶. A partir da verificação da pureza das culturas foram realizados testes complementares à identificação, sendo executados os seguintes testes: observação das características morfo-tintoriais após coloração pelo método de gram, teste da oxidase e observação da produção de pigmentos e odor. No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, de 54 cepas, 16 foram resistentes a imipenem e ou meropenem.

Após, as amostras foram preservadas por congelamento a -20°C em meio *Skim milk* até a realização dos testes fenotípicos e genotípicos.

Detecção fenotípica de metalo-beta-lactamases

As amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenens foram submetidas à triagem fenotípica da produção de MBL.¹⁵ Para a realização deste teste foram preparados inóculos bacterianos por suspensão direta em soro fisiológico (NaCl a 0,9%) a partir de colônias isoladas com 24 horas de crescimento. A turvação da suspensão foi ajustada a escala 0,5 de McFarland. Os inóculos bacterianos foram semeados em placas de ágar Mueller-Hinton.

A detecção fenotípica foi realizada pelo teste de aproximação de discos segundo o protocolo proposto pela nota técnica da ANVISA Nº 01/2013¹⁵ utilizando discos de ertapenem, imipinem e meropenem como substratos e como inibidor, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1M. Como controle do teste fenotípico para MBL foi utilizado cepas de *P. aeruginosa* positiva (IMP-1, NDM-1 e SPM-1).

Isolados com diâmetro de halo de inibição ≤ 22 mm para imipenem e/ou meropenem, e isolados com diâmetro do halo de inibição ≤ 24 mm, para ertapenem foram testados, de modo suplementar, com discos de meropenem e imipenem com e sem adição de EDTA. Sendo que os isolados que apresentaram diferença de diâmetro

≥ 5 mm para o carbapenêmico (imipenem ou meropenem) com EDTA em relação ao carbapenêmico sem EDTA são considerados potenciais produtores de MBL (IMP, VIM, NDM).

Detecção genotípica de MBL

As cepas submetidas ao teste fenotípico de determinação presuntiva da produção de MBL foram investigadas quanto à presença dos genes *blaSPM*, *blaIMP* e *blaNDM-1* que codificam as MBLs utilizando a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo que previamente foi realizada a extração do DNA através do método modificado de Marmur et al.(1961)¹⁷. As reações de amplificação foram preparadas num volume total de 25 μ L por tubo de eppendorf, compreendendo: 2,5 μ L de tampão de enzima da PCR-10X isento de $MgCl_2$ 50 mM; 2,0 μ L de $MgCl_2$ 10 mM; 4,0 μ L de solução de desoxiribonucleotídeos a 2,5 mM; 0,25 μ L de cada *primer* na concentração 50 pmol; 1 U/ μ l de Taq DNA Polimerase (Fundamenta®), e 3,0, 2,0 e 3,0 μ L do DNA genômico 25 μ g/mL de cada cepa para os genes *blaIMP*, *blaSPM* e *blaNDM*, respectivamente, completando-se o volume com água milliQ esterilizada. Para a amplificação dos genes foram utilizados os *primers* descritos por Queenan, Bush e Farzana et al¹⁸.

Os parâmetros utilizados na PCR para amplificar o gene *blaIMP* serão: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação com a seguinte programação: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento à 59°C por 1 minuto e extensão a 53°C por 1 minuto, além de uma extensão final de 72°C por 5 min. Para os genes *blaSPM* e *blaNDM* serão utilizados os mesmos parâmetros anteriormente citados, apenas diferindo na temperatura de anelamento a qual foi de 56°C e 63° C, respectivamente. Os produtos de PCR foram carregados em um gel de agarose 1,0%, corado com 5 μ L brometo de etídio, eletroforese e visualizados sob luz ultravioleta.

O controle de qualidade do teste genotípico para MBL foi utilizado de cepas de *P. aeruginosa* positiva (IMP-1, NDM-1 e SPM-1). Para o controle negativo será utilizada uma reação de amplificação de 25 μ L (Mix).

O controle de qualidade do teste genotípico para MBL foi realizado por meio da utilização de cepas de *P. aeruginosa* positiva (IMP-1, NDM-1 e SPM-1). Para o controle negativo será utilizada uma reação de amplificação de 25 μ L (Mix).

RESULTADOS

No período estudado foram isoladas 54 cepas *P. aeruginosa* e 16 resistentes a carbapenems, isoladas de pacientes atendidos pelo hospital escola.

Os setores clínicos com maior incidência de infecção por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenems foram a UTI (62,5%) e ala de internação da clínica cirúrgica (25%) (Tabela 1). Em relação aos espécimes clínicos, o maior percentual de isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenems foi identificado no trato respiratório inferior (62,5%) (Tabela 1).

Oito (50%) cepas de *P. aeruginosa* apresentaram teste fenotípico positivo, uma (6,25%) cepa identificou-se a presença do gene *blaSPM* e 7 (44%) não apresentaram o teste fenotípico e/ ou teste genotípico positivo para detecção dos genes *blaSPM*, *blaIMP* e *blaNDM-1* (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação do teste fenotípico de aproximação de discos com EDTA 0,1M e do teste genotípico para identificação dos Genes *blaSPM*, *blaIMP* e *blaNDM-1* de isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Isolados Clínicos	Setor clínico	Sítio de isolamento	Teste Fenotípico com EDTA 0,1M	Genes <i>blaSPM</i> , <i>blaIMP</i> e <i>blaNDM-1</i>
A	UTI	TRI	P	-
B	UTI	TRI	P	-
C	Clínica Cirúrgica	SFO	N	-
D	Clínica Cirúrgica	Urina	N	-
E	UTI	TRI	P	-
F	UTI	TRI	N	-
G	UTI	TRI	P	-
H	UTI	Urina	P	-
I	UCI	PC	N	-
J	Clínica Cirúrgica	PC	P	-
K	UTI	TRI	P	-
L	Ambulatório	PC	N	-
M	UTI	TRI	P	-
N	UTI	TRI	N	<i>blaSPM-1</i>
O	UTI	TRI	N	-
P	Clínica Cirúrgica	TRI	N	-

Legenda: UTI: Unidade de terapia intensiva; UCI: Unidade de cuidados intensivos; TRI.: Trato respiratório inferior; SFO: Secreção de ferida operatória; PC: Ponta de cateter; P: positivo; N: negativo.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que o setor clínico com maior prevalência de isolamento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenens é a unidade de terapia intensiva e que a maior parte dos espécimes clínicos é proveniente do trato respiratório. As *P. aeruginosa* são importantes causas de infecções hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), e os carbapenens são a terapia de primeira linha para pneumonia associada a ventilação e outras infecções proeminentes causadas por este patógeno^{3,19,20}

A resistência da *P. aeruginosa* à carbapenens tem representado uma significativa preocupação, particularmente à limitação das opções de tratamento por este patógeno. O surgimento de isolados multidrogas resistente (MDR), principalmente devido à produção de MβLs, tem sido associado a altas taxas de mortalidade entre os pacientes infectados. No RS¹⁹ e em SP²⁰, 51% e 86% das infecções por cepas de *P. aeruginosa* MβL-positivas, evoluíram para a morte, respectivamente. A monitorização de isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* é necessário, já que os dados sugerem que o controle do espalhamento dos isolados positivos para MβL pode reduzir substancialmente o número de mortes pós-infecção.^{19,20,21}

Neste estudo, 16 cepas de *P. aeruginosa* foram resistentes a carbapenens, e foi pesquisado o teste fenotípico e genotípico para identificação dos genes *blaSPM*, *blaIMP* e *blaNDM-1*. Oito (50%) das cepas de *P. aeruginosa* apresentaram teste fenotípico positivo para MBL, no teste combinado com adição de EDTA, e não houve identificação dos genes *blaSPM*, *blaIMP* e *blaNDM-1*. Isto poderia ser explicado por não ter sido pesquisado todos os genes de MBLs no estudo. O gene *blaIMP* e *blaVIM* são achados comum em *P. aeruginosa*, e são comumente localizados em integrons, que também podem conter genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos, como os aminoglicosídeos e quinolonas²¹.

Em 8 cepas de *P. aeruginosa*, o teste fenotípico foi negativo, e identificou-se o gene codificador *blaSPM* em uma destas amostras. Existem varios testes fenotípicos para a detecção de MBL, como por exemplo o E-teste de MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden), testes de discos combinados (CD), Teste de sinergia de disco duplo (DDST) e recentemente o teste CarbaNP modificado.²² Até agora, não há um método fenotípico padronizado, mas o teste mais aceito atualmente é o E-teste de MBL, contudo, este método tem custos elevados. Tanto CD como DDST têm sido confiável no rastreio da produção de MBL em *P. aeruginosa* em laboratórios clínicos de rotina.²²

Esta técnica de CD utilizada no estudo podem apresentar variação quando preparado o meio e o EDTA 0,1M manualmente, e ainda pode sofrer interferência na interpretação dos resultados, que depende da especialidade do técnico para discriminar a verdadeira sinergia na interseção de zonas de inibição.^{7,15,22}

Das 16 cepas resistentes a carbapenems, uma delas apresentou o gene *blaSPM*. Cepas de *P. aeruginosa* apresentando o gene *blaSPM* são comumente encontradas no Brasil^{5,6,19,24,25}. Costa *et al.* (2015)⁵ em isolados de 48 cepas de *P. aeruginosa* de um hospital de Sergipe, 12,2% foram positivas para a produção de metalo- β -lactamase e dois (4,1%) dos isolados apresentaram o gene *blaSPM-1*. Pesquisa realizada em Porto Alegre²⁴ das quatro cepas de *P. aeruginosa* analisadas, duas foram positivas para MBL, apresentando o gene *blaSPM-1*. Zavascki *et al* (2005)¹⁹ descreveram um surto de *P. aeruginosa* multirresistente em um hospital escola no Rio Grande do Sul, onde 21 dos 135 isolados analisados possuíam o gene *blaSPM*. Em relação à ocorrência dos genes *blaIMP* e *blaSPM*, 67% dos isolados apresentaram o gene *blaSPM-1* no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, e 8,3% o gene *blaIMP-1*.²⁵ No Hospital São Lucas, identificaram 82% de isolados com o gene *blaSPM-1* e, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os genes *blaSPM-1* e *blaIMP-1* foram encontrados em 35,7% e 21,4% das amostras, respectivamente²⁵. O gene *blaSPM-1* está associado ao amplo uso de antibióticos e à aquisição de resistência a múltiplas drogas, principalmente a administração de quinolonas.⁶

Outros mecanismos de resistência, tais como à ausência da proteína da membrana externa OprD, sobre expressão da bomba de efluxo MexAB-OprM (como no caso da resistência meropenem), aumento da expressão da AMP-C cromossomal^{3,4,5,6} podem ter ocorrido nas 7 (44%) cepas de *P. aeruginosa* que não apresentaram o teste fenotípico e/ ou teste genotípico positivo para detecção dos genes *blaSPM*, *blaIMP* e *blaNDM-1*.

Esse acúmulo de determinantes de resistência impõe uma limitação imensa sobre o tratamento de tais infecções, restando apenas a polimixina B ou colistina como opções terapêuticas efetivas^(19,20). Como o meropenem e o imipenem são os β -lactâmicos mais ativos e potentes contra bactérias Gram-negativas, além de serem atualmente os únicos carbapenêms comercialmente disponíveis no Brasil, este perfil de resistência representa um desafio para qualquer tratamento.²⁰

O surgimento de diferentes mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* é um importante problema de saúde pública, particularmente devido à expressão de MBLs

por isolados nosocomiais, codificados por genes frequentemente conectados a elementos móveis, o que facilita sua disseminação.^{5,6,19,20,21} Aqui relatamos a identificação de metaloenzimas pelos testes fenotípicos e a identificação de um gene que codifica as metaloenzimas SPM-1 em cepas resistentes a carbapenêmios.

Embora nos testes fenotípicos positivos não identificados a presença dos genes das metaloenzimas *bla*SPM, *bla*IMP e *bla*NDM-1, esta técnica de aproximação de discos, segundo o protocolo proposto pela nota técnica da ANVISA N° 01/2013, é um teste simples, que pode ser convenientemente usado para propor a resistência a carbapenênicos.²¹ No entanto, a identificação molecular de cepas com genes codificadores de MBL torna-se uma ferramenta importante para a monitorização da eficácia dos agentes antimicrobianos e na orientação de escolhas terapêuticas, que darão suporte a melhores tratamentos reduzindo a morbidade e mortalidade contra as infecções por *P. aeruginosa* produtora de metaloenzimas.

Conflitos de interesse: os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- 1 Oliveira AC, Paula AO, Iquiapaza RA, de Souza Lacerda AC. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. *Revista Gaúcha de Enfermagem*. 2012 Sep;33(3):89-96. <http://seer.ufrgs.br/index.php/RevistaGauchadeEnfermagem/article/view/25068/21950>
- 2 Lucena A, Dalla Costa LM, da Silva Nogueira K, Matos AP, Gales AC, Raboni SM. Comparison of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. 2014 Dec 31;32(10):625-30. doi: 10.1016/j.eimc.2014.03.015.
- 3 Cavalcanti FLS, Almeida ACS, Vilela MA, Morais MMC, Junior MAM. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 3, p. 420-423, 2012. Doi: 10.1590/S0074-02762012000300019
- 4 Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and inhibition profiles of β -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Jan 1;54(1):565-9. doi: 10.1128/AAC.01004-09
- 5 Costa LM, Fleming ME, Paula GR, Teixeira LA, Mondino PJ, Mondino SS, Mendonça-Souza CR. Production of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the State of Sergipe, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015 Apr;48(2):212-5. doi: 10.1590/0037-8682-0198-2014.
- 6 Araujo BF, Ferreira ML, de Campos PA, Royer S, da Fonseca Batistão DW, Dantas RC, Gonçalves IR, Faria AL, de Brito CS, Yokosawa J, Gontijo-Filho PP. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying aac (6')-Ib-cr, qnrS1 and bla SPM Genes in Brazil. *PloS one*. 2016 May 24;11(5):e0155914. doi: 10.1371/journal.pone.0155914. eCollection 2016.
- 7 Picão RC, Carrara-Marroni FE, Gales AC, Venâncio EJ, Xavier DE, Tognim MC, Pelayo JS. Metallo- β -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012 Sep;107(6):747-51. doi.org/10.1590/S0074-02762012000600007
- 8 Carvalho RM, Marques SG, Goncalves LH, Abreu AG, Monteiro SG, Goncalves AG. Phenotypic detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013 Aug;46(4):506-9. doi: 10.1590/0037-8682-1451-2013.
- 9 Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2012 Dec;45(6):707-12. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000600010>

10 Janvier F, Jeannot K, Tessé S, Nicoud MR, Delacour H, Rapp C. et al. Molecular characterization of bla_{NDM-1} in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 57, n. 7, p. 3408-3411, 2013. doi: 10.1128/AAC.02334-12.

11 Carattoli A, Fortini D, Galetti R, Garcia-Fernandez A, Nardi G, Orazi D, Capone A, Majolino I, Proia A, Mariani B, Parisi G. Isolation of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type ST235 from a stem cell transplant patient in Italy, May 2013. *Euro Surveill.* 2013 Nov 14;18(46):20633. <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N46/art20633.pdf>

12 Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Emergence of NDM-1 in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. *J Clin Diagn Res.* 2013 Jul;7(7):1328-31.

13 Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2013 Dec 1;68(12):2956-7. doi: 10.7860/JCDR/2013/5509.3137.

14 Brasil, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Serviço de Saúde. Detecção e identificação de bactérias de importância médica - módulo V, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf>

15 Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Nota Técnica Nº 01/2013. Medidas De Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes. Brasília, 17 de abril de 2013.

16 Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th Edition. Centers for Disease Control and Prevention. 2015

17 Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology.* 1961 Apr 30;3(2):208-IN1.

18 Farzana R, Shamsuzzaman SM, Mamun KZ. Isolation and molecular characterization of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 producing superbug in Bangladesh. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 2013 Mar 14;7(03):161-8. doi: 10.3855/jidc.2493

19 Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005 Dec 1;56(6):1148-51. doi: 10.1093/jac/dki390

20 Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, et al. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and

clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:388-90. doi: 10.1128/AAC.50.1.388-390.2006

21 Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(2):276-92. Doi:10.3109/1040841X.2014.940494.

22. Sioud O, Nasri M, Aouni M, Mastouri M. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* using a modified IMP-lysate assay. *African Journal of Biotechnology.* 2016 Feb 24;15(8):278-83. Doi: 10.5897/AJB2015.14822

23 Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmström A, Qwörnström A, Karlsson Å, Chong Y. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology.* 2005 Feb 1;43(2):942-4. doi:10.1128/JCM.43.2.942-944.2005

24 Laranjeira VS, Marchetti DP, Steyer JR, Corção G, Picoli SU. Pesquisa de *Acinetobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo-β-lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Jul;43:462-4. doi: 10.1590/S0037-86822010000400026

25 Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL. Occurrence of blaSPM-1 and blaIMP-1 genes of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007 Mar;38(1):108-9. doi: 10.1590/S1517-83822007000100022

AHEAD