



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

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

Thais Ávila Fernandes¹, Carlos Alberto Pires Pereira², Antonio Sergio Petrili² e Antônio Carlos Campos Pignatari¹

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- β -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*_{SPM-1}. 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*_{SPM-1} 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*_{SPM-1} 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- β -lactamase. Câncer. Hemocultura. Infecção hospitalar.

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study was to evaluate the prevalence and dissemination of carbapenem-resistant and metallo- β -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*_{SPM-1} 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*_{SPM-1} 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*_{SPM-1} 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- β -lactamase. Cancer. Blood culture. Hospital infection.

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- β -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 SPM¹.

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.

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

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[®], 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*². A interpretação do halo da polimixina B foi baseada no estudo de Gales e cols³.

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 cols⁴. 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*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} que codificam as MBL utilizando-se a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR)¹.

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*_{SPM-1} 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 cols⁵.

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*_{SPM-1} foi confirmada em 18 (100%) isolados. Nenhuma amostra apresentou produto de amplificação de PCR para os outros genes de MBL estudados (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}). Dentre as 18 amostras produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, também, foi observada uma sensibilidade de 100% para aztreonam e polimixina B.

Tipagem molecular

Para oito amostras produtoras de *bla*_{SPM-1} 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*_{SPM-1} 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*_{SPM-1} (35,3% leucemias). A maioria (46,1%) estava internada em enfermaria. Já entre as cepas de *P. aeruginosa* produtoras do gene *bla*_{SPM-1}, 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*_{SPM-1}, 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*_{SPM-1}) 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 (%)
Gênero			
feminino	44,9	42,9	58,8
masculino	55,1	57,1	41,2
Doença de Base			
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
Local			
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
Neutropenia			
não	25,0	14,3	17,7
sim	75,0	85,7	82,3
Fonte da bacteremia			
primária	55,8	35,7	53,0
secundária	44,2	64,3	47,0
Tratamento			
adequado	46,1	35,7	23,5
inadequado	17,3	28,6	23,5
corrigido	34,6	35,7	53,0
Evolução			
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.

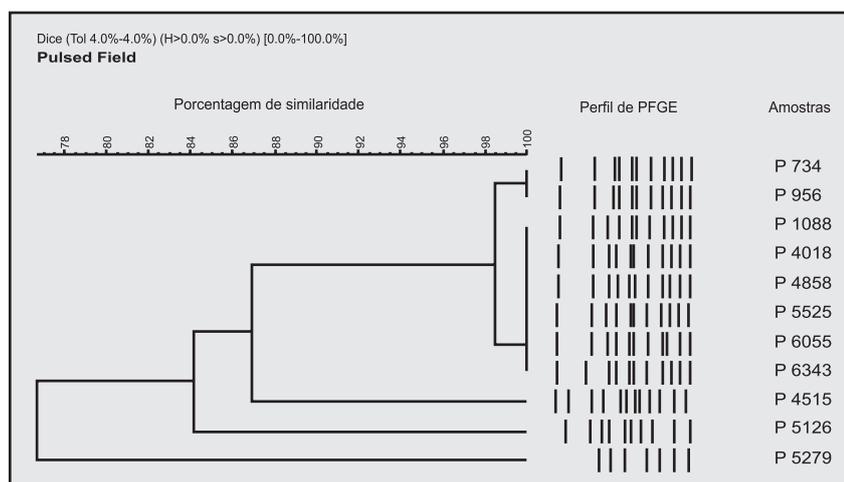


FIGURA 1 - Amostras analisadas: P734, P956, P1088, P4018, P4858, P5525, P6055, P6343, P4515, P5126, P5279.

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^{6,7}.

As MBL adquiridas são codificadas por genes cassetes localizados tanto no cromossomo quanto no plasmídeo bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1^{1,8}, as demais MBLs adquiridas (IMP-1, VIM-1, VIM-2, SPM-1) são codificadas por genes localizados em integrons favorecendo a sua disseminação clonal⁹⁻¹².

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*_{SPM-1}.

Estudo realizado por Balan¹³, 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_{IMP-1} e 80% de bla_{SPM-1}. Em nosso estudo, não detectamos a presença de bla_{IMP-1}.

O primeiro relato de SPM-1 foi feito por Toleman e cols em 2002¹ 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^{1,14}.

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 cols¹ demonstrando que a *P. aeruginosa* carregando bla_{SPM-1} já estava presente na Instituição há pelo menos 1 ano.

Por PFGE observamos em 8 amostras que continham o gene bla_{SPM-1}, o mesmo perfil caracterizando um clone⁵. Essas amostras foram isoladas em diferentes anos, demonstrando que esse clone permanece nesse hospital e é o mesmo que o encontrado em diferentes regiões brasileiras¹⁴.

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode estar associada a outros mecanismos além da produção de MBL. Marra¹⁵ observou que 81,1% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de ICS resistentes aos carbapenêmicos possuíam MBL. Já Balan¹³, 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_{SPM-1} 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*¹⁶.

Marra e cols¹⁷ 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_{SPM-1}.

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 ciprofloxacina¹⁸. 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 antimicrobianos¹⁹. Nas amostras testadas, no presente estudo, pelo método de disco difusão, todas (100%) foram sensíveis a polimixina B; entretanto, o CSLI² padronizou o teste sensibilidade a polimixinas apenas para diluição em ágar. Apesar da sensibilidade ao aztreonam nas amostras produtoras de bla_{SPM-1}, 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_{SPM-1} 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_{IMP-1}, bla_{VIM-1}, bla_{VIM-2} 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_{SPM-1}. Observamos uma maior letalidade, nos pacientes com infecção causada por *P. aeruginosa* carregando o gene bla_{SPM-1} 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- β -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_{IMP-13}, 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_{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* 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.