ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Emergência da resistência aos carbapenemos

/ **Filipa Grosso* e Aida Duarte**
Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Lisboa

* Autor correspondente:
Filipa Grosso, Laboratório de Microbiologia
Faculdade de Farmácia
Av. Forças Armadas
1649-019 Lisboa
Tel.:351 21 7946440 / Fax: 351 21 7934212
E-mail: filipagrosso@portugalmail.com

/ Resumo

Esta revisão de conjunto, após uma breve introdução da resistência aos antibióticos em geral, realça a emergência da resistência aos carbapenemos. Numa primeira abordagem refere a farmacologia e uso clinico dos carbapenemos. Relativamente à resistência a estes antibióticos descreve os principais microrganismos onde já foram encontradas as resistências, assim como os principais mecanismos responsáveis pela resistência aos carbapenemos. A detecção laboratorial de estirpes resistentes e os processos que as bactérias utilizam para disseminar a resistência são aspectos fundamentais e importantes para encontrar os mecanismos de controlo e combate à infecção, nomeadamente no controlo da prescrição de antibióticos, no isolamento de doentes e nos procedimentos de higiene e limpeza de modo a minimizar a disseminação da resistência aos carbapenemos.

/ Summary

This review, after a brief introduction to the problematic of antibiotics resistance, focuses the emergence of resistance to carbapenems. Initially refers to the pharmacology and clinical use of this group of antibiotics. About the resistance to carbapenems describes the most important resistant microorganisms, and the principal mechanisms of resistance.

The laboratorial detection of resistant strains and the mechanisms of dissemination of resistance are important aspects to find a way of control the infection, namely the control of antibiotic prescription, the isolation of patients and cleaning procedures.

Com o advento da quimioterapia e da antibioterapia o mundo conheceu uma melhoria significativa no tratamento das infecções. Contudo não foram necessários muitos anos para o aparecimento das primeiras espécies bacterianas resistentes à penicilina.

Actualmente a resistência aos antibióticos constitui um grave problema de saúde pública à escala mundial, sendo imperativo a preservação da sua eficácia dado que são indispensáveis no combate às doenças infecciosas.

Apesar dos carbapenemos serem um grupo de antibióticos restrito ao uso hospitalar, tem vindo a surgir resistência em estirpes de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, algumas Enterobactérias e *Enterococcus faecium*, limitando muito as opções para o tratamento das infecções por elas provocadas.

Uma detecção precoce destas estirpes, o uso comedido deste grupo de antibióticos e a implementação de rigorosas medidas de higiene são alguns dos procedimentos referidos pelos grupos de vigilância internacionais para minorar este problema.

/ Resistência aos antibióticos

A quimioterapia antibacteriana sistémica teve o seu inicio em 1935 com a introdução, na terapêutica das infecções estreptocócicas, das sulfonamidas (cedidas no organismo a partir do corante Prontosil) e descobertas por Domagk. Em 1945 com a descoberta da penicilina por A. Fleming tem inicio a era da antibioterapia.[1, 2] Pouco depois da introdução da penicilina na prática clínica reconheceu-se que as bactérias eram capazes de desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos. Em 1948, a maioria dos *Staphylococcus* spp. hospitalares no Reino Unido eram resistentes à penicilina, devido à produção de penicilinases, enzimas que inactivam por hidrólise o antibiótico.[2, 3] A resistência microbiana aos diversos grupos de antibióticos tem vindo a aumentar ao longo dos anos, sobretudo nos ambientes hospitalares, com o acréscimo de morbilidade e mortalidade nas infecções, conduzindo a uma diminuição da qualidade de vida e a um aumento das despesas com a saúde e cuidados médicos. O grande uso de antimicrobianos resulta numa pressão selectiva que, aliada a populações altamente susceptíveis, cria um ambiente propício à emergência e transmissão de organismos resistentes.[3, 4]

O aparecimento de resistências aos antibióticos é um fenómeno que, embora possa ser minorado, é inevitável. No passado, o problema das resistências era ultrapassado com o aparecimento de novos antibióticos. Contudo, desde há algum tempo que se tem verificado que o desenvolvimento de novos antibióticos tem ficado muito aquém do aparecimento de bactérias resistentes, entrando-se numa situação preocupante em que começam a ocorrer infecções sem solução terapêutica semelhantes às que existiam na era pré-antibiótica.[3]

Vários autores têm vindo a defender medidas que minimizem a curto e a médio prazo o problema das resistências, e que passariam pela (1) optimização da utilização e diminuição das resistências aos antibióticos existentes; (2) diminuição da necessidade de recurso aos antibióticos existentes e (3) síntese de novos antibióticos.[3]

/ Carbapenemos – farmacologia e uso clínico

Os antibióticos carbapenemos pertencem ao grande grupo de antibióticos β-lactâmicos que inclui ainda as penicilinas, as cefalosporinas e os monobactamos. Têm como mecanismo de acção a inibição da síntese do peptidoglicano da parede bacteriana, por bloqueio da formação das ligações transpeptidásicas.[1] Os carbapenemos apresentam como estrutura química um anel β-lactâmico fundido a um anel de 5 membros idêntico ao que existe nas penicilinas, mas que é insaturado e que tem um átomo de carbono em vez de um átomo de enxofre.[1] O primeiro carbapenemo a ser usado foi o imipenemo, seguindo-se o meropenemo. Uma vez que o imipenemo é metabolizado no rim pela enzima dehidropeptidase I é administrado em associação com a cilastatina (um inibidor desta enzima), prolongando-se desta forma as suas concentrações séricas.[5]

Os carbapenemos são descritos como sendo resistentes à maioria das β-lactamases (enzimas responsáveis pela degradação dos antibióticos β-lactâmicos e, consequentemente pela emergência de microrganismos resistentes). Apresentam um espectro que cobre bactérias de Gram positivo, de Gram negativo e anaeróbias.[6] No entanto, os estafilococos resistentes à meticilina (MRSA) não são geralmente susceptíveis ao imipenemo nem ao meropenemo e a susceptibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* é variável.[6] Está descrita a associação do imipenemo com um aminoglicosido em infecções causadas por estirpes desta espécie bacteriana de forma a prevenir o aparecimento de resistência. [5]

O imipenemo é um pouco mais activo contra os Gram positivos, acontecendo o inverso com o meropenemo.[6]

O uso terapêutico deste grupo de antibióticos está reservado ao tratamento de infecções graves, hospitalares, por bactérias sensíveis, nomeadamente do tracto respiratório inferior, das estruturas cutâneas, dos ossos e articulações e do aparelho urinário.[1]

/ Microrganismos resistentes

Como microrganismos conhecidos por serem intrinsecamente resistentes aos carbapenemos encontram-se *Staphylococcus* spp resistentes à oxacilina, *Enterococcus faecium* e *Stenotrophomonas maltophilia*.[7]

De entre os microrganismos descritos como resistentes a antibióticos da família dos carbapenemos encontram-se várias *Enterobacteriaceae* (*Serratia marcescens*, *Enterobacter spp* e *Klebsiella pneumoniae*) e *Pseudomonadaceae* (*P. aeruginosa* e *P. putida*). Tem sido também descrita resistência em *Acinetobacter baumannii* e *Bacteroides fragilis*. [8-14]

O género *Staphylococcus* inclui espécies que constituem uma parte importante da população microbiana indígena da pele e mucosas e outras patogénicas, como é o caso de *S. aureus*. Trata-se de um dos agentes mais frequentes de infecções adquiridas, tanto na comunidade como no hospital. A origem da infecção pode ser endógena (a partir do nariz, da pele ou de uma lesão superficial) ou por transmissão homem a homem que se verifica frequentemente na infecção hospitalar.[15]

Enterococcus são microrganismos que apresentam grande resistência a agentes físicos o que lhes permite a sobrevivência em ambientes hostis. Desta forma, a sua presença torna-se habitual em quase todos os produtos biológicos, no solo, em alimentos, na água, em animais, aves e insectos. No Homem e noutros animais a sua presença é constante nos aparelhos digestivo e urinário, sendo o seu poder invasivo e patogénico escasso. Contudo, quando é agente de infecção, a sua resistência natural aos agentes infecciosos torna muito difícil o tratamento. Causa sobretudo infecções urinárias, sendo também frequentes as infecções pélvica ou intra-abdominal. A bacteriémia surge em terceiro lugar na frequência das infecções enterocócicas: cerca de 5-20% dos casos de endocardite são causadas por *Enterococcus* spp., habitualmente *E. faecalis*.[16]

Enterobacter spp e *S. marcescens* podem provocar infecções a nível do tracto urinário, do tracto respiratório inferior, de feridas cirúrgicas e septicémia, sobretudo em ambiente hospitalar. *K. pneumoniae* é a espécie mais frequente nas infecções humanas, sobretudo a nível dos tractos urinário e respiratório. Os microrganismos do género *Citrobacter* têm um

interesse clínico limitado, embora sejam responsáveis no Homem por, entre outras, infecção urinária e sépsis.[17]

P. aeruginosa é uma espécie ubiquitária, mas que em determinadas circunstâncias se torna um agente patogénico oportunista. As infecções provocadas por este microrganismo surgem em doentes que apresentam de alguma forma o sistema imunitário comprometido. Assim, os principais tipos de infecção por *P. aeruginosa* são: (1) infecção aguda e localizada dos olhos, após lesão da córnea ou cirurgia; (2) infecção crónica dos pulmões de doentes com fibrose quística; (3) infecção grave e disseminada em doentes com SIDA, oncológicos, sob terapia com imunossupressores (após transplante de órgãos) ou que apresentem queimaduras graves.[18]

A. baumannii, por seu turno, é responsável por infecções das vias urinárias, intracranianas, respiratórias, dos tecidos moles, ostiomielite, artrite e bacteriémias.[19]

Membros do género *Bacteroides* (*B. fragilis*) são isolados frequentemente em infecções que ocorrem após cirurgias abdominais ou ginecológicas.[14]

/ Mecanismos de resistência

No Quadro I pode-se encontrar os principais mecanismos de resistência aos carbapenemos. São vários os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenemos: (i) alteração nas proteínas de ligação à penicilina, (ii) a presença de vários tipos de β-lactamases e (iii) a perda de porinas. [11] O principal mecanismo de resistência é a produção de β-lactamases, codificadas quer no cromossoma quer em plasmídeos.

Em *A. baumannii* pode-se encontrar metalo-β-lactamases e β-lactamases da família OXA, respectivamente de classe B e D na classificação molecular de Ambler.[20, 21]

P. aeruginosa exibe quer resistência intrínseca quer adquirida.[22] Neste microrganismo um baixo nível de resistência aos carbapenemos (CMI 8-32 mg/L) deve-se sobretudo a uma reduzida permeabilidade da membrana externa resultante da perda da porina OprD. Este mecanismo de resistência depende ainda da expressão da β-lactamase cromossomal AmpC e de PBPs (*Penicillin-Binding-Proteins*) com afinidade reduzida.[23-25] PBPs são enzimas com actividade trans e carboxipeptidásica, envolvidas na síntese do peptidoglicano, às quais se ligam os antibióticos β – lactâmicos, inibindo desta forma a síntese da parede bacteriana.[26] A resistência ao meropenemo, mas não ao imipenemo, pode surgir de um aumento na expressão do sistema de efluxo MexA-MexB-OprM.[22] Trata-se de um sistema tripartido composto por uma proteína membranar de fusão periplasmática e duas subunidades na membrana interna. Existe uma interacção entre a β-lactamase cromossomal AmpC e o sistema de efluxo.[22, 27] Um nível elevado de resistência aos carbapenemos (CMI>32 mg/L) pode ser causado por metalo-β-lactamases. IMP-1 foi a primeira metalo-β-lactamase descrita em *S. marcescens* e *P. aeruginosa*, tendo sido isoladas no Japão. Mais tarde foi descrita uma nova β-lactamase de classe B, VIM-1, também numa estirpe de *P. aeruginosa* resistente a carbapenemos. Esta enzima confere um elevado nível de resistência ao imipenemo e meropenemo.[23] Aliás, as metalo-β-lactamases não só hidrolizam eficazmente carbapenemos,

QUADRO I – RESUMO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENEMOS

Microrganismo	Mecanismo(s) de resistência
Acinetobacter baumannii	β-lactamases (classes B e D) Alteração das PBP Perda de porinas
Pseudomonas aeruginosa	Permeabilidade reduzida (perda da porina OprD) β-lactamase cromossomal AmpC β-lactamases de classe B PBPs com afinidade reduzida Expressão de um sistema de efluxo (meropenemo)
Serratia marcescens	β-lactamases (classes A e B)
Enterobacter aerogenes	Deficiência na síntese das proteínas de membrana externa (perda de osmoporinas) Hiperprodução da β-lactamase cromossomal AmpC
Enterobacter cloacae	β-lactamase cromossomal Alterações na permeabilidade da membrana externa
Klebsiella pneumoniae	Perda de uma proteína da membrana externa associada à produção de uma β-lactamase AmpC β-lactamase de classe A associada a uma deficiência de uma proteína da membrana externa
Citrobacter freundii	β-lactamase AmpC (CMY) associada a uma diminuição da permeabilidade
Enterococcus faecium	Hiperprodução de uma PBP (PBP5)
Bacteroides spp.	β-lactamases cromossomais de classe A β-lactamases de classe B

mas também β-lactâmicos de espectro alargado . Para além disso são dificilmente bloqueadas por inibidores das β-lactamases como o clavulanato, o sulbactam e o tazobactam, tornando muito difícil o controlo por β-lactâmicos de infecções provocadas por estirpes que apresentam este tipo de enzimas.[9]

Em estirpes de *S. marcescens* foi detectada resistência a carbapenemos devido a uma enzima não pertencente ao grupo das metalo-β-lactamases – a SME-1 (grupo 2f na classificação de Bush).[7,21] Foi também isolada uma estirpe apresentando um plasmídeo que codificava, entre outras β-lactamases, a IMP-6 que confere resistência sobretudo ao meropenemo.[28]

A resistência aos carbapenemos em *Enterobacter aerogenes* deve-se sobretudo à deficiência na síntese das proteinas da membrana externa (*outer membrane proteins* – OMP), homólogas a OMPs de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*. Ainda não está determinado o mecanismo associado à perda de expressão destas osmoporinas, mas como não foram encontradas sequências de ADN inibitórias (como por exemplo, delecções, codões de terminação, sequências de inserção), é possível que existam mutações em genes reguladores e/ou na sequência promotora. A par deste mecanismo ocorre ainda a hiperprodução da β-lactamase cromossomal AmpC.[29]

Em *Enterobacter cloacae* a resistência ao imipenemo deve-se sobretudo a uma cefalosporinase cromossomal e em alguns casos a alterações da permeabilidade da membrana externa.[30]

A resistência ao imipenemo em *K. pneumoniae* deve-se à perda de uma proteina da membrana externa de 42 KDa associada à produção de ACT-1, uma β-lactamase AmpC com origem em *E. cloacae* e mediada por um plasmídeo. Para que a resistência seja detectável os dois mecanismos têm que coexistir. Foi ainda encontrado um baixo nivel de resistência ao imipenemo devido à produção de uma β-lactamase SHV numa estirpe com deficiência numa proteina de 40 KDa da membrana externa.[31]

A resistência aos carbapenemos em *Citrobacter freundii* deve-se ao aumento da



expressão do gene *amp*C que codifica para a β-lactamase CMY associado a uma diminuição da permeabilidade.[31]

E. faecium apresenta seis PBPs, sendo a PBP5 o principal alvo dos antibióticos β-lactâmicos. Verificou-se que a resistência ao imipenemo está associada à hiperprodução de PBP5 com uma diminuição da afinidade para o antibiótico, possivelmente resultante da substituição de quatro aminoácidos. A PBP5 não é essencial para a viabilidade da célula, contudo pode compensar a actividade de outras PBPs essenciais que estejam inibidas por antibióticos β-lactâmicos ou que tenham sofrido mutações.[26]

No que diz respeito a *Bacteroides* spp., a resistência a agentes β-lactâmicos deve-se frequentemente a β-lactamases cromossomais de classe A que são inibidas por clavulanato,

tazobactam e sulbactam, mas que não hidrolisam carbapenemos.[14] Contudo, existe uma pequena percentagem, mas já com algum significado clínico, de estirpes de *B. fragilis* que produz metalo-β-lactamases de classe B, que já têm capacidade para hidrolisar carbapenemos.[14, 32] São enzimas codificadas pelo gene *cfiA* que se pode encontrar silenciado ou que é expresso em diferentes graus, conduzindo a diferentes níveis de susceptibilidade.[32] Algumas estirpes que apresentam o gene *cfiA* parecem ser sensíveis aos carbapenemos (CMI<8mg/L), mas podem desenvolver resistência por pressão selectiva.[14, 33] Actualmente já foram isoladas estirpes que apresentam expressão elevada do gene *cfiA* e consequentemente um nivel elevado de resistência ao imipenemo (CMI>256mg/L). Verificou-se que estas estirpes apresentavam elementos promotores inseridos a montante do gen *cfiA*[33].

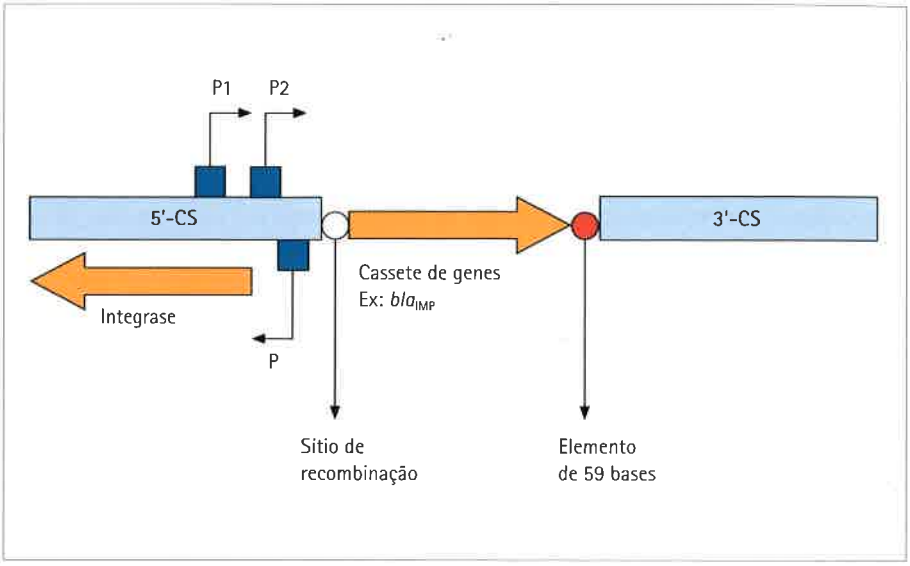

Figura 1: Estrutura geral de um integrão. As setas indicam a direcção da transcrição. O elemento de 59 bases encontra-se a montante de cada cassete de genes, sendo importante no mecanismo de recombinação. As letras P, P1 e P2 indicam as sequências promotoras. (Adaptado de Lévesque C. et al, 1995)

/ Disseminação da resistência

A disseminação de genes de resistência a antibióticos entre estirpes bacterianas, quer da mesma espécie, quer de espécies diferentes, torna-se num problema cada vez mais grave em doenças infecciosas.[34]
A maioria dos genes de metalo-β-lactamases capazes de hidrolizar carbapenemos encontram-se codificados no cromossoma. Após a descrição em 1991, por Watanabe *et al*, de uma metalo-β-lactamase codificada num plasmídeo e presente em *P. aeruginosa*, estas enzimas foram encontradas frequentemente entre bacilos de gram-negativos, tais como membros da família *Enterobacteriaceae* e em *P. aeruginosa*.[28]
Entre as metalo-β-lactamases encontram-se sobretudo as enzimas VIM e IMP que apresentam um largo espectro de hidrólise de β-lactâmicos que inclui oximinocefalosporinas e carbapenemos. Os genes que codificam para as β-lactamases IMP e VIM fazem parte de uma "cassette" de genes localizada em integrões de classe 1. No caso do gene bla_{IMP} poderão também estar localizados em integrões de classe 3.[8, 9,23, 35]
Integrões são elementos genéticos capazes de integrar ou mobilizar "cassettes" de genes por um mecanismo de recombinação que envolve uma integrase e dois sítios de recombinação, um localizado a jusante e outro a montante da "cassette" de genes.[35]
Apresentam ainda duas regiões conservadas (CS) separadas pela região variável onde serão integrados os genes de resistência a antibióticos e outros de função desconhecida[34], representado na Fig.1.
É de salientar que o nivel de resistência aos carbapenemos pode ser elevado com o aumento da expressão do promotor do gene de resistência. Assim, torna-se imprescindível o reconhecimento precoce de estirpes que apresentam este tipo de elemento de ADN. Para tal recorre-se a técnicas de PCR, usando como *primers*, entre outras, sequências correspondentes às regiões conservadas 5'-CS e 3'-CS. [9]
Em Portugal, foi identificada a metalo-β-lactamase IMP-5, localizada num integrão de classe 1, numa estirpe hospitalar de *A. baumannii* [36]. Recentemente, esta enzima foi caracterizada em estirpes de *P. aeruginosa* provenientes de três hospitais portugueses (em publicação). O facto desta enzima ter sido isolada inicialmente numa estirpe de *A. baumannii* pode sugerir a sua disseminação entre géneros e espécies diferentes.

/ Detecção laboratorial de estirpes resistentes

Tem-se verificado algumas dificuldades em testar a susceptibilidade aos carbapenemos.
A utilização de sistemas automatizados de identificação e determinação da sensibilidade tem como inconveniente a obtenção de resultados erróneos de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos.[37]
Contudo, os problemas não se colocam apenas com os métodos da determinação da susceptibilidade. Também podem dever-se a uma sobreinoculação e ao conteúdo em catiões e aminoácidos do meio utilizado ou a uma má interpretação dos resultados – a opacidade que poderá ser interpretada como crescimento bacteriano pode ser consequência da elongação bacteriana que antecede a lise celular.[37, 38]
Há também que ter em conta as condições de armazenamento do imipenemo, uma vez que o factor que está mais relacionado com a falsa resistência ao imipenemo é a sua instabilidade em determinadas condições físico-químicas, podendo a sua concentração diminuir substancialmente ao fim de poucos meses.[39]

Um outro problema que se coloca está relacionado com as condições e tempo de armazenamento das estirpes bacterianas. As porinas bacterianas, cujas alterações são responsáveis pela resistência aos carbapenemos, podem voltar ao seu estado normal, isto é, tornarem a bactéria sensível aos carbapenemos, na ausência de pressão antimicrobiana.[40]

/ Mecanismos de controlo e combate à infecção

O controlo da resistência aos antimicrobianos nos Hospitais passa por várias medidas. Uma delas passa ainda pelo incentivo de uma correcta higiene das mãos, dado que podem ser o veículo principal da transmissão de microrganismos entre doentes e pessoal hospitalar. Uma higiene adequada e concordante com as recomendações do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) nem sempre é levada a cabo porque implica bastante tempo e, para além disso, a frequente lavagem de mãos conduz a efeitos adversos na pele.[39]

Por vezes torna-se necessário o isolamento de doentes em que tenham sido identificados microrganismos multi-resistentes, assim como o seguimento epidemiológico dos doentes infectados e/ou colonizados. Para além destas medidas há a referir a modificação nos procedimentos de limpeza do equipamento contaminado, assim como a vigilância ambiental nas unidades em que são detectadas as infecções nosocomiais[11].

Em meados dos anos 90 foram publicados vários estudos demonstrando que a taxa de cura conseguida com o imipenemo era superior quando comparada com cefalosporinas ou penicilinas de largo espectro. De acordo com essas publicações, doentes tratados com carbapenemos apresentavam um menor tempo de internamento e a necessidade de alterar o regime antibiótico era menos frequente. Daqui resultaria uma diminuição dos custos.

É possível que a partir destes estudos se tenha verificado uma intensificação do uso de carbapenemos em terapêutica empírica. Uma outra medida de combate à resistência aos carbapenemos passaria então pelo controlo da prescrição de antibióticos e a restrição ao uso de carbapenemos, sobretudo nas unidades de cuidados intensivos. Para tal poder-se-á recorrer a formulários que limitam as opções de prescrição e ao o uso de "guidelines" para infecções comuns como a pneumonia adquirida na comunidade.[11, 39,40] Tem sido estudado o uso rotativo de cefalosporinas de 4ª geração, quinolonas, carbapenemos e associações de β-lactâmicos/inibidores de β-lactamases em várias unidades de cuidados intensivos. Contudo esta prática deverá ser cuidadosa, requerendo uma monitorização microbiológica.[39]

Com a facilidade com que actualmente nos movimentamos a transmissão de microrganismos patogénicos multi-resistentes de país para país e até mesmo de continente para continente é uma realidade. Por isso foi criada a INSPEAR (International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance), cujos principais objectivos são servir como um sistema de alerta para a emergência de agentes patogénicos resistentes, permitir a distribuição rápida da informação e funcionar como um modelo para o desenvolvimento e implementação de medidas de controlo da infecção.[41]

No que diz respeito aos carbapenemos e, mais concretamente, ao meropenemo, foi implementado o programa MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Colletion) que pretende vigiar a resistência a nível global, comparando a actividade do meropenemo com outros agentes ao longo do tempo, em centros em que é frequentemente prescrito. Tal permite que os dados sobre a susceptibilidade dos microrganismos sejam interpretados no contexto de uma potencial pressão selectiva. Aliás, o facto de os mecanismos de resistência poderem variar de país para país pode ser o reflexo de diferenças na prescrição e na adesão a práticas de controlo de infecção nas diferentes instituições médicas.[7, 42]

/ Referências

1. Garrett J. Antibióticos Lactâmicos *Beta in* Garrett J, Osswald W, Guimarães S. Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas – Manual de Farmacologia e Farmacoterapia, vol. II, 3ª ed., *Porto Editora*, 886-944.

2. Sousa J, Peixe L, Ferreira H., et al. Antimicrobianos *in* Ferreira W., Sousa J. Microbiologia, 1998, vol. I, *ed. Lidel*, Lisboa., 239-259.

3. Paiva JA *et al.* Infecção Nosocomial. 1997.Serviço de Medicina I, Hospital de S. João, Porto.

4. Nicolle LE. Infection Control Programmes to Contain Antimicrobial Resistance, World Health Organization, 2001.

5. Martindale – The Extra Pharmacopoeia. 30th edition, edited by James E.F. Reynolds, London, 1993, *The Pharmaceutical Press*, 173-174.

6. Medicamentos antibacterianos *in* Prontuário Terapêutico 2, Março de 2001, INFARMED, Ministério da Saúde, 35-36.

7. Pfaller MA, Jones RN, Biedenbach D. Antimicrobial resistance trends in medical centers using carbapenems: Report of 1999 and 2000 results from the MYSTIC Program (USA). *Diagnostic Microbiology an Infectious Disease* 2001; 41: 177-182.

8. Rossolini GM, Riccio ML, Cornaglia G, *et al.* Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired $blaIMP$ Metallo-β-Lactamase Determinants, Italy, *in* www.cdc.gov/ncidod/eid/vol6no3/ rossolini_letter.htm, consultado em 01-03-2003.

9. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, *et al.* PCR Detection of Metallo-β-Lactamase Gene ($blaIMP$) in Gram-Negative Rods Resistant to Broad-Spectrum β-Lactams. *J. Clin. Microbiol* 1996; 34: 2909-2913.

10. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, *et al.* Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase. *J. Clin. Microbiol* 2001; 39: 1865-1870.

11. Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, *et al.* Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Causing Nosocomial Infections in a University Hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases* 2000; 8: 826-832.

12. CDC NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001, Issued August 2001. *Am. J. Infect. Control.* 2001; 29: 404-421.

13. Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M, *et al.* Trends in Antimicrobial-Drug Resistance in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 2000; 6: 572-575.

14. Sóki J, Urban E, Szöke I, *et al.* Prevalence of the carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical and normal flora isolates of *Bacteroides* species in Hungary. *J. Med. Microbiol* 2000; 49: 426-430.

15. Cristino JM. *Staphylococcus in* Ferreira W., Sousa J. Microbiologia, 2000, vol. II, *ed. Lidel*, Lisboa., 39-49.

16. Costa MN. *Streptococcus* e Outros Cocos Gram Positivos Associados *in* Ferreira W., Sousa J. Microbiologia, 2000, vol.II, *ed. Lidel*, Lisboa., 51-62.

17. Sousa JF. *Enterobacteriaceae in* Ferreira W., Sousa J. Microbiologia, 2000, vol. II, *ed. Lidel*, Lisboa., 99-109.

18. Correia IS. *Pseudomonadaceae*. Pseudomonas *in* Ferreira W., Sousa J. Microbiologia, 2000, vol. II, *ed. Lidel*, Lisboa., 123-136.

19. Exposto F. *Neisseria in* Ferreira W., Sousa J. Microbiologia, 2000, vol. II, *ed. Lidel*, Lisboa., 75-83.

20. Bou G, Cerveró G, Dominguez MA, *et al.* Caracterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-Level Carbapenem Resistance in *A. baumanii* Is Not Due Solely to the Presence of β-Lactamases. *J. Clin. Microbiol* 2000 ; 38(9):3299-3305.

21. Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A Functional Classification Scheme for β-Lactamases and Its Correlation With Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39(6): 1211-1233.

22. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. Extrusion of Penem Antibiotics by Multicomponent Efflux Systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter* 2002; 46: 2596-2599.

23. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, *et al.* Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38: 1290-1292.

24. Campbell J, Ciofu O, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis Have Different β-Lactamase Expression Phenotypes but Are Homogeneous in the *ampC-ampR* Genetic Region. *Antimicrob. Agents Chemoter* 1997; 41: 1380-1384.

25. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* Reveals High Resistance to Penem Antibiotics: Penem Resistance Mechanisms and Their Interplay. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2001; 45: 1964-1971.

26. El Amin N, Lund B, Tjernlund A, *et al.* Mechanisms of resistance to imipenem in imipenem-resistant, ampicilin-sensitive *Enterococcus faecium*. *APMIS* 2001; 109(11): 791-796.

27. Maseda H, Kitao M, Eda S, *et al.* A novel assembly process of the multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 2002; 46(3): 677-686.

28. Yano H, Kuga A, Okamoto R, *et al.* Plasmid-Encoded Metallo-β-Lactamase (IMP-6) Conferring Resistance to Carbapenems, Especially Meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45(5): 1343-1348.

29. Sturenburg E, Sobottka I, Mack D, *et al.* Cloning and sequencing of *Enterobacter aerogenes* OmpC-type osmoporin linked to carbapenem resistance. *Int. J. Med. Microbiol* 2002; 291 (8): 649-653.

30. Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, *et al.* Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38(3): 1048-1052.

31. Cao VT, Arlet G, Ericsson B-M, *et al.* Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J. Antimicrob. Chemother* 2000; 46: 895-900.

32. Edwards R, Hawkyard CV, Garvey MT, *et al.* Prevalence and degree of expression of the carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* in Nottingham, UK. J. *Antimicrob. Chemother* 1999; 43: 273-276.

33. Sóki J, Edwards R, Urban E, *et al.* A clinical isolate of *Bacteroides fragilis* from Hungary with high-level resistance to imipenem. *J. Med. Microbiol* 2001; 50: 107.

34. Lévesque C, Piché L, Larose C, *et al.* PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39(1): 185-191.

35. Poirel L, Lambert T, Türkoglü S, *et al.* Characterization of Class 1 Integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla_{VIM-2} Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase Gene and of Two Novel Aminoglycoside Resistance Gene Cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45(2): 546-552.

36. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, *et al.* Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-born metallo- -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215:33-39.

37. Fernández F, Martínez L, Pascual A, *et al.* Falsa resistencia a imipenema en bacilos gramnegativos mediante un sistema automatizado. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2000; 18(10): 500-505.

38. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, *et al.* Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *J. Clin. Microbiol* 2003; 41(1): 351-358.

39. Weinstein RA. Controlling Antimicrobial Resistance in Hospitals: Infection Control and Use of Antibiotics. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7(2): 188-192.

40. Lepper PM, Grusa E, Reichl H, *et al.* Consumption of Imipenem Correlates With β-Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46(9): 2920-2925.

41. Richet HM, Mohammed J, McDonald LC, *et al.* INSPEAR. Building Communication Networks: International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7(2): 319-322.

42. Garcia-Rodriguez JA, Jones RN. Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Isolates from European Intensive Care Units: Data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Colletion (MYSTIC) Programme. *J. Chemother* 2002; 14(1): 25-32.