



## Artigo/Article

# Caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase isoladas em hemoculturas de crianças e adolescentes com câncer

Molecular characterization of carbapenem-resistant and metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood cultures from children and teenagers with cancer

Thais Ávila Fernandes<sup>1</sup>, Carlos Alberto Pires Pereira<sup>2</sup>, Antonio Sergio Petrili<sup>2</sup> e Antônio Carlos Campos Pignatari<sup>1</sup>

### RESUMO

**Introdução:** O objetivo do estudo foi avaliar a prevalência e a disseminação de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases isoladas de hemoculturas (2000-2005) de pacientes do Instituto de Oncologia Pediátrica da UNIFESP (IOP-GRAACC). **Métodos e Resultados:** Cinquenta e seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas de 49 pacientes. Trinta e duas dessas amostras foram classificadas como resistentes aos carbapenêmicos pela técnica de disco difusão e submetidas a reação de PCR para detecção de genes de MBL. Dezoito dessas 32 amostras evidenciaram o gene *bla*<sub>SPM-1</sub>. Oito amostras selecionadas em diferentes anos no período de estudo apresentaram o mesmo perfil genético por *pulsed-field gel electrophoresis*. A terapêutica antimicrobiana foi considerada adequada em apenas 23,5% dos pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* carregando *bla*<sub>SPM-1</sub> e letalidade de 70,6% no período de até 30 dias após a bacteremia e uma inadequação inicial dos esquemas antibióticos utilizados. **Conclusões:** Evidenciamos a presença de um clone de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos carregando *bla*<sub>SPM-1</sub> que persistiu em amostras de hemocultura pelo período de 6 anos na instituição, com alta letalidade, justificando uma vigilância epidemiológica rigorosa e uma readequação dos esquemas de terapia antimicrobianos na instituição.

**Palavras-chaves:** *Pseudomonas aeruginosa*. Metallo- $\beta$ -lactamase. Câncer. Hemocultura. Infecção hospitalar.

### ABSTRACT

**Introduction:** The objective of this study was to evaluate the prevalence and dissemination of carbapenem-resistant and metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood-stream samples (2000-2005) that were collected from patients admitted to the Institute of Pediatric Oncology, UNIFESP (IOP-GRAACC). **Methods and Results:** Fifty-six *P. aeruginosa* samples were isolated from 49 patients. Thirty-two of these samples were classified as carbapenem-resistant using the disc diffusion method and were subjected to the PCR reaction in order to detect MBL genes. Eighteen of these 32 isolates showed the *bla*<sub>SPM-1</sub> gene. Eight samples selected in different years over the study period presented the same genetic profile according to *pulsed-field gel electrophoresis*. The antimicrobial therapy was considered adequate for only 23.5% of the patients with bacteremia due to *P. aeruginosa* carrying the *bla*<sub>SPM-1</sub> gene, and a high lethality rate of 70.6% was observed during the 30-day period after bacteremia and an inadequate initial antibiotic regimen. **Conclusions:** We detected the presence of a clone of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* carrying *bla*<sub>SPM-1</sub> that persisted in blood culture samples over a six-year period at the institution, with high lethality, thus justifying rigorous epidemiological surveillance and a rearrangement of the antimicrobial therapy regimens at the institution.

**Key-words:** *Pseudomonas aeruginosa*. Metallo- $\beta$ -lactamase. Cancer. Blood culture. Hospital infection.

1. Laboratório Especial em Microbiologia Clínica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP. 2. Instituto de Oncologia Pediátrica-Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.

**Endereço para correspondência:** Prof. Antonio Carlos Campos Pignatari. Disciplina de Infectologia UNIFESP/EPM. Rua Leandro Dupret 188. Vila Clementino, 04025-010 São Paulo, SP.

Tel: 55 11 5081-2965

e-mail: info@lemc.com.br

Recebido para publicação em 12/11/2009

Aceito em 11/01/2010

### INTRODUÇÃO

Infecções por bactérias Gram-negativas em ambiente hospitalar constituem grave problema de saúde pública, devido a sua frequência, morbidade, mortalidade e custo do tratamento. *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um importante patógeno em ambiente hospitalar, comumente isolada em infecções de corrente sanguínea (ICS) e com frequência apresentam multirresistência aos antimicrobianos, inclusive aos carbapenêmicos (R).

No período estudado, observou-se um aumento de pacientes com ICS causada por *P. aeruginosa* no Instituto de Oncologia Pediátrica - Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer (IOP-GRAACC), vinculado à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP), especializado no tratamento de crianças e adolescentes com câncer. Nesse período, os pacientes apresentaram hemoculturas positivas para *P. aeruginosa* com perfil de resistência característica de cepas produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase (MBL), na maioria resistentes a todos antimicrobianos com exceção da polimixina B. Posteriormente, foi confirmada a presença de MBL no Laboratório Especial em Microbiologia Clínica (LEMC) da EPM - UNIFESP com caracterização de uma nova enzima denominada SPM<sup>1</sup>.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a persistência desta cepa de *P. aeruginosa* carregando MBL de infecções de corrente sanguínea, sua disseminação através de tipagem molecular e as características clínicas e epidemiológicas.

### MÉTODOS

Foram estudadas, retrospectivamente, amostras de ICS em crianças e adolescentes com câncer, admitidos no IOP-GRAACC, vinculado ao Departamento de Pediatria da EPM - UNIFESP, entre novembro de 2000 e dezembro de 2005.

Os critérios de inclusão foram: presença de ICS e neutropenia; amostras isoladas somente de hemocultura; foram considerados óbitos até 30 dias após a bacteremia; os pacientes encontravam-se nos seguintes locais: unidade de terapia intensiva, ambulatório, enfermaria e setor de transplante de medula óssea. Os critérios abordados para definir a adequação do tratamento foram: adequado, inadequado e corrigido. O critério de exclusão foi: bacteremia do mesmo paciente em um intervalo inferior a um mês.

### Análise clínica e epidemiológica

A análise epidemiológica e a avaliação clínica foram realizadas a partir de dados obtidos dos prontuários. Para isso, foi utilizada uma Ficha de Dados Clínicos contendo idade, sexo, data de internação e de coleta da hemocultura; diagnóstico de doença de base; local da internação; neutropenia; evolução do paciente (se o paciente foi a óbito até 30 dias após a bacteremia, o óbito foi considerado, caso contrário foi classificado como alta); sexo; fonte da bacteremia e terapia antimicrobiana utilizada.

### Microbiologia

Durante o período de estudo, foram encaminhadas ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) 120 *P. aeruginosa* provenientes de hemocultura do IOP segundo protocolo de vigilância de hemoculturas pré-estabelecido sendo armazenadas em água destilada estéril a temperatura ambiente ou em TSB acrescido com 15% de glicerina a -20°C.

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados através da técnica de disco difusão. Os discos de antimicrobianos (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Inglaterra) utilizados foram: aztreonam, imipenem, meropenem e polimixina B. Para o controle de qualidade, foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) para *P. aeruginosa*<sup>2</sup>. A interpretação do halo da polimixina B foi baseada no estudo de Gales e cols<sup>3</sup>.

### Testes fenotípicos e genotípicos

As amostras de *P. aeruginosa* confirmadas como resistentes aos carbapenêmicos foram submetidas ao teste de triagem para avaliação fenotípica da produção de MBL de acordo com Picão cols<sup>4</sup>. O controle positivo utilizado foi a amostra controle produtora de SPM-1: *P. aeruginosa* P 1088. Como controle negativo foi utilizado a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

As amostras de *P. aeruginosa* detectadas fenotipicamente como produtoras de MBL foram investigadas quanto à presença dos genes *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-2</sub> que codificam as MBL utilizando-se a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR)<sup>1</sup>.

Foram selecionadas para tipagem molecular pela técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e confirmadas pela técnica de PCR como produtoras do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> para comparação. Após digestão do DNA cromossômico pela enzima *SpeI* foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). Foram incluídas 3 amostras controle isoladas entre novembro de 2000 e março de 2001. Os perfis moleculares pela técnica de PFGE foram analisados visualmente, seguindo o critério de Tenover e cols<sup>5</sup>.

Para análise da similaridade genética foi utilizado o sistema Bionumerics com construção de dendrograma considerando amostras pertencentes ao mesmo clone com até 4% de tolerância. Amostras

com similaridade genética abaixo de 90%, não são consideradas relacionadas.

### Ética

Este estudo foi previamente submetido à avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

## RESULTADOS

Das 120 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de hemoculturas e armazenadas no banco de microrganismos no LEMC, somente 56 amostras foram viáveis e utilizadas no estudo.

Entre as 56 amostras de *P. aeruginosa* analisadas, 24 (42,9%) eram sensíveis aos carbapenêmicos e 32 (57,1%) resistentes. Nas amostras resistentes aos carbapenêmicos pelo método de disco-difusão, foi realizado o teste fenotípico (disco aproximação) para detecção de MBL. Sensibilidade acima de 50% foi observada apenas para aztreonam (73,2%) e polimixina B (100%). Trinta e duas (57,1%) amostras foram resistentes aos carbapenêmicos. Dezoito (56,2%) amostras de *P. aeruginosa* foram classificadas como produtoras de MBL pelo teste de disco aproximação.

Dentre as 18 amostras de *P. aeruginosa*, inicialmente classificadas fenotipicamente como produtoras de MBL, a presença do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> foi confirmada em 18 (100%) isolados. Nenhuma amostra apresentou produto de amplificação de PCR para os outros genes de MBL estudados (*bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>). Dentre as 18 amostras produtoras do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, também, foi observada uma sensibilidade de 100% para aztreonam e polimixina B.

### Tipagem molecular

Para oito amostras produtoras de *bla*<sub>SPM-1</sub> isoladas em diferentes anos, foi realizada a técnica de tipagem molecular por (PFGE). No dendrograma (**Figura 1**) observamos que as oito amostras de *P. aeruginosa* *bla*<sub>SPM-1</sub> apresentaram uma similaridade genética acima de 98%. Três amostras sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de hemoculturas de pacientes do IOP no mesmo período do estudo (P4515, P5126 e P5279) não demonstraram similaridade genética (menor que 90%).

### Análise clínica e epidemiológica

Analisando-se as características clínicas dos 49 pacientes portadores das 56 amostras de *P. aeruginosa* observa-se que a maioria (44,9%) apresentava leucemia e o mesmo ocorre nos 17 pacientes das 18 amostras de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> (35,3% leucemias). A maioria (46,1%) estava internada em enfermaria. Já entre as cepas de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, a maioria (41,2%) dos pacientes, estava na enfermaria em seguida no TMO (35,3%). Quanto à fonte de bacteremia, foi primária em 55,8% e foi secundária em 44,2% no total das amostras analisadas. Das 18 amostras de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, 82,3% dos pacientes estavam neutropênicos. Quanto à fonte da bacteremia, foi primária em 53% e secundária em 47% (**Tabela 1**).

O tratamento foi adequado em 46,1%, inadequado em 17,3% e corrigido em 34,6% dos episódios de bacteremia. Nos 17 pacientes, dos quais foram isoladas as 18 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM, o tratamento foi adequado em 23,5%, foi inadequado em 23,5% e corrigido em 53%. Quanto à evolução clínica, 70,6% dos 17 pacientes com *P. aeruginosa* produtora da MBL (gene *bla*<sub>SPM-1</sub>) evoluíram a óbito (**Tabela 1**).

**TABELA 1 - Características clínicas e epidemiologia dos 49 pacientes com isolamento de *P. aeruginosa* em hemoculturas.**

| Variável                   | Total das amostras estudadas (%) | Amostras resistentes aos carbapenêmicos não produtoras de MBL (%) | Amostras resistentes aos carbapenêmicos produtoras de MBL (%) |
|----------------------------|----------------------------------|---|---|
| <b>Gênero</b>              |                                  |   |   |
| feminino                   | 44,9                             | 42,9  | 58,8  |
| masculino                  | 55,1                             | 57,1  | 41,2  |
| <b>Doença de Base</b>      |                                  |   |   |
| leucemias                  | 44,9                             | 57,1  | 35,3  |
| linfomas                   | 10,2                             | 14,3  | 11,7  |
| Tu SNC                     | 10,2                             | 7,2   | 5,9   |
| TMO                        | 12,2                             | --  | 35,3  |
| outros                     | 30,6                             | 21,4  | 11,8  |
| <b>Local</b>               |                                  |   |   |
| UTI                        | 19,2                             | 21,4  | 17,6  |
| enfermaria                 | 46,1                             | 57,1  | 41,2  |
| ambulatório                | 21,1                             | 21,4  | 5,9   |
| TMO                        | 15,4                             | --  | 35,3  |
| <b>Neutropenia</b>         |                                  |   |   |
| não                        | 25,0                             | 14,3  | 17,7  |
| sim                        | 75,0                             | 85,7  | 82,3  |
| <b>Fonte da bacteremia</b> |                                  |   |   |
| primária                   | 55,8                             | 35,7  | 53,0  |
| secundária                 | 44,2                             | 64,3  | 47,0  |
| <b>Tratamento</b>          |                                  |   |   |
| adequado                   | 46,1                             | 35,7  | 23,5  |
| inadequado                 | 17,3                             | 28,6  | 23,5  |
| corrigido                  | 34,6                             | 35,7  | 53,0  |
| <b>Evolução</b>            |                                  |   |   |
| alta                       | 53,8                             | 42,9  | 29,4  |
| óbito                      | 46,2                             | 57,1  | 70,6  |

Tu SNC: tumor no sistema nervoso central, TMO: transplante de medula óssea, UTI: unidade de terapia intensiva.

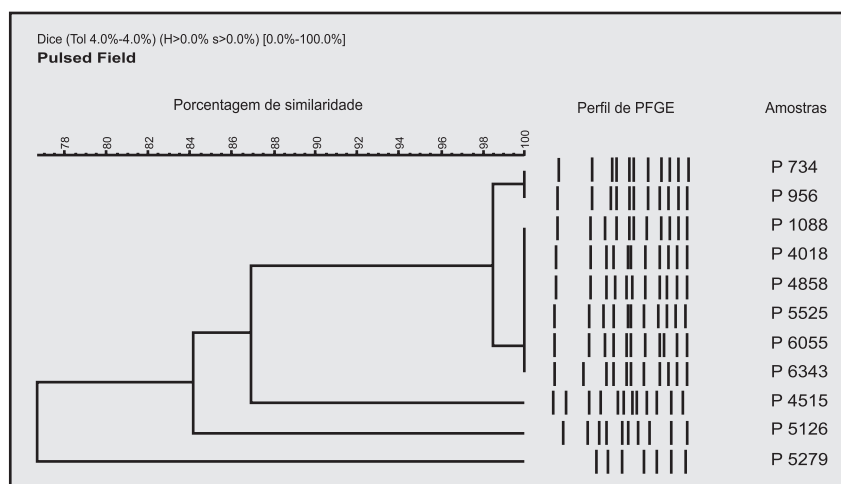


FIGURA 1 - Amostras analisadas: P734, P956, P1088, P4018, P4858, P5525, P6055, P6343, P4515, P5126, P5279.

## DISCUSSÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é o principal agente etiológico entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose e o quarto agente etiológico mais isolado em ICS. Infecção causada por esses microrganismos permanece como principal causa de óbito em pacientes oncológicos<sup>6,7</sup>.

As MBL adquiridas são codificadas por genes cassetes localizados tanto no cromossomo quanto no plasmídeo bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1<sup>1,8</sup>, as demais MBLs adquiridas (IMP-1, VIM-1, VIM-2, SPM-1) são codificadas por genes localizados em integrons favorecendo a sua disseminação clonal<sup>9-12</sup>.

A prevalência de MBL entre as 32 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de hemoculturas, avaliadas no presente estudo, foi de 59%, todas produtoras de bla<sub>SPM-1</sub>.

Estudo realizado por Balan<sup>13</sup>, com 120 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de diferentes sítios corpóreos isoladas no Hospital São Paulo, e no GRAACC, em 2004 (4 amostras), a prevalência de MBL foi de 38,1%, sendo 20% de bla<sub>IMP-1</sub> e 80% de bla<sub>SPM-1</sub>. Em nosso estudo, não detectamos a presença de bla<sub>IMP-1</sub>.

O primeiro relato de SPM-1 foi feito por Toleman e cols em 2002<sup>1</sup> em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* isolada no IOP-GRAACC, em fevereiro de 2001. Esta amostra (P1088) faz parte deste estudo, e foi posteriormente encontrada em diferentes regiões brasileiras<sup>1,14</sup>.

Durante o estudo, observamos que a primeira amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 foi isolada em novembro de 2000 (amostra P700), portanto, anterior ao relatado de Toleman e cols<sup>1</sup> demonstrando que a *P. aeruginosa* carregando bla<sub>SPM-1</sub> já estava presente na Instituição há pelo menos 1 ano.

Por PFGE observamos em 8 amostras que continham o gene bla<sub>SPM-1</sub>, o mesmo perfil caracterizando um clone<sup>5</sup>. Essas amostras foram isoladas em diferentes anos, demonstrando que esse clone permanece nesse hospital e é o mesmo que o encontrado em diferentes regiões brasileiras<sup>14</sup>.

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode estar associada a outros mecanismos além da produção de MBL. Marra<sup>15</sup> observou que 81,1% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de ICS resistentes aos carbapenêmicos possuíam MBL. Já Balan<sup>13</sup>, em 2007, observou que 62,5% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes sítios eram resistentes aos carbapenêmicos e não produziam MBL. A diminuição da permeabilidade de membrana externa (porinas) e/ou a hiperexpressão de bombas de efluxo, podem ser os prováveis mecanismos responsáveis por esse fenotipo de resistência.

A neutropenia está intimamente ligada ao processo e ao seu tratamento, sendo o principal fator de risco para complicações infecciosas nesses pacientes. Para diminuir a morbimortalidade relacionada ao processo infeccioso é muito importante a administração imediata de antibioticoterapia empírica de amplo espectro. No presente estudo, 75% dos 49 pacientes estudados e 83,3% dos 17 pacientes com infecção por *P. aeruginosa* produtora de MBL (SPM-1) estavam neutropênicos. Entretanto, a terapêutica foi adequada em apenas 46,1%. Quando consideramos apenas pacientes com amostras produtoras de MBL a adequação foi ainda menor (27,7%). Considerando a elevada prevalência de MBL particularmente bla<sub>SPM-1</sub> nas amostras isoladas dos pacientes do IOP e uma elevada taxa de mortalidade, a terapêutica empírica em episódios de bacteremia nessa população de pacientes poderia incluir as polimixinas pelo menos nos pacientes de elevado risco infeccioso (leucemias, TMO e/ou com períodos de neutropenia e internação prolongados).

Para essa população de pacientes de alto risco o tempo entre coleta e identificação é muito elevado, associando-se a inadequação da terapêutica e contribuindo para uma maior mortalidade. A detecção precoce de metalo enzimas por métodos moleculares poderá contribuir para um resultado mais rápido utilizando PCR multiplex em tempo real com primers para as enzimas IMPs, VIMs, SPM-1, GIM-1 e SIM-1. Os resultados podem ser obtidos em 2 horas após o isolamento de *P. aeruginosa*<sup>16</sup>.

Marra e cols<sup>17</sup> encontraram taxas de mortalidade e morbidade entre pacientes com infecções da corrente sanguínea por *P. aeruginosa* produtoras de MBL do Hospital São Paulo superior a 85,7%. Em

nosso estudo, apesar de ter sido realizado apenas com pacientes do IOP-GRAACC, foi observado uma taxa de mortalidade de 42,6% sendo 70,6% nos pacientes com amostras produtoras de bla<sub>SPM-1</sub>.

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* são limitadas e incluem penicilinas com atividade antipseudomonas, cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmico, carbapenêmicos, e fluoroquinolonas, particularmente a ciprofloxacina<sup>18</sup>. Para amostras multirresistentes, incluindo aos carbapenêmicos, a única opção terapêutica disponível tem sido as polimixinas (colistina e polimixina B). Apesar de raros já existem relatos de amostras também resistentes a esses antimicrobianos<sup>19</sup>. Nas amostras testadas, no presente estudo, pelo método de disco difusão, todas (100%) foram sensíveis a polimixina B; entretanto, o CSLI<sup>2</sup> padronizou o teste sensibilidade a polimixinas apenas para diluição em ágar. Apesar da sensibilidade ao aztreonam nas amostras produtoras de bla<sub>SPM-1</sub>, não utilizamos esse antimicrobiano na terapêutica dessas infecções, mas sim como marcador de possível presença de MBL, já que não é hidrolisado por essas enzimas.

Em conclusão, evidenciamos a presença de um clone de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos carregando o gene bla<sub>SPM-1</sub> que persistiu no período entre novembro/2000 a dezembro/2005 em ICS de pacientes do IOP-GRAACC. Não detectamos a presença de outras metalo enzimas bla<sub>IMP-1</sub>, bla<sub>VIM-1</sub>, bla<sub>VIM-2</sub> nas amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos. A terapêutica antimicrobiana foi adequada em apenas 27,7% dos pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* carregando o gene bla<sub>SPM-1</sub>. Observamos uma maior letalidade, nos pacientes com infecção causada por *P. aeruginosa* carregando o gene bla<sub>SPM-1</sub> em relação as demais pacientes.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:673-679.
2. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement Approved Standard M100-S15 Wayne; 2007;
3. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Inf Dis* 2001; 32(suppl 2):146-155.
4. Picão RC. Avaliação comparativa de diferentes testes fenotípicos para a detecção de amostras produtoras de Metalo- $\beta$ -lactamases. [tese de mestrado]. [São Paulo (SP)]: Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo; 2007.
5. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.
6. Levine AS, Schimpff SC, Graw Jr RG, Young RC. Hematologic malignancies and other marrow failure states: Progress in the management of complicating infections. *Sem Hematol* 1974; 11:141-202.



7. Bodey GP. Infection in cancer patients: A continuing association. *Am J Med* 1986; 81:11-26.
8. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1406-1409.
9. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:116-119.
10. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, bla<sub>IMP-13</sub>, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:583-590.
11. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, bla<sub>IMP-16'</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4693-702.
12. Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kaminska W, Dzierzanowska D, Bennett PM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:451-456.
13. Balan APRT. Epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de Metallo-β-lactamases isoladas de pacientes do Hospital São Paulo em 2004 [tese de mestrado]. [São Paulo (SP)]: Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; 2007.
14. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52:699-702.
15. Marra AR. Impacto clínico das infecções da corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-β-lactamases [tese de doutorado]. [São Paulo (SP)]: Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo; 2004.
16. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid Detection and Identification of Metallo-beta-Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45:544-547.
17. Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, Souza JMA, et al. Bloodstream Infections with Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology, Microbiology, and Clinical Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:388-390.
18. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1379-1382.
19. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Inf* 2006; 12:315-21.