

ANA CLAUDIA SOUZA RODRIGUES

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E TIPAGEM
MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE DOIS
HOSPITAIS DE CAMPO GRANDE – MS**

CAMPO GRANDE

2010

ANA CLAUDIA SOUZA RODRIGUES

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E TIPAGEM
MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE DOIS
HOSPITAIS DE CAMPO GRANDE – MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Marilene Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CLAUDIA SOUZA RODRIGUES

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E TIPAGEM
MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE DOIS
HOSPITAIS DE CAMPO GRANDE – MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____
Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Marilene Rodrigues Chang
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul

Prof. Dra Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Instituição: Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Prof. Dr. Sônia Maria Fernandes
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que me conduziram até aqui, exemplos de dignidade, honradez e amor.

Ao meu marido que me compreendeu nos momentos de ausência e me apoiou nas minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu a vida e todas as oportunidades necessárias para concretização deste objetivo.

À professora doutora Marilene Rodrigues Chang, não só pela orientação e paciência ao longo deste estudo, mas também pelas oportunidades de aprendizado oferecidas. Minha gratidão e admiração, pelo exemplo profissional e pelo crédito que me foi dado.

Às pessoas que gentilmente doaram sua expertise no assunto, especialmente Dra. Ana Cristina Gales e Renata Picão do laboratório ALERTA/UNIFESP pelo fundamental apoio na padronização das técnicas fenotípicas e à equipe do laboratório de Bacteriologia IOC/FIOCRUZ, em especial Dra. Marise Asensi Dutra, Dra. Ana Paula D. Carvalho e Karynne Rangel Carvalho, pelo apoio e realização das técnicas moleculares.

A direção e à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) e do Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS) por permitirem esta pesquisa em prol do combate a infecções hospitalares.

Aos profissionais que me apoiaram auxiliando na coleta das amostras e também me ofereceram sua amizade. Em especial Silvana U. Kamis, Beatriz Gomes Garcia, Francielly G. Bortoly Carvalho, Ligiane Stabullo, Fernando Aguilar Lopes e Nádia Pereira de Carvalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa, em especial à Débora Olartechea, Gabriela Dorn Nóbrega, Maiara Souza. Rodrigues, Dênio L. Almeida e Kalinca Miranda.

Aos funcionários e professores do programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste que possibilitaram a realização deste sonho.

Rodrigues ACS. Resistência microbiana e tipagem molecular de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de dois hospitais de Campo Grande. Campo Grande 2010. [Dissertação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Pseudomonas aeruginosa tem emergido em todo o mundo com opções limitadas de tratamento. O objetivo do estudo foi avaliar a resistência microbiana e realizar tipagem molecular de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no período de 01/01/07 a 30/06/08 de pacientes internados em dois hospitais de Campo Grande - MS. Após teste de susceptibilidade microbiana pelo método de difusão em Agar, foram selecionadas 70 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima ou imipenem. Realizou-se pesquisa para metalo- β -lactamase por meio do teste de disco-aproximação com ácido 2-mercaptopropiônico e EDTA frente a disco de ceftazidima e imipenem. A produção de MBL foi confirmada com reação de polimerase em cadeia. A tipagem molecular foi realizada por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Os sítios de isolamento mais frequentes foram trato respiratório e urinário. Do total de 70 cepas, 77,1% (54/70) foram resistentes a ceftazidima, 90% (63/70) ao imipenem, e 68,6% (48/70) apresentaram resistência aos dois antimicrobianos. Vinte e uma amostras (30%) foram consideradas pan-resistentes, sensíveis somente a polimixina B. Nenhum isolado de *P. aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase foi detectado por método de biologia molecular, o que sugere a possibilidade da presença de outros mecanismos de resistência de *P. aeruginosa* nos hospitais públicos estudados. A análise molecular demonstrou grande variabilidade genética (22 padrões genéticos distintos). Os resultados demonstram disseminação clonal de *Pseudomonas aeruginosa* entre as instituições hospitalares estudadas, o que ressalta a importância de se conhecer os mecanismos de resistência deste microrganismo para controlar a disseminação dos genes de resistência nestas instituições.

Palavras-chave : *Pseudomonas aeruginosa*, resistência a carbapenêmicos, metalo- β -lactamase.

ABSTRACT

Rodrigues ACS. Microbial resistance and molecular diversity of *P. aeruginosa* in two hospitals in Campo Grande - MS. Campo Grande 2010. [Dissertação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Pseudomonas aeruginosa has been emerged around the world with limited options for treatment. The aim of this study was to assess antimicrobial resistance and detect genetic profile of *Pseudomonas aeruginosa* between 01/01/07 and 30/06/08 in two hospitals in Campo Grande - MS. After agar diffusion method was used to assess antimicrobial susceptibility. Seventy ceftazidime or imipenem resistant has been select .They were further screened for the production of MBL by phenotypic method approximation disk test using 2-mercaptopropionic acid combined with ceftazidime disk, confirmed with polymerase chain reaction and were typed by pulsed-field gel eletroforesis (PFGE). The most frequent sites of isolation were respiratory tract and urinary system. From a total 70 bacterial strains isolated, 77.1% (54/70) were resistant to ceftazidime, 90% (63/70) to imipenem, and 68.6% (48/70) were resistant to both antimicrobials. Twenty one strains (30%) were polimixin B only-susceptible. None metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates were detected. The imipenem resistance might be associate with other resistance mechanisms. PFGE showed twenty two genetic profiles. Results indicate clonal spread among the studied hospitals.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenem resistance; metallo- β -lactamase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e atividade biológica produzida no hospedeiro	20
Tabela 2-	Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Bush	32
Tabela 3-	Características demográficas e clínicas de 70 pacientes com <i>P. aeruginosa</i> internados no HU/UFMS e HRMS de 01/01/2007 a 30/06/2008	56
Tabela 4-	Perfil de resistência microbiana de amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas em dois hospitais públicos de Campo Grande – MS entre 01/01/2007 a 30/06/2008	57
Tabela 5-	Resistência microbiana e padrões de PFGE de <i>P. aeruginosa</i> isoladas entre 01/01/2007 a 30/06/2008 em hospitais públicos de Campo Grande – MS.....	58
Tabela 6-	Características clínicas e laboratoriais de pacientes colonizados ou infectados por <i>P. aeruginosa</i> multiresistentes pertencentes ao perfil “A” determinado por técnica de PFGE	59
Tabela 7-	Características clínicas e laboratoriais de pacientes colonizados ou infectados por <i>P. aeruginosa</i> multiresistentes pertencentes ao perfil “B” determinado por técnica de PFGE	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Classificação da Família Pseudomonaceae por homologia dos grupos de RNA	19
Figura 2-	Envoltório da célula bacteriana Gram negativa ilustrando lipopolissacárides, lipoproteínas e porinas.....	29
Figura 3-	Representação esquemática da disposição, em placa de ágar Mueller Hinton, com discos contendo os agentes quelantes e antimicrobianos utilizados no teste fenotípico de detecção de MBL (disco aproximação).....	42
Figura 4-	Distribuição de 70 <i>P. aeruginosa</i> resistentes a ceftazidima e/ou imipenem de acordo com unidade de internação, isoladas entre 01/01/2007 a 30/06/2008 em dois hospitais públicos de Campo Grande – MS.....	50
Figura 5-	Espécimes clínicas de onde foi isolada <i>P. aeruginosa</i> em pacientes internados em dois hospitais de Campo Grande de 01/01/2007 a 30/06/2009.....	51
Figura 6-	Condições de risco que podem estar relacionadas à colonização/infecção por <i>P. aeruginosa</i> resistente a ceftazidima e/ou imipenem	52
Figura 7-	Amostras positivas para produção de metalo- β -lactamase no teste fenotípico de disco aproximação	53
Figura 8-	<i>P. aeruginosa</i> produtora de SPM-1 (controle positivo) em teste fenotípico – método de disco aproximação	53
Figura 9-	Padrões gerados por PFGE de 70 isolados de <i>P. aeruginosa</i> em pacientes internados dois hospitais de Campo Grande entre 01/01/07 a 30/06/08.....	54
Figura 10-	Dendrograma de padrões gerados por PFGE de 70 cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes internados em dois hospitais de Campo Grande – MS de 01/01/07 a 30/06/08	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MPA	Ácido 2-mercaptopropiônico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMI	Amicacina
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ASTRA	Aspirado traqueal
ATM	Aztreonam
AVE	Acidente vascular encefálico
CAZ	Ceftazidima
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CETOHI	Centro de tratamento de Onco-hematologia Infantil
CFTR	Gene regulador de condutância transmembranar na fibrose cística
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical Laboratory of Standard Insitute</i>
CM	Clínica médica
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxone
CTX	Cefotaxima
CuCl ₂	Cloreto cúprico
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxiribonucleico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESC	Escarro
FeCl ₂	Cloreto férrico
GEN	Gentamicina
GN	Gram negativos
GP	Gram positivos
HRMS	Hospital Regional de Mato Grosso do Sul
HU/UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal

	de Mato Grosso do Sul
IH	Infecção hospitalar
IL-1	Interleucina 1
IMP	Metalo- β -lactamase IMP
IPM	Imipenem
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	Lipopolissacáride
MAC	Ácido mercaptoacético
MBL	Metalo- β -lactamase
MDR	<i>Multiple drugs resistance</i>
MER	Meropenem
MET	Mercaptoetanol
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIC	Concentração inibitória mínima
mRNA	RNA mensageiro
NHSN	<i>National healthcare safety network</i>
NNISS	<i>National nosocomial infection surveillance system</i>
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
Onco	Oncologia
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
pb	Pares de base
PCAT	Ponta de cateter
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
pH	Potencial hidrogênio
PHEN	Fenantrolina
POL	Polimixina
PPT	Piperacilina+tazobactam
Psa-MBL	<i>P. aeruginosa</i> produtora de metalo- β -lactamase
QS	<i>Quorum sensing</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
RNA	Ácido ribonucléico

rpm	Rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCIH	Serviço de controle de infecção hospitalar
SECULC	Secreção de úlcera
SENTRY	<i>Antimicrobial surveillance program</i>
SG	Sangue
SPM	Metalo- β -lactamase SPM
SUS	Serviço Único de Saúde
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris ácido bórico
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TE	Tris EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Hidroximetil amino metano
TSI	<i>Triplice sugar iron</i>
U	Urina
UCO	Unidade coronariana
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTI AD	Unidade de terapia intensiva de adultos
UTI ped	Unidade de terapia intensiva pediátrica
VAP	Pneumonia associada à ventilação mecânica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	A família Pseudomonaceae	17
2.2	Infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.3	Resistência bacteriana	25
2.4	Panorama atual da resistência microbiana de <i>P. aeruginosa</i>	35
2.5	Epidemiologia molecular	36
3	OBJETIVOS	37
4	MATERIAL E MÉTODO	38
4.1	Tipo de estudo	38
4.2	Local e período da pesquisa	38
4.3	Sujeito da pesquisa	39
4.4	Estratégia para análises de dados clínicos	39
4.5	Aspectos éticos	40
4.6	Exames laboratoriais	40
5	RESULTADOS	45
5.1	Resistência global.....	45
5.2	Unidades de internação e espécimes clínicas	45
5.3	Dados demográficos e clínicos	46
5.4	Exames laboratoriais	47
6	DISCUSSÃO	61

7	CONCLUSÕES	72
8	REFERÊNCIAS	74
9	ANEXO A - Carta de autorização do Comitê de Pesquisa e ética do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul.....	98
10	ANEXO B - Carta de aprovação do Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.....	99

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudomonas* é constituído por bacilos Gram negativos pertencentes à família Pseudomonaceae. *P. aeruginosa*, principal espécie desse gênero, pode causar desde infecções superficiais à graves com alta taxa de morbimortalidade (PINHEIRO *et al.*, 2008; ZAVASCKI, 2006a) e frequentemente é encontrada em sítios onde existe acúmulo de umidade, como por exemplo cateteres permanentes, queimaduras e feridas cutâneas exudativas (FERNANDES & RIBEIRO FILHO, 2000). Devido a sua grande capacidade de adaptação é capaz de sobreviver nesses ambientes por tempo prolongado. Por isso, equipamentos e utensílios hospitalares, bem como, soluções e desinfetantes já foram descritos como reservatório para este microrganismo (HEINZE *et al.*, 1988; SUNENSHINE *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, *P. aeruginosa* é frequentemente isolado em unidades de terapia intensiva - UTI's (AGODI *et al.*, 2007; OBRITSCH *et al.*, 2004; ZAVASCKI *et al.*, 2006a). Importante patógeno hospitalar, tem sido responsabilizado por infecções do trato urinário, respiratório, endocardite, meningite, bacteremias, abscessos cerebrais e infecções ósseas (KONEMAN *et al.*, 2008; SADER *et al.*, 2001). Dados do sistema NNISS (*National Nosocomial Infection Surveillance System*) revelam que este agente foi o mais isolado em pneumonias e o segundo mais isolado no trato urinário em UTI's americanas entre 1986 a 2003 (GAYNES & EDWARDS, 2005).

Pacientes com comorbidades e a necessidade de utilização de procedimentos invasivos como cateteres e aparelhos de ventilação mecânica fazem da UTI, local propício para a disseminação de microrganismos oportunistas, quando não são observadas normas de isolamento e técnicas assépticas rigorosas (LISBOA *et al.*, 2007; LODISE *et al.*, 2007a; MENDES *et al.*, 2005; RAJA & SINGH, 2007)

As infecções por *P. aeruginosa* podem ser de difícil tratamento, devido à limitada efetividade dos antimicrobianos. Essa dificuldade se deve a resistência natural desse microrganismo a muitas drogas e sua versatilidade em desenvolver diferentes mecanismos de resistência (FALAGAS & KOPTERIDES, 2006; FRIDKIN *et al.*, 1999).

Os principais antimicrobianos utilizados em infecções graves causadas por *P. aeruginosa* são as cefalosporinas, como ceftazidima e cefepime, penicilinas com inibidor de β -lactamases, como piperacilina combinado a tazobactam, e antibióticos carbapenêmicos como imipenem e meropenem (RANG *et al.*, 2007). O uso abusivo de antimicrobianos parece contribuir para seleção de microrganismos multiresistentes (GALES *et al.*, 2003).

Diversos mecanismos estão envolvidos na resistência de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos, como por exemplo, produção de β -lactamases, bomba de efluxo e redução da permeabilidade da membrana (LIVERMORE & WOODFORD, 2000; TOLEMAN *et al.*, 2002). A produção de β -lactamases, em particular, de metalo- β -lactamase (MBL), confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos, limitando o tratamento clínico. Essas enzimas também já foram encontradas em outros bacilos Gram negativos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens* (ARAKAWA *et al.*, 2000), *Aeromonas* spp (WALSH *et al.*, 1998) e *Acinetobacter* spp (LEE *et al.*, 2005), sugerindo a possibilidade de troca de material genético entre diferentes espécies. Segundo alguns pesquisadores (OH *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005a), o reconhecimento da produção de MBL é essencial para implementar medidas preventivas que impeçam a expansão desse potente gene de resistência.

A diferenciação de linhagens de *Pseudomonas* spp por meio de técnicas de biologia molecular tem se tornado uma ferramenta importante no estudo, controle e prevenção de doenças relacionadas à assistência a saúde.

Na região Centro-Oeste do Brasil, estudos sobre resistência bacteriana são escassos e não se conhece quais formas de resistência são mais frequentes em *P. aeruginosa*, nem tampouco se há disseminação destes mecanismos no estado de Mato Grosso do Sul. Sendo os genes de MBL transmitidos por plasmídios e transposons, se evidencia a importância de conhecer a prevalência de *P. aeruginosa* produtoras de MBL e de controlar a transmissão desta resistência em nosso estado. Além disso, este estudo possibilita a comparação de dados entre duas instituições diferentes e pode auxiliar o corpo clínico na escolha da terapia de pacientes com infecções por este agente internados nestes hospitais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A família Pseudomonaceae

2.1.1 Classificação taxonômica e características gerais

A classificação taxonômica das *Pseudomonas* foi descrita inicialmente por Stanier *et al.* (1966) baseando-se em suas características nutricionais e bioquímicas. O gênero *Pseudomonas* foi classificado em quatro grupos, sendo eles fluorescente, pseudomallei, acidovorans e alcaligenes. Com o advento das técnicas de biologia molecular, Palleroni *et al.* (1972) reuniram estes microrganismos em 5 grupos, levando-se em conta a homologia DNA-rRNA (GILARDI apud KONEMANN *et al.*, 2008).

Kesters *et al.* (1996) realizaram nova classificação, incluindo novos gêneros à família Pseudomonaceae (Figura 1), tais como *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Comomonas*, *Shewanella*, *Metilobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* e *Brevundimonas* (KONEMANN *et al.*, 2008).

As bactérias pertencentes à família Pseudomonaceae são caracterizadas como bacilos Gram negativos não fermentadores, um complexo grupo de patógenos oportunistas de plantas, animais e seres humanos. O gênero *Pseudomonas* é o mais frequente, sendo que *P. aeruginosa* representa em média 75% dos isolados de amostras clínicas. Esse microrganismo é ubiqüitário, com predileção por ambientes úmidos e pode ser encontrada no solo, matéria orgânica em decomposição, água e vegetais. Apresenta pouca exigência para o crescimento e grande versatilidade nutricional (KISKA & GILLIAN, 2003).

Pseudomonas são bacilos não esporulados e aeróbios estritos, utilizam os hidratos de carbono por meio de metabolismo respiratório em que o oxigênio atua como acceptor final de elétrons (KONEMANN *et al.*, 2008).

A principal espécie do gênero, *P. aeruginosa* é citocromo-oxidase positiva e móvel com flagelo monotríquio polar. Esses isolados crescem bem a 42°C, podem

produzir colônias características de morfologia variada, com ou sem odor característico (TRABULSI, 2008).

Os pigmentos produzidos se apresentam de diversas cores designados piocianina (pigmento azul), pioverdina (coloração verde), piorrubina (coloração vermelha) e piomelanina (coloração negra). O principal deles, a piocianina é um pigmento hidrossolúvel que confere coloração esverdeada ao meio de cultura produzido apenas por *P. aeruginosa* (MERINO, 2007).

2.1.2 Patogênese

P. aeruginosa produz uma variedade de fatores de virulência, como lipopolissacarídeo (LPS), exotoxina A, leucocidina, viscosidade extracelular, proteases, fosfolipases e algumas enzimas que favorecem a colonização e posterior infecção. Destaca-se aqui a endotoxina (LPS), que promove a síndrome do choque séptico, por meio da liberação de mediadores com função de vasodilatação (IL-1, TNF), de ativação do complemento e da coagulação intravascular disseminada (KURAHASHI *et al.*, 1999).

Na tabela 1 estão elencados os principais fatores de virulência bacteriana com respectivas atividades biológicas no hospedeiro.

Dentre os fatores extracelulares cita-se produção excessiva de polissacarídeos capsulares (alginato) que facilita a aderência à superfície epitelial pulmonar. Estes polissacárides envolvem a célula bacteriana e fazem com que esta adquira aspecto mucóide. Este fator de virulência é mais comum em pacientes com fibrose cística e apresenta mal prognóstico (HEAD & YU, 2004).

Outra propriedade importante de *P. aeruginosa* para a colonização e infecção é a formação de biofilmes. Estes são complexos formados por micro colônias bacterianas envoltas por uma matriz orgânica de polímeros e componentes celulares que aderem a superfícies de biomateriais e dificultam a ação antimicrobiana (HOGARDT *et al.*, 2004). Além disso, um interessante sistema de comunicação célula a célula denominado *Quorum sensing* (QS) parece emitir sinais entre as estruturas bacterianas protegendo os biofilmes (SKINDERSOE *et al.*, 2008).

Grupo I – <i>Pseudomonas</i>	Grupo II – <i>Burkholderia</i>	Grupo III – <i>Comamonas</i>	Grupo IV – <i>Brevundimonas</i>	Grupo V – <i>Stenotrophomonas</i>	Classificação desconhecida
Grupo fluorescente <i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>	Grupo Pseudomallei <i>B. pseudomallei</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. gladioli</i> <i>B. picketti</i>	Grupo Acidovorans <i>C. acidovorans</i> <i>C. terrigena</i> <i>C. testosteroni</i>	Grupo Diminuta <i>B. diminuta</i> <i>B. vesicularis</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>Cryseomonas luteola</i>
Grupo Stutzeri <i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i> CDC grupo Vb-3					<i>Flavimonas orzyhabitans</i>
Grupo Alcaligenes <i>P. alcaligenes</i> e <i>P. pseudoalcaligenes</i>					<i>Shewanella putrefaciens</i>

Figura 1 – Classificação da família Pseudomonaceae por homologia dos grupos de RNA.

Fonte: Konemann *et al.*, 2008.

Tabela 1 – Fatores de virulência de *P. aeruginosa* e atividade biológica produzida no hospedeiro.

Fator de virulência	Atividade Biológica
Alginato	Aderência à superfície epitelial pulmonar e formação de biofilmes
Fímbrias	Aderência.
Neuraminidase	Facilita a aderência.
LPS	Síndrome séptica
Exotoxina A	Destrói tecido, inibe síntese protéica, interrompe atividade celular e atividade dos macrófagos
Enterotoxina	Produz diarreia
Exoenzima S	Inibe a síntese protéica
Fosfolipase C	Destrói a membrana citoplasmática. Destrói o surfactante pulmonar. Inativa opsoninas
Elastase	Degrada imunoglobulinas e componentes do complemento.
Leucocidina	Inibe função dos neutrófilos e linfócitos
Piocianinas	Impede crescimento de outras bactérias e elimina atividade ciliar respiratória.

Fonte: Konemann *et al.*, 2008.

2.2 Infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

Normalmente, a colonização com agentes oportunistas como *P. aeruginosa* precede infecções leves, graves ou fatais. Este microrganismo pode colonizar orofaringe, intestino e pele de indivíduos saudáveis, mas frequentemente está associado a doenças em pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos (KISKA & GILLIAN, 2003).

Geralmente o processo infeccioso se inicia após quebra de barreira anatômica, como utilização de procedimentos invasivos (POLLACK, 2000). *P. aeruginosa* são pouco isoladas em pacientes hígidos e geralmente estão associadas à água ou materiais contaminados que podem contribuir para a ocorrência de otite dos nadadores (MENA & GERBA, 2009) e oftalmite decorrente de lentes de contato (CHOY *et al.*, 2008).

P. aeruginosa têm grande habilidade de se desenvolver em materiais inertes como artigos e equipamentos hospitalares, assim como manter-se viáveis nas mãos de profissionais de saúde, o que favorece sua disseminação no ambiente hospitalar (PELEGRINO, 2002; TRABULSI, 2008).

De acordo com a portaria 2616/98 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), infecções hospitalares (IH) são :

“aquelas adquiridas após a admissão do paciente e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares”.

São classificadas como IH's:

- Quando, na mesma topografia em que foi diagnosticada infecção comunitária, foi isolado um germe diferente, seguido do agravamento das condições clínicas do paciente;
- Quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação, convencionam-se infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 (setenta e duas) horas após a admissão;
- Aquelas manifestadas antes de 72 (setenta e duas) horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período;
- Infecções de recém-nascido com exceção das transmitidas de forma transplacentária e aquelas associadas a bolsa rota superior a 24 (vinte e quatro) horas;

O avanço tecnológico com maior utilização de procedimentos invasivos para diagnóstico e tratamento de infecções, aliado ao surgimento de bactérias multiresistentes têm levado a um maior período de hospitalização, conseqüentemente elevando os custos hospitalares. Estas infecções costumam ser mais frequentes em pacientes debilitados e normalmente apresentam maior morbimortalidade (FERNANDES & RIBEIRO FILHO, 2000; GILIO et al., 2000). Marra *et al.* (2006) descreveram mortalidade de 71,4% em pacientes com infecção da corrente sanguínea causada por *P. aeruginosa*.

2.2.1 Sítios de infecção

P. aeruginosa é importante patógeno em infecções do trato respiratório e urinário (CORREIA *et al.*, 2007; FURTADO *et al.* 2006; PITOUT *et al.*, 2007). Estudo de Zanetti *et al.* (2003) reportam este agente como o mais frequente em pneumonias hospitalares, ocorrendo em 10 a 25% dos casos identificados na UTI. De forma semelhante GAYNES e EDWARDS (2005) reportaram este microrganismo como principal Gram negativo causador de pneumonia e o segundo mais frequente em infecções urinárias, em UTI's americanas.

Segundo dados do sistema NNISS, no período de 1983 a 2003, *P. aeruginosa* foi o sexto patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea nos Estados Unidos, gerando quadros graves e fatais como bacteremias e sepse (GAYNES & EDWARDS, 2005). Resultados mais recentes da rede de vigilância NHSN (*National Healthcare Safety Network*), citam este microrganismo como segundo mais importante em pneumonias associadas à ventilação (VAP) e quarto em infecções urinárias causadas por cateter urinário (HIDRON *et al.*, 2008). Sekiguchi *et al.* (2005) reportaram surto de infecção urinária relacionada a cateter causada por *P. aeruginosa* multiresistentes no Japão.

Além disso, *P. aeruginosa* também pode causar outras infecções, tais como: meningites (NAIJA *et al.*, 2004), infecções ósseas (STANZANI *et al.*, 2007) e endocardite (KATO *et al.*, 2009).

2.2.2 Condições de risco

Dados da literatura demonstram que alguns fatores podem ser determinantes para infecções por *P. aeruginosa*, tais como: extremos de idade (CAO *et al.*, 2004; TURRINI & SANTOS, 2002), doenças graves como diabetes e câncer (CHATZINIKOLAOU *et al.* ,2000; VARAYIA *et al.*, 2008), internados em unidades críticas, uso de procedimentos invasivos como ventilação mecânica, uso prévio de drogas antipseudomonas e tempo de internação prolongado (AGODI *et al.*, 2007; LODISE *et al.*, 2007a; PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2004).

Dentre as doenças de base associadas a infecções por *P. aeruginosa* destaca-se fibrose cística (DORING *et al*, 2000). Esta costuma ser autossômica recessiva com manifestações sistêmicas, afetando principalmente aparelho respiratório, digestivo e reprodutor e tem como característica a deficiência do gene CFTR (regula a condutância transmembranar na fibrose cística). Na falta de CFTR, ocorre deficiência no transporte de cloro e sódio causando uma anormalidade na produção de muco (RAO & GRIGG, 2006). O quadro clínico consiste em formação de tampões mucopurulentos (infiltrado inflamatório, hipertrofia de glândulas submucosas e metaplasia epitelial) até quadros mais graves como bronquiectasias (RAO & GRIGG, 2006). O ambiente pulmonar parece selecionar um subgrupo de pequenas colônias autoagregativas denominadas “small colony variants” (SCVs). Esta morfologia apresenta crescimento rápido e grande capacidade de formação de biofilme (HAUSSLER *et al.*, 2003).

Portadores de fibrose cística colonizados por *P. aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* podem ter maior gravidade da doença e diminuição da sua sobrevivência. Investigação que incluiu 104 portadores de fibrose cística descreveu que 76% destes pacientes foram colonizados por *P. aeruginosa*. Este estudo encontrou correlação significativa desta colonização com gravidade da doença (ALVAREZ *et al.*, 2004).

P. aeruginosa também costuma ser muito frequente em pacientes internados em unidades críticas, onde é mais comum o uso de procedimentos invasivos que em outros setores. Dados do sistema NNIS, demonstram *P. aeruginosa* como um dos principais microrganismos em infecções de pacientes internados nas UTI's americanas (GAYNES & EDWARDS, 2005).

AGODI *et al.* (2007) avaliaram colonização e infecção por *P. aeruginosa* em pacientes internados em unidades críticas. Os autores sugeriram que pacientes de UTI e o próprio ambiente servem de reservatório para transmissão cruzada e aquisição de microrganismos multiresistentes.

Reforçando a importância do uso de procedimentos invasivos, Hidron *et al.* (2008) reportaram este microrganismo como mais frequente em infecções urinárias relacionadas ao uso de cateter urinário.

Quanto à utilização prévia de antimicrobianos, o uso prévio de fluorquinolonas foi descrito por Paramythiotou *et al.* (2004) como principal fator de risco para o

desenvolvimento de infecções por *P. aeruginosa* multiresistentes. Revisão realizada por Falagas & Kopterides (2006) revelaram que o uso prévio de carbapenêmicos e fluorquinolonas como os mais importantes fatores de risco para a emergência desta multiresistência. Estudo tipo caso-controle realizado por Lodise *et al.* (2007a) reforça esta idéia.

2.2.3 Fármacos empregados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*

Na atualidade, as principais drogas consideradas antipseudomonas são: penicilinas com inibidor de β -lactamase (piperacilina combinado a tazobactam), cefalosporinas de terceira, quarta geração e quinta geração (ceftazidima, cefepime e ceftobiprole), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), aztreonam, fluorquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina) e peptídeos catiônicos como polimixina B e colistina (HANG *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

Os β -lactâmicos são importante grupo de antimicrobianos que agem interferindo na parede celular bacteriana. Estes antibióticos contêm em sua estrutura um anel β -lactâmico que interage com uma proteína ligadora de penicilina (PBP) por afinidade, inibindo a enzima da transpeptidação. Esta enzima é responsável por ligar as cadeias de peptideoglicano e sua inibição causa prejuízo na síntese da parede celular bacteriana (GOODMAN *et al.*, 2006). Para que penicilinas sejam eficazes frente a *P. aeruginosa* é necessária associação aos inibidores de β -lactamase, como piperacilina associada à tazobactam.

Outros β -lactâmicos muito utilizados para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* são as cefalosporinas de terceira e quarta geração, particularmente ceftazidima e cefepime. Isolados sensíveis a ceftazidima e resistentes a cefepime foram descritos inicialmente na França (AUBERT *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos em outras instituições descrevem que cefepime é cefalosporina com melhor atividade para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* (RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Entre os carbapenêmicos, imipenem e meropenem apresentam largo espectro de atividade bactericida, sendo que meropenem costuma ser mais estável quando

comparado ao imipenem (LIVERMORE, 1992). Recentemente foi lançado no mercado o doripenem, carbapenêmico com atividade “in vitro” um pouco superior para *P. aeruginosa* (LIVERMORE, 2009). Estudo recente testou a estabilidade destes três carbapenêmicos e concluiu que o doripenem demonstrou boa atividade frente bactérias produtoras de AmpC e β -lactamases de espectro estendido, porém frente a produção de carbapenemicoases o imipenem foi o de maior atividade (QUEENAM *et al.*, 2010).

Além dos β -lactâmicos, outra classe antimicrobiana com boa ação anti-pseudomonas é a das fluorquinolonas, em especial ciprofloxacina. Estas drogas atuam inibindo a DNA girase afetando a replicação, transcrição e reparo da célula bacteriana (SIRVENT *et al.*, 2006).

Drogas que se ligam à subunidade ribossomal 30S, bloqueando-a e promovendo erros na leitura do mRNA bacteriano como os aminoglicosídeos são geralmente associadas na terapêutica a outros antimicrobianos para tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, porém sua utilização deve ser limitada devido a seus efeitos nefrotóxicos (HANG *et al.*, 2007; MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999).

Peptídeos catiônicos como polimixina e colistina ligam-se a fosfolípidos da membrana atuando como detergentes, interagindo com elementos hidrofílicos e hidrofóbicos, desestabilizando a membrana e alterando a permeabilidade celular. A polimixina B foi muito utilizada no Brasil em meados de 1960. Porém, devido a sua toxicidade deixou de ser prescrita por muito tempo. Atualmente, devido à emergência de cepas resistentes a todas as drogas antipseudomonas, os peptídeos catiônicos voltou a ser usada por ser a única opção terapêutica (FALAGAS *et al.*, 2007). Muitos clínicos utilizam-na como terapia combinada, porém testes “in vitro” não demonstram nenhum sinergismo entre drogas, sugerindo que não há superioridade neste tratamento quando comparado a monoterapia com polimixina B (MITSUGUI *et al.*, 2008).

2.3 Resistência bacteriana

2.3.1 Breve histórico da resistência bacteriana

Um marco para o tratamento de doenças infecciosas foi o episódio em que Alexander Fleming, em 1928 observou em placa de cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada com *Penicillium notatum* com desaparecimento das colônias da bactéria ao redor do fungo, sugerindo produção de substância que suprimiu o crescimento bacteriano. Anos depois, em 1940 Howard Florey e Ernst Chain obtiveram a forma purificada desta substância que foi utilizada para produzir a penicilina, droga esta que marcou o início da “era dos antibióticos” (FERNANDES & RIBEIRO FILHO, 2000).

A partir de 1932, as sulfonamidas foram desenvolvidas e várias modificações químicas começaram a ser realizadas em busca de outros antibióticos. Em 1939, a polimixina começou a ser usada para infecções graves por microrganismos Gram negativos. Daí em diante, até a década de 1980, mais de 20 antibióticos foram descobertos ou sintetizados (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A princípio, os novos antimicrobianos eram eficazes, porém, há evidências que no final da década de 40 uma enzima produzida por *Escherichia coli*, posteriormente denominada de TEM-1, já era capaz de inativar a penicilina (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). No mesmo período começaram a ser descritos *Streptococcus* resistentes a sulfonamidas.

No fim dos anos 50, foi relatado *Staphylococcus aureus* resistente a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina (CHAMBERS, 1988).

Na década de 60, o uso abusivo da penicilina e cefalosporinas colaboraram com o surgimento de *S. aureus* resistente a meticilina, antibiótico recém introduzido para contornar a resistência a penicilina (FERNANDES & RIBEIRO FILHO, 2000).

Em 1973, foram descritas cepas de *Enterococcus* spp com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e uma década depois, surge a resistência à vancomicina neste microrganismo (UTTLEY, 1988).

Em 1983, a primeira β -lactamase de espectro estendido (SHV) foi relatada em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* na cidade de Frankfurt (KNOTHE *et al.*, 1983 *apud* YAN *et al.*, 2000).

No início da década de 90 no Japão, WATANABE *et al.* (1991) descreveram pela primeira vez as carbapenemases em Gram negativos do tipo MBL, capaz de

hidrolisar os carbapenêmicos e a partir de então, estas enzimas se disseminaram por todo o mundo.

Mais tarde, a partir de 1997, *S. aureus* resistentes a vancomicina também foram reportados (HIRAMATSU *et al.*, 1997).

Em 2001 na Carolina do Norte, outro tipo de carbapenêmicoase, produzida por *K. pneumoniae* denominada KPC foi relatado e têm sido descrito em diversas regiões do mundo (TENOVER *et al.*, 2006).

A pressão seletiva exercida pela utilização indiscriminada de antimicrobianos nas últimas décadas pode ter colaborado com o aparecimento de bactérias multiresistentes no ambiente hospitalar. Com o surgimento de novas resistências tornou necessário um aprimoramento da identificação e detecção de mecanismos de resistência bacteriana (GALES *et al.*, 2003).

2.3.2 Mecanismos de resistência de *P. aeruginosa*

Este microrganismo apresenta grande resistência intrínseca aos antimicrobianos fazendo que um número limitado de antibióticos seja efetivo (FALAGAS *et al.*, 2006; FRIDKIN *et al.*, 1999; RAJA & SINGH, 2007). Cefalosporinases cromossômicas, produzidas por gene AmpC (classe C de Ambler) são encontradas em baixos níveis e quando induzidas por β -lactâmicos, como ampicilina e cefalosporinas de 1^a. e 2^a. geração se expressam com maior intensidade. A desrepressão total ou parcial de AmpC eleva a concentração inibitória mínima (CIM) de penicilinas, cefalosporinas e aztreonam. Os carbapenemas também podem se comportar como indutores desta resistência (BONOMO & SZABO, 2006; LIVERMORE, 1995).

2.3.2.1 Produção de enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos

A produção de enzimas capazes de modificar a molécula de aminoglicosídeos é uma característica da maioria das cepas de *P. aeruginosa*. Estas enzimas modificadoras podem atuar por meio de acetilação, adenilação ou fosforilação das moléculas. *P. aeruginosa* que produzem 3-fosfotransferase e 6-

fosfotransferase são naturalmente resistentes a kanamicina e neomicina e se produzirem 3-acetiltransferase e 2-adeniltransferase são resistentes a gentamicina e tobramicina (MINGEOT-LECLERQ *et al.*, 1999). Porém a resistência a esta classe de antibióticos também pode ser causada por outros mecanismos.

2.3.2.2 Mecanismos de resistência adquirida

Pode ser mediada por: redução da permeabilidade da membrana (porinas), bomba de efluxo ou produção de β -lactamases. Algumas moléculas como plasmídios, transposons ou integrons tem sido responsabilizados pela transmissão destes genes de resistência (GIBB *et al.*, 2002; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A combinação desses múltiplos mecanismos confere a *P. aeruginosa* sensibilidade a poucos antimicrobianos utilizados na prática clínica (de FREITAS & BARTH, 2002).

2.3.2.3 Alteração da permeabilidade da membrana

Para um melhor entendimento deste mecanismo, faz-se importante lembrar a composição da célula bacteriana. Os bacilos Gram negativos possuem uma membrana externa que é constituída por dupla membrana, propriedade esta que dificulta o acesso de fármacos para dentro da célula. Esta dupla membrana é constituída de lipopolissacárides (LPS), sendo que a porção lipídica fica voltada para a parte interna (Figura 2). A célula bacteriana utiliza para o transporte de substâncias as porinas, canais protéicos constituídos por subunidades que se agrupam formando poros por onde moléculas se difundem seletivamente. As porinas restringem a entrada de muitas substâncias como a entrada de alguns antimicrobianos (NIKAIDO, 2003).

A entrada de um β -lactâmico pelos canais de porina depende do seu tamanho, carga e hidrofobicidade. Com a modificação destes canais por mutação ou por deleção, a resistência aos antimicrobianos hidrofóbicos aumenta (NIKAIDO, 2003).

Na literatura, o termo mais utilizado para designar as porinas é “*Omp*” que corresponde a “*outer membrane protein*”. Dentre as diferentes porinas da membrana

externa de *P. aeruginosa* estão OprC, OprD, OprE, OprF, sendo que esta última é a maior e mais abundante (MCPHEE *et al.*, 2009). Além disso, OprF é uma porina inespecífica que tem propriedade de realizar lenta difusão das substâncias pelo seu canal, o que auxilia a resistência à alguns antimicrobianos (LIVERMORE, 2001).

A perda da porina OprD resulta em resistência à imipenem e uma diminuição da sensibilidade a meropenem sem alterar a resistência de outros β -lactâmicos. OprE tem grande homologia com OprD, porém é específica para a resistência de cefalosporinas (LIVERMORE, 2001).

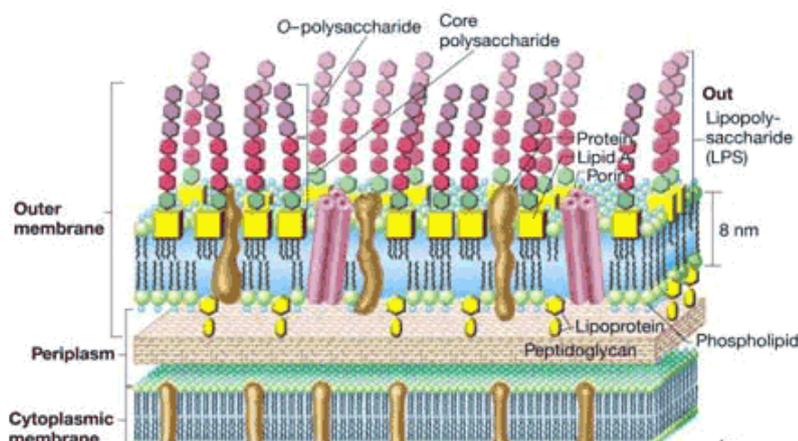


Figura 2 – Envoltório da célula bacteriana Gram negativa ilustrando lipopolissacarídeos, lipoproteínas, peptidoglicano e porinas.

Fonte: Adaptado de Madigan et al., Brock Biology of Microorganisms, 2003 por Cyntia Maria Kiaw. <http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/index.html>

2.3.2.4 Modificação do gene DNA girase

Mutação genética, como a que modifica o gene DNA girase, parecem ser o principal mecanismo de resistência de *P. aeruginosa* frente às fluorquinolonas. Ocorre redução de afinidade desses antimicrobianos a DNA girase, alvo das quinolonas nos bacilos Gram negativos (HANCOCK, 1998).

2.3.2.5 Bomba de efluxo

Este mecanismo é extremamente importante para bacilos Gram negativos não fermentadores para expulsão de substâncias nocivas. Atualmente vários sistemas de efluxo foram descritos em *Pseudomonas aeruginosa* e caracterizados pela sigla MDR (*multiple drugs resistance*). Estes sistemas são constituídos por uma “bomba”, uma proteína de ligação e uma proteína transportadora, sendo que o sistema MexAB-OprM é o mais descrito para este patógeno (LI *et al.*, 2000).

A proteína MexB é uma “bomba de largo espectro”, estrutura transportadora localizada na membrana citoplasmática. Este componente é ligado por MexA em outra proteína denominada OprM, poro que serve como portal de saída. Por esse sistema, ocorre expulsão de antimicrobianos induzindo resistência a cefalosporinas, quinolonas, penicilinas podendo afetar também o meropenem. Aminoglicosídeos e imipenem não são afetados por este mecanismo (JALAL *et al.*, 2000).

Faz-se importante destacar que a bomba de efluxo pode afetar múltiplas drogas ou pode ser um mecanismo droga específico. No primeiro caso, geralmente ocorre a expressão de genes cromossomais e no segundo caso os genes desta resistência estão alojados em elementos móveis como plasmídios e transposons (POOLE, 2005).

2.3.2.6 Resistência a polimixina B

Os peptídeos catiônicos agem sobre a célula bacteriana por meio de efeito detergente, que lhes permite interagir com componentes hidrofílicos e hidrofóbicos do envelope bacteriano. Estes antimicrobianos desestabilizam a membrana externa por deslocamento de cátions divalente e provocam a morte celular. Alguns tipos de *P. aeruginosa* podem degradar os peptídeos catiônicos ou desenvolver resposta adaptativa como resposta ao estresse da membrana (GALES *et al.*, 2001).

2.3.2.7 Produção de β -lactamases

Essas enzimas encontram-se no espaço periplasmático de bacilos Gram negativos em altas concentrações e são classificadas por dois sistemas sendo eles:

o de Ambler (1991) e o de Bush (1995) demonstrados na tabela 2 (AMBLER *et al.*, 1991; LIBISCH *et al.*, 2006; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Entre as β -lactamases, as que apresentam espectro estendido (ESBL) hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, sendo identificadas principalmente em enterobactérias. Um dos primeiros relatos de produção de ESBL em *P. aeruginosa* foi descrição da enzima PER-1 em paciente da Turquia internado em Paris (NORDMANN *et al.*, 1993). Anos depois, Luzzaro *et al.* (2001) relataram um surto de *P. aeruginosa* produzindo esta enzima na Itália. Daí em diante, diversas ESBL têm sido descritas neste microrganismo, como TEM, SHV, PER e GES (CLAEYS *et al.*, 2000; DUBOIS *et al.*, 2001; POIREL *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2006).

A ESBL com atividade mais potente contra os carbapenêmicos é GES-2, descrita na África do Sul, derivada da β -lactamase de espectro ampliado GES-1 (POIREL *et al.*, 2001).

Outras β -lactamases, tipo OXA (Classe D Ambler) hidrolisam principalmente ampicilina, cefalotina, oxacilina, cefalosporinas de terceira geração e aztreonam (NORDMANN *et al.*, 1998). Este grupo de enzimas têm um grande número de variantes que podem ser derivados de OXA-2 ou OXA-10 e são muito frequentes em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. OXA-18 não é derivada de nenhuma outra variante. Algumas carbenicilinas denominadas PSE (Classe A Ambler) inibem ação de penicilinas, mas não afetam ação de cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam. Estudo de Bert (2002) reportou alta prevalência do gene *bla*_{PSE} (62,5%) e de variantes *bla*_{OXA} (26,3%) em amostras de *P. aeruginosa* isoladas na França.

Dois tipos de β -lactamases têm capacidade de hidrolisar carbapenêmicos: aquelas que possuem serina como sítio ativo (classes A, C e D) e outras que requerem cátions divalentes como cofatores para sua atividade (classe B), chamadas Metallo- β -Lactamases (MBL).

2.3.2.8 Metallo- β -lactamase (MBL)

As MBL, geralmente mediadas por plasmídios, conferem a *P. aeruginosa* resistência aos beta-lactâmicos de largo espectro, incluindo cefalosporinas e carbapenêmicos (OH *et al.*, 2003; SANTOS FILHO, 2002).

Estas enzimas estão agrupadas na classe B de Ambler classe 3 de Bush. Zinco dependentes, por utilizarem zinco como cofator enzimático, são inibidas por EDTA e outros agentes tiólicos, não sendo inibidas por inibidores de β -lactamases (WANG *et al.*, 2006).

Tabela 2 – Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Bush

Grupo	Classe	Substrato	Inibição por clavulanato	Enzimas representantes
1	C	Cefalosporinas	Não	AmpC de GN, MIR
2 a	A	Penicilinas	Sim	Penicilinases de GP
2b	A	Penicilinas	Sim	TEM-1, TEM-2, SHV
2be	A	Cefalosporinas Penicilinas	Sim	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>K. oxytoca</i> K1
2br	A	Penicilinas	Sim/Não	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas	Sim	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Cabernicilina Penicilinas	Sim/Não	OXA-1, OXA-11, PSE-2
2e	A	Cloxacilina Cefalosporinas	Sim	Cefalosporinases induzíveis de <i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas	Sim	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Carbapenêmicos Maioria dos beta-lactâmicos, inclusive carbapenêmicos	Não	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i> , MBL
4	Indeterminada	Penicilinas	Não	Penicilinase de <i>B. cepacia</i>

GP – Gram positivos ;GN – Gram negativos. Fonte: Rossi, 2005.

Até 2009 foram descritos 10 genes de MBL, essas são nomeadas de acordo com o primeiro local onde foram reportados. A primeira MBL transferível foi descrita no Japão (1991) e posteriormente denominada IMP-1 (LIVERMORE & WOODFORD, 2000; WATANABE *et al.*, 1991). O gene *bla_{IMP-1}* também foi reportado em outros microrganismos como *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* e *Acinetobacter baumannii* (HARUTA *et al.*, 2000; HIRAKATA *et al.*, 1998; SENDA *et al.*, 1996). Diversos estudos moleculares demonstraram outras variantes da IMP e até o ano de 2009 foram descritas 22 variantes IMP no mundo (DULJASZ *et al.*, 2009).

Em 1997, na cidade de Verona, foi encontrado o segundo gene de MBL designado *bla_{VIM-1}* com menos de 30% de homologia com IMP, porém o mesmo espectro de ação (LAURETTI *et al.*, 1999). A caracterização de VIM-2 foi realizada

um ano depois na França (POIREL *et al.*, 2000) e até 2009, dezenove variantes de VIM foram caracterizadas (CASTANHEIRA *et al.*, 2009; GISKE *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2001).

Toleman *et al.* (2002) descreveram uma nova enzima de MBL relatada pelo programa “SENTRY - Antimicrobial Surveillance Program”, em isolado de *P. aeruginosa* denominada SPM, por ter sido inicialmente descrita na cidade de São Paulo. A amostra foi proveniente de urina e hemocultura de paciente do Instituto de Oncologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo. Posteriormente, *P. aeruginosa* produtoras de SPM foram isoladas em diversos estados brasileiros, tais como João Pessoa, Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Fortaleza e Brasília (CARVALHO *et al.*; 2006; FIGUEIREDO-MENDES *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2003; GASPARETO *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2005; SANTOS FILHO *et al.*, 2002; TORRES & BLANCA, 2006).

Recentemente, várias subclasses de MBL têm sido descritas, tais como: GIM-1 na Alemanha, SIM na Coreia, KHM-1 em Tóquio, AIM-1 na Austrália, NDM-1 em Nova Deli, DIM-1 na Holanda (CASTANHEIRA, I. *et al.*, 2004; GUPTA, 2008; LEE *et al.*, 2005; POIREL *et al.*, 2009; SEKIGUCHI *et al.*, 2008). Esses genes de resistência podem apresentar comportamento fenotípico semelhante, como por exemplo, Bush *et al.* (1995) verificaram que a IMP-1 não hidrolisava os monobactâmicos (aztreonam), o que também foi descrito mais tarde por Toleman *et al.* (2002) com amostra de SPM-1.

Dados da literatura sugerem que MBL pode estar se disseminando por todo mundo. Investigação na Grécia revelou que estes genes de resistência de *P. aeruginosa* foram posteriormente descritos em outros países da Europa (LAURETTI *et al.*, 1999; TSAKRIS *et al.*, 2000).

A emergência de MBL e a preocupação com esta disseminação em unidades hospitalares mostrou a necessidade de desenvolver métodos simples e baratos para a detecção de resistência no laboratório de rotina (ARAKAWA *et al.*, 2000).

Arakawa *et al.* (2000) apresentaram método fenotípico com aproximação de discos (teste disco aproximação, duplo disco ou teste sinérgico) para detectar cepas produtoras de MBL. Estes autores utilizaram como substrato, ceftazidima frente a agentes quelantes e tiólicos: EDTA, FeCl₂, CuCl₂, ácido 2-mercaptopropiônico e mercaptoetanol. A presença de um íon quelante, inibe a atividade da enzima, devido

à presença de zinco no sítio ativo de MBL. Cada agente quelante ou tiólico foi colocado em disco estéril frente a um disco de ceftazidima (30 µL) com distância entre discos de 1 a 2,5 cm. A propriedade dos agentes tiólicos e do EDTA afetarem MBL, produz formação de inibição da zona de crescimento ao redor do halo do antibiótico.

Lee *et al.* (2001) propuseram uma modificação na metodologia de Hodge (teste proposto em 1978 para detectar produção de penicilase em *N. gonorrhoeae*) e compararam com teste de aproximação descrito anteriormente. Testaram um grande número de amostras de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp resistentes a imipenem e alguns isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL (IMP-1, VIM-1, VIM-2). O EDTA foi testado em diversas concentrações frente ao disco de imipenem. Os resultados sugeriram que as duas metodologias poderiam ser utilizadas para triagem de cepas produtoras de MBL (Psa-MBL).

Investigação realizada por Yong *et al.* (2002) utilizou o EDTA diretamente no disco de imipenem (disco combinado) para detectar MBL em isolados clínicos de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Quando a zona de inibição do disco combinado foi maior que 7 mm comparado ao disco simples com antibiótico, o teste foi considerado positivo para produção de MBL. A técnica mostrou ser de simples execução e interpretação, além de apresentar alta sensibilidade para detecção de isolados produtores de MBL e alta especificidade para Psa-MBL.

Yan *et al.*(2004) compararam o teste de disco combinado, teste de disco aproximação e E-test para detectar produção de MBL. A técnica de aproximação em disco com ácido 2-MPA e ceftazidima foi 100% sensíveis para detecção de Psa-MBL, enquanto o Etest teve baixa sensibilidade (36,7%).

Publicação mais recente (JESUDASON *et al.*, 2005) comparou o método de disco aproximação usando EDTA com o método de Hodge modificado e verificou que o teste de disco aproximação detectou mais amostras produtoras de MBL que o teste de Hodge.

Devido a falta de padronização dos testes fenotípicos e divergências quanto a quantidade de substrato ou distância entre os discos no teste de aproximação, Picão *et al.* (2008) compararam o método de disco combinado com o teste de disco aproximação para vários isolados produtores de MBL. Foram testados discos de imipenem e ceftazidima com EDTA e agentes tiólicos diversos em várias

concentrações (ácido 2-Mercaptopropiônico – 2-MPA, ácido mercaptoacético – MAC, mercaptoetanol – MET e fenantrolina – PHEN). Diferentes distâncias entre os discos e diversas concentrações dos compostos tiólicos e EDTA foram também avaliadas. Os autores concluíram que o disco combinado com imipenem frente ao EDTA detectou melhor as MBL de enterobactérias, enquanto para *Pseudomonas* e *Acinetobacter* o teste de aproximação com ácido 2-MPA frente à ceftazidima e imipenem respectivamente foi melhor. Para *P. aeruginosa* a melhor distância entre os discos de 2-MPA e ceftazidima foi de 20 mm de centro a centro e a concentração sugerida para este agente tiólico foi de 1,4mM.

2.4 Panorama da resistência microbiana de *P. aeruginosa*

No final da década do século passado, o estudo SENTRY realizado com dados de hospitais brasileiros, reportou a susceptibilidade de *P. aeruginosa* coletadas entre 1997 e 1999. Este estudo demonstrou que 62% das amostras eram sensíveis aos aminoglicosídeos, 56% as quinolonas, 60% a cefalosporinas de terceira geração e 80% aos carbapenêmicos (SADER *et al.*, 2001). Dados deste estudo também mostram o aumento da resistência ao imipenem no período de 1997 a 1999 com índices de 31,2% (SADER *et al.*, 2001) e de 65,3% de 1998 a 2004 (MOET *et al.*, 2007). O sistema NNIS também relatou aumento de 32,0% na resistência ao imipenem comparando dados coletados entre os anos de 1994 a 1999 (NNIS, 1999).

Dados nacionais relatam índices preocupantes de resistência a drogas antipseudomonas, tais como 48,6% a ceftazidima, 56,7% a imipenem e 52,2% a meropenem e 61,2% a piperacilina com tazobactam (ZAVASCKI *et al.*, 2006d). Estudos de Gales *et al.* (2003), em no estado de São Paulo avaliou cepas de *P. aeruginosa* previamente resistentes a imipenem por meio da técnica de microdiluição em caldo e reportou sensibilidade de 39,5% a piperacilina+tazobactam, 30,2% a aztreonam e 27,9% a gentamicina.

A disseminação clonal de MBL tem sido comprovada por diversos estudos e demonstra a necessidade de implantação de medidas de controle para conter a disseminação de microrganismos produtores desses genes de resistência (FRITSCHÉ *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2003; GRAF *et al.*, 2008).

A detecção de cepas resistentes é essencial para o conhecimento da epidemiologia da doença em cada hospital e região e orienta decisões clínicas importantes, como tratamento empírico de infecções e controle de surtos (LODISE *et al.*, 2007a).

2.5 Epidemiologia molecular

Embora os testes fenotípicos tenham boa sensibilidade, só é possível confirmar a presença e determinar o subtipo de MBL por meio de técnicas de genotipagem, que são mais sensíveis e específicas. A disseminação clonal e o encontro de cepas relacionadas entre si também só podem ser avaliados com técnicas moleculares e são particularmente úteis em vigência de surto ou epidemia (CORNAGLIA *et al.*, 2000; GIBB *et al.*, 2002)

Na tentativa de melhor elucidar questões epidemiológicas e de mecanismos de resistência microbiana, alguns métodos com aplicação de biologia molecular tem sido propostos. Estes métodos genotípicos têm maior reprodutibilidade e são menos sujeitos a variações. As técnicas mais utilizadas são: PCR (*Polimerase Chain Reaction*), Ribotipagem, RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

A técnica de PCR consiste em amplificação de fragmentos específicos de DNA e quantificação dos mesmos e tem sido usada para identificar o subtipo de MBL (SENDA *et al.*, 1996).

Estudos com técnicas de biologia molecular revelam que o gene bla_{SPM-1} é o mais freqüente em diferentes regiões do Brasil: 43,9% em São Paulo (SADER *et al.*, 2005b), 28% no Rio Grande do Sul (ZAVASCKI *et al.*, 2006a), 74,3% em Goiás (GONÇALVES *et al.*, 2009). Carvalho *et al.* (2006) caracterizaram 20% das amostras resistentes a carbapenêmicos como produtoras de SPM-1 em hospitais do Rio de Janeiro.

A análise de fragmentação de DNA por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE) é útil para a investigação epidemiológica de microrganismos e auxilia na elucidação de surtos (CORNAGLIA *et al.*, 2000).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi estudar resistência microbiana e realizar tipagem molecular de *Pseudomonas aeruginosa* de dois hospitais de Campo Grande – MS.

Objetivos específicos:

- a) Estimar a frequência de *P. aeruginosa* multiresistentes provenientes de amostras clínicas.
- b) Identificar as unidades de internação, espécimes clínicas e sítios de infecção mais acometidos por *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem nos dois hospitais.
- c) Descrever dados clínicos e laboratoriais relacionados com colonização ou infecção por *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem.
- d) Conhecer o perfil de suscetibilidade a 10 antimicrobianos de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou a imipenem.
- e) Estimar a frequência de *P. aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase.
- f) Realizar genotipagem das cepas por meio de técnica de eletroforese em campo pulsado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de estudo descritivo analítico de desenho transversal.

4.2 Local e período da pesquisa

O estudo foi realizado com amostras de dois grandes hospitais de Mato Grosso do Sul. O Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS), hospital de esfera estadual de Campo Grande – MS, com atendimento público e subordinado a Secretaria de Saúde do estado. Apresentando 321 leitos, 36 são de Unidades Críticas, distribuídos da seguinte maneira: 10 leitos de UTI adulto, 12 unidades intermediárias, 8 UTI's neonatal e 6 de UTI's pediátrica. Possui equipe de CCIH com SCIH (Serviço de Controle de Infecção Hospitalar) formada por 2 médicos, um administrativo e uma enfermeira, exclusivos para o serviço e conta com a participação de membros consultores (representantes do laboratório, da administração, farmácia, enfermagem, lavanderia e nutrição).

O Hospital Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS) é hospital escola de atendimento público subordinado a esfera Federal. Com 256 leitos ocupados, possui 41 leitos de unidades críticas, distribuídos em: 8 de UTI adulto, 6 de UTI neonatal, 12 unidades intermediárias, 5 UTI's pediátricas e 2 unidades de isolamento. A CCIH possui como membros executores do SCIH, uma enfermeira e um auxiliar administrativo. Outros profissionais como infectologistas, enfermeiros, farmacêuticos são membros consultores e trabalham também em outros setores.

A pesquisa experimental consistiu no estudo de materiais biológicos diversos não repetitivos, armazenados em meio *skin milk* ("in house") congelado no banco de cepas, dos dois hospitais coletados entre 01/01/07 a 30/06/08. A identificação, o

antibiograma realizado nas duas instituições foi repetido com o teste fenotípico para detecção de MBL no laboratório de microbiologia do Departamento de Farmácia e bioquímica da UFMS.

O laboratório ALERTA, laboratório de investigação de mecanismos de resistência a antimicrobianos agregado ao LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica) da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo) forneceu treinamento para realização dos métodos fenotípicos e cepas controles.

Os métodos moleculares, como PCR e PFGE foram realizados no laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do IOC (Instituto Osvaldo Cruz) – FIOCRUZ.

4.3 Sujeitos da pesquisa

A coleta foi realizada por pessoal técnico treinado, seguindo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2004) de acordo com solicitação médica.

Foram incluídas no estudo, amostras provenientes de pacientes em unidades de internação dos dois hospitais, que apresentaram culturas positivas para *P. aeruginosa*. Deste total foram selecionados 70 isolados resistentes a ceftazidima e/ou imipenem, previamente armazenados no banco de cepas do setor de microbiologia destes hospitais.

Foram consideradas amostras multiresistentes aquelas resistentes a mais de seis antimicrobianos testados e pan-resistentes quando resistentes a todas as drogas testadas com exceção da polimixina B.

4.4 Estratégia para análise de dados clínicos

Os dados clínicos foram compilados de prontuários médicos e tabulados em programa EXCELL 2003. Para análise dos resultados foram utilizados Epi-Info 3.4.1. e Bioestat 5.0. As variáveis estudadas foram: idade, comorbidades, utilização prévia de antimicrobianos e período de internação. Uma comparação entre as proporções encontradas nos dois hospitais foi realizada com o “test z”. As comorbidades consideradas foram doenças neurológicas, respiratórias, cardíacas, hepáticas,

renais, diabetes mellitus, neoplasias e AIDS. O tempo de internação foi submetido a teste de Qui-quadrado para verificar associação. O teste *T-student* foi utilizado para comparar a idade e o tempo de internação das amostras com perfil A e B de PFGE.

4.5 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela comissão de pesquisa e ética do HRMS (anexo A) e pelo comitê de ética em pesquisa da UFMS (anexo B). Como foram utilizados isolados bacterianos armazenados nos bancos de cepas dos hospitais, foi aprovada dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em atendimento a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, foi assegurada a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos sujeitos da pesquisa.

4.6 Exames laboratoriais

4.6.1 Identificação bacteriana

A identificação de *P. aeruginosa* foi realizada pelos laboratórios de microbiologia das unidades hospitalares estudadas com base na metodologia convencional. Bacilos Gram negativos não fermentadores dos açúcares em meio TSI (Tríplice Sugar Iron - OXOID), com crescimento em ágar MacConkey, produção de pigmentos pioverdina, piocianina ou piorrubina, odor característico, oxidase e motilidade positiva (KONEMANN *et al.*, 2008) foram identificadas como *P. aeruginosa* e quando necessário confirmadas por aparelho Autoscan® (Dade-Behring).

4.6.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Os testes de susceptibilidade foram realizados por método de difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1976 *apud* POLETTO & REIS, 2005) no laboratórios de

microbiologia dos hospitais e confirmados no laboratório do departamento de farmácia e bioquímica da UFMS.

A partir do crescimento exponencial bacteriano (24h), colônias suspensas em salina com turvação ajustada para 0,5 da escala de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) foram inoculadas em ágar Muller Hinton (OXOID) com auxílio de swab estéril. Após 15 minutos de repouso, discos recomendados pelo *Clinical Laboratory Standard of Institute* – CLSI foram colocados na placa e incubados em 35°C (± 2) por 16 a 18 horas.

Os antibióticos testados foram: ceftazidima 30 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, cefepime 30 μ g, tazobactan + piperacilina 100/10, imipenem 10 μ g, meropenem 10 μ g, aztreonam 30 μ g, gentamicina 10 μ g, amicacina 30 μ g e polimixina 300 μ g. A susceptibilidade foi verificada por leitura do diâmetro dos halos formados e interpretados de acordo com valores estabelecidos pelo CLSI (2006, 2007). Cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controle dos meios de cultura e dos discos utilizados.

4.6.3 Detecção fenotípica de MBL

A detecção de MBL foi realizada no laboratório de microbiologia do departamento de Farmácia e bioquímica da UFMS de acordo com metodologia proposta por Arakawa *et al.* (2000) com sugestões de Picão *et al.* (2008). Inicialmente cepas foram repicadas em ágar Muller Hinton e incubadas por 16 a 18 horas em temperatura de 35°C (± 2).

Após este período uma suspensão salina ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi inoculada em ágar Muller Hinton por meio de swab estéril. Após 15 minutos, foram colocados os discos de ceftazidima 30 μ g e imipenem 10 μ g, e dois discos sem antibiótico entre eles, conforme ilustrado na figura 3. Em um dos discos foi adicionado 5 μ L de ácido 2-mercaptopropiônico diluído 1:8 (1,4mM) e no outro EDTA 0,5M. A distância entre os discos foi de 2 cm de centro a centro. A placa foi inoculada a 35°. C (± 2) por 16 a 18 horas. Como controles positivos de Psa-MBL cepas produtoras de IMP e SPM foram gentilmente cedidas pelo Laboratório ALERTA.

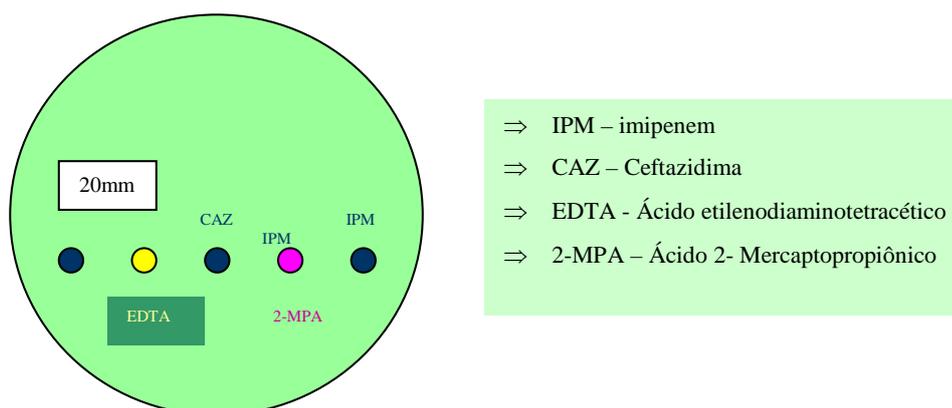


Figura 3 – Representação esquemática da placa de ágar Mueller Hinton com discos de agentes quelantes e antimicrobianos utilizados no teste fenotípico de detecção de MBL (disco aproximação).

4.6.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

A extração de DNA foi feita pelo Método de lise térmica. Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 18-24 horas. Um mL de cultura de cada isolado foi transferido para microtubo e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 500 µL água milli-Q e submetido a banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado e centrifugado (14000 rpm por 15 segundos). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C.

Para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram amplificadas regiões específicas do genoma dos isolados de *P. aeruginosa*, conforme técnica consagrada (Mullis, 1987). Foi adicionado em cada eppendorf água esterilizada, tampão de reação 1X, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]), 1,5 U da enzima DNA polimerase e 3 µL do DNA obtido pela extração por choque térmico, com volume total final de 50 µL (CARVALHO, 2004).

Os iniciadores foram selecionados a partir de estudos anteriores registrados na literatura (KIMURA *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2006):

- SPM F 5'CCTACAATCTAACGGCGACC3'
- SPM R 5'TCGCCGTGTCCAGGTATAAC3'

- IMP-1 F 5'CTACCGCAGCAGAGTCTTTTG3'
- IMP-1 R 5'AACCAGTTTTGCCTTACCAT3'
- IMP-2 F 5'GTTTTATGTGTATGCTTCCTTTGTAGC3'
- IMP-2 R 5'CAGCCTGTTCCCATGTACG3'
- VIM-1 F 5'GTTTGGTCGCATATCGCAAC3'
- VIM-1 R 5'AGACCGCCCGGTAGACC3'
- VIM-2 F 5'ATGAAAGTGCGTGGAGAC3'
- VIM-2 R 5'CTACTCAACGACTGAGCGATTTGT3'

As condições de reação utilizadas foram: pré-desnaturação a 94°C (5 min), seguido por 30 ciclos a 94°C (30 seg), 55°C (30 seg) e 72°C (1 min). A amplificação pela PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X (Tampão Tris-Acetato).

Eletroforese em Gel de Agarose – O gel foi preparado com agarose em tampão TAE 1X (concentração de 1,0 %). Foi adicionado tampão de corrida nas amostras de DNA (1/5 do volume da solução de DNA). Foram aplicados o produto da PCR e 1µL de marcador de peso molecular nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 60 Volts. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento VDS (Pharmacia-Biotech).

4.6.5 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada no laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do IOC (Instituto Oswaldo Cruz) - FIOCRUZ. A preparação do DNA cromossomal foi realizada por meio de técnica "in situ" com blocos de agarose. Uma solução de crescimento bacteriano em fase exponencial (ágar TSB inclinado) foi suspensa em 400 µL de solução BSC (Tris 1M pH 8,0, EDTA 0,5M). À suspensão de células foi adicionado 5µL de proteinase K (Sigma) e 200 µL de agarose (*low melting* – BioRad) a 1%. A mistura foi distribuída em moldes de agarose. Os blocos foram transferidos para solução de lise (TRIS 1M pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0 e N-lauril sarcosil 10%+5µL de proteinase K) e incubados a 50 °C por 24 horas. Em seguida foram feitas seis lavagens com tampão TE (TRIS-HCl 10mM pH 8,0; EDTA

0.1mM pH 8,0) a 37 °C e incubadas com tampão da enzima por 1 hora a 5 °C. Após a retirada do tampão, incubou-se os moldes com enzima de restrição SpeI (Invitrogen) a 37°C durante 2h (CARVALHO, 2004).

O procedimento de eletroforese foi realizado por meio de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose 1,2% e corrido com tampão TBE (0.4X Tris Borato EDTA) no aparelho CHEF DR II (BioRad, California). As condições da corrida consistiram em tempo de pulso crescente de 5 a 25s, por 18h a 6V/cm na temperatura de 14 °C, com ângulo de 120 °C. Os fragmentos foram corados com brometo de etídeo e fotografados. O perfil das bandas foi analisado usando Gel Compar III (Applied Maths, Belgium).

O dendrograma foi gerado usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Inspeção visual dos perfis de fragmentação obtida foi interpretado conforme critério de Tenover *et al.* (1995). Foram considerados geneticamente distintos ou não relacionados padrões com diferença maior que 3 bandas, intimamente relacionadas, amostras com diferença de até 1 banda e possivelmente relacionadas amostras com diferença de 2 bandas.

5 RESULTADOS

5.1 Resistência global

Levantamento dos dados no período de 01 de janeiro de 2007 a 31 de junho de 2008 demonstrou que foram isoladas 213 *P. aeruginosa* de pacientes internados no Hospital Regional (HRMS). Destas, 73 (34,3%) foram multiresistentes e 21 (9,9%) pan-resistentes.

No Hospital Universitário (HU/UFMS), foram 196 culturas positivas para *P. aeruginosa*, das quais 73 (37,2%) foram multiresistentes e 25 (12,8%) pan-resistentes.

Foram incluídos no estudo 70 isolados resistentes a ceftazidima e/ou imipenem, previamente armazenados na coleção de cepas dos laboratórios de microbiologia dos dois hospitais, para realização de estudos clínicos e laboratoriais. As cepas eram mantidas em criotubos congelados em “Skin Milk” a temperatura de -20°C. Dentre estas 70 amostras, 49 foram provenientes do HRMS e 21 do HU/UFMS.

5.2 Unidades de internação e espécimes clínicas

A figura 4 ilustra a distribuição de *P. aeruginosa* com resistência a ceftazidima e/ou imipenem por unidade de internação, onde pode-se observar que a maioria dos isolados era proveniente de UTI de adulto (47,6% do HU/UFMS e 55,1% do HRMS) e enfermaria de Clínica médica (33,3% do HU/UFMS e 28,6% do HRMS).

As 70 cepas de *P. aeruginosa* selecionadas eram provenientes de diferentes pacientes e foram isoladas principalmente de urina (25; 35,7%), aspirado traqueal (17; 24,3%) e outras secreções (19; 27,1%), tais como secreção de escara, úlcera sacral e úlcera trocântérica (Figura 5).

5.3 Dados demográficos e clínicos

P. aeruginosa resistentes a ceftazidima e/ou imipenem foram isoladas de pacientes com idade de 0 a 89 anos e foi mais freqüente em pacientes com mais de 60 anos (47,14%).

As principais características demográficas e clínicas estão elencadas na tabela 3. Doenças renais (insuficiência renal) e diabetes mellitus (DM) foram as comorbidades mais descritas no HRMS e doença neurológica e diabetes mellitus no HU/UFMS. Dos treze pacientes com doenças neurológicas, cinco apresentavam quadro de Acidente Vascular Encefálico (AVE).

Dois pacientes eram portadores de imunodeficiência adquirida (AIDS) e seis de tumor sólido localizado em diferentes sítios (próstata, útero, bexiga, estômago, pâncreas e reto).

O tempo médio de internação dos pacientes variou nas duas instituições. No HRMS, o isolamento de *P. aeruginosa* foi mais frequentes em pacientes de 40 a 59 dias. No HU/UFMS, *P. aeruginosa* foram mais frequentes nos pacientes internados entre 20 a 39 dias.

A comparação estatística de proporções entre as duas instituições, realizada pelo “teste z” demonstrou que entre as comorbidades, o maior isolamento deste microrganismo em pacientes com insuficiência renal no HRMS foi estatisticamente significativa ($p=0,03$).

Na figura 6 observa-se que entre os 70 pacientes selecionados, 60 (85,7%) foram submetidos a procedimentos invasivos. Dentre esses 50 (71,4%) estavam sob ventilação mecânica, 39 (55,7%) com sonda vesical de demora, 48 (68,5%) com cateter venoso central, 48 (68,5%) submetidos a procedimentos cirúrgicos, 8 (11,4%) a diálise e 2 (2,9%) a quimioterapia.

A análise do tempo de internação dos pacientes nos dois hospitais não foi considerada estatisticamente significativa (Qui-quadrado=0,31). Porém quando comparado período de internação dos pacientes de perfil “A” e “B” (PFGE), o teste t-student demonstrou que a idade mais elevada dos pacientes foi encontrada naqueles de perfil B ($p=0,048$), e os pacientes do perfil “A” permaneceram mais tempo internados ($p=0,035$) e desenvolveram infecções mais resistentes.

Quanto à utilização prévia de antimicrobianos, os carbapenêmicos foram os mais utilizados no HRMS, enquanto no HU/UFMS, as cefalosporinas, em particular, o cefepime foi o mais administrado.

5.4 Exames laboratoriais

O teste de susceptibilidade microbiana “in vitro” revelou que entre as 70 cepas isoladas nos dois hospitais, a resistência de *P. aeruginosa* frente à ceftazidima foi de 77,1% (54/70), 90% (63/70) ao imipenem e 68,6% (48/70) apresentaram resistência cruzada aos dois antimicrobianos.

Na tabela 4 observa-se a freqüência de resistência microbiana encontrada de acordo com a instituição hospitalar.

No que diz respeito à resistência as cefalosporinas, cinqüenta e quatro cepas de *P. aeruginosa* apresentaram resistência a cefepime e ceftazidima, quatorze cepas foram resistentes a cefepime e sensíveis a ceftazidima e apenas duas amostras tiveram relação inversa.

Todas as amostras do HU/UFMS foram resistentes a ciprofloxacina, enquanto os isolados do HRMS apresentaram 71,4 % de resistência a esta droga. A resistência a tazobactam+piperacilina foi de 71,4% no HRMS e de 47,6 % no HU/UFMS. De forma semelhante, a resistência ao aztreonam também foi maior no HRMS (91,8%) quando comparada ao HU/UFMS (76,2%). A análise pelo “teste z” demonstrou que somente o uso de tazobactam+piperacilina no HRMS foi significativamente diferente entre as duas instituições.

Quanto à resistência aos aminoglicosídeos, resistência à gentamicina foi mais elevada do que à ampicilina nas duas instituições.

Dos 70 isolados, 46 foram resistentes tanto ao imipenem quanto ao meropenem e sete foram sensíveis aos dois antimicrobianos. Todas as amostras foram sensíveis a polimixina.

Vinte e uma amostras (30,0%) foram consideradas pan-resistentes, pois foram resistentes a todos os antimicrobianos testados, com exceção a polimixina B e 57 (81,4%) apresentaram perfil de multiresistência. Dentre estas, 13 foram de amostras provenientes de pacientes internados em UTI de adulto.

A tabela 5 mostra 31 de padrões de resistência microbiana dentre as 70 cepas de *P. aeruginosa* estudadas. Em isolados do HRMS foram observados 24 padrões de resistência distintos e doze no HU/UFMS. Cinco padrões de resistência (número 01, 07, 08, 11 e 22) foram encontrados nos dois hospitais estudados.

5.4.1 Detecção de metalo- β -Lactamase

5.4.1.1 Teste de disco aproximação utilizando ácido 2-mercaptopropiônico e EDTA

Três cepas de *P. aeruginosa* tiveram resultado positivo para pesquisa de MBL pelo método de disco aproximação (Figura 7). Em duas amostras ocorreu a inibição de crescimento com a utilização de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) frente à ceftazidima. Uma amostra foi positiva com o uso de 2-MPA frente ao imipenem.

A figura 8 ilustra os controles positivos com utilização de ceftazidima e imipenem frente a 2-MPA e EDTA.

5.4.1.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Para confirmação de produção de MBL, as amostras de *P. aeruginosa* positivas no teste fenotípico foram submetidas à técnica de PCR. Esta técnica não detectou a presença de nenhum subtipo de MBL nestes isolados.

5.4.2 Análise de perfis de DNA cromossômico por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A análise da similaridade genética das 70 *P. aeruginosa* realizada pela técnica de PFGE revelou 22 padrões distintos de fragmentos de DNA cromossômico designados arbitrariamente por letras de "A" a "V". Foram encontrados quatro perfis predominantes, sendo eles os perfis "A" (n=14), "B" (n=11), "C" (n=9) e "D" (n=6).

P. aeruginosa com perfil genético “A” foi observado nos dois hospitais em cepas de pacientes internados na UTI de adulto, CM e UCO do HRMS e em isolados da UTI adulto e CM do HU/UFMS (Tabela 6). Dos quatorze isolados com este perfil molecular, onze foram pan-resistentes e três isolados foram sensíveis somente a dois antimicrobianos dos 10 testados.

A média de idade dos pacientes dos quais foram isoladas *P. aeruginosa* perfil “A” foi de $51,29 \pm 22,54$ anos (média \pm dpm). Estes pacientes tiveram tempo de internação de $57,79 \pm 37,25$ dias. Sete pacientes deste perfil (50%) foram a óbito. Os perfis “B”, “C”, “D”, “E”, “K”, “R” e “V” também apresentaram amostras pan-resistentes.

De onze cepas do perfil “B”, oito apresentaram padrão de multiresistência e um isolado foi pan-resistente (Tabela 7). Este perfil genético foi observado na UTI de adulto e CM do HRMS e um isolado da CM do HU/UFMS. A média de idade dos pacientes dos quais foram isoladas *P. aeruginosa* com este perfil foi de $68,64 \pm 17,84$ anos com tempo de internação de $31,27 \pm 13,70$ dias. Oito pacientes (72,7%) foram a óbito.

Outros padrões genéticos de PFGE foram detectados em menor número de amostras, tais como quatro isolados dos perfis “E” e “J”, três com genótipo “F” e dois de perfis “G”, “K”, “Q” e “R”. Os demais genótipos (“H”, “I”, “M”, “N”, “P”, “S”, “T”, “U” e “V”) foram representados por uma única amostra, não relacionadas entre si.

Os perfis “D”, “H”, “I”, “M”, “O”, “P”, “R”, “S”, “T”, “U” e “V” foram encontrados apenas em amostras do HRMS e os padrões “K”, “L” e “N” somente em isolados do HU/UFMS. Os perfis “A”, “B”, “C”, “E”, “F”, “G”, “J” e “Q” foram comuns nas duas instituições hospitalares.

A figura 9 ilustra os padrões de bandas obtidos por PFGE. O dendrograma ilustrado, mostra grande variabilidade genética entre as 70 *P. aeruginosa* selecionadas. O padrão genético “E” apresentou 85% de similaridade genética com “K”. Outros isolados apresentaram pouca similaridade genética.

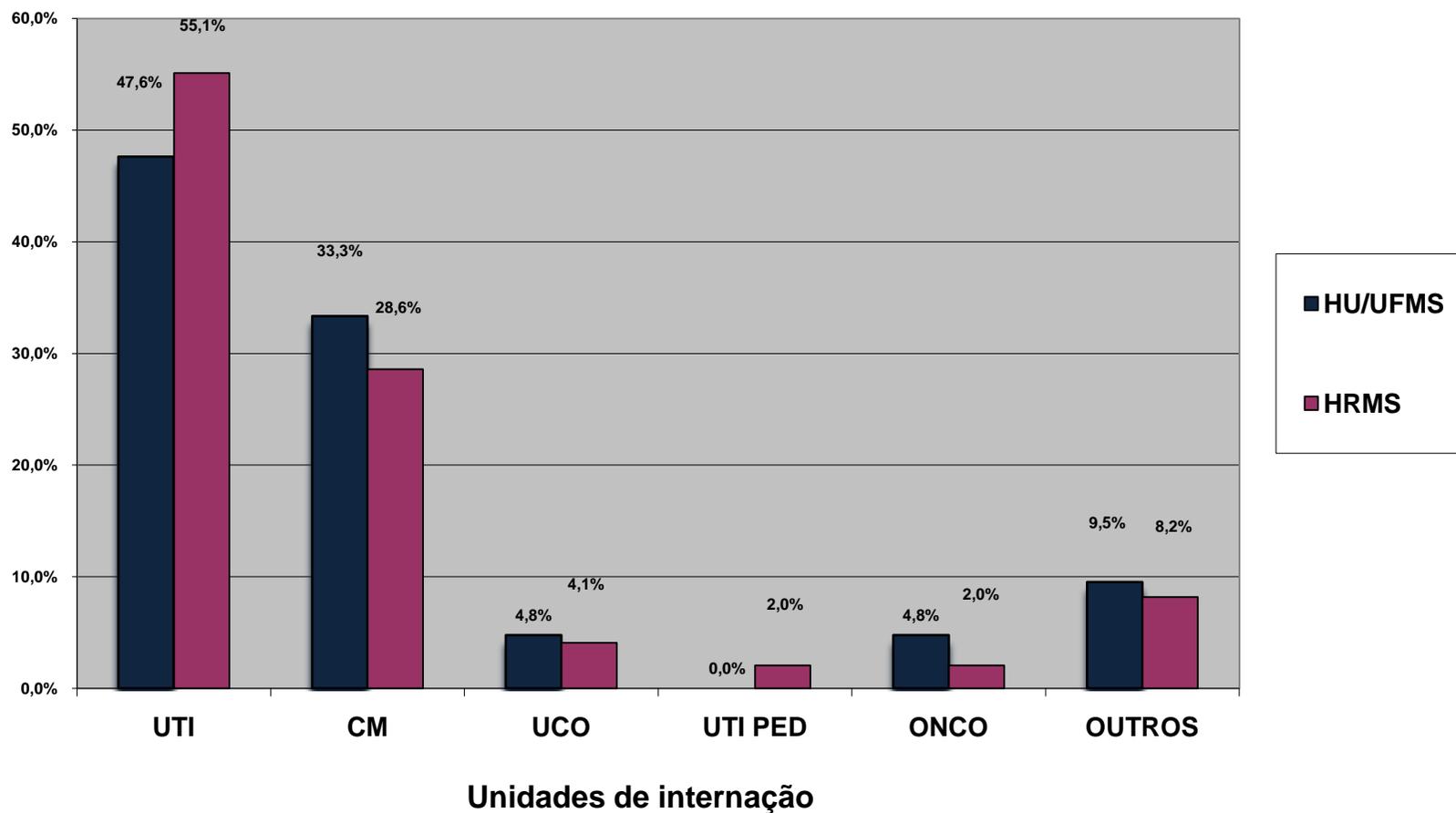


Figura 4 – Distribuição de 70 *P.aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem de acordo com unidade de internação isoladas entre 01/01/2007 a 30/06/2008 em dois hospitais públicos de Campo Grande – MS.

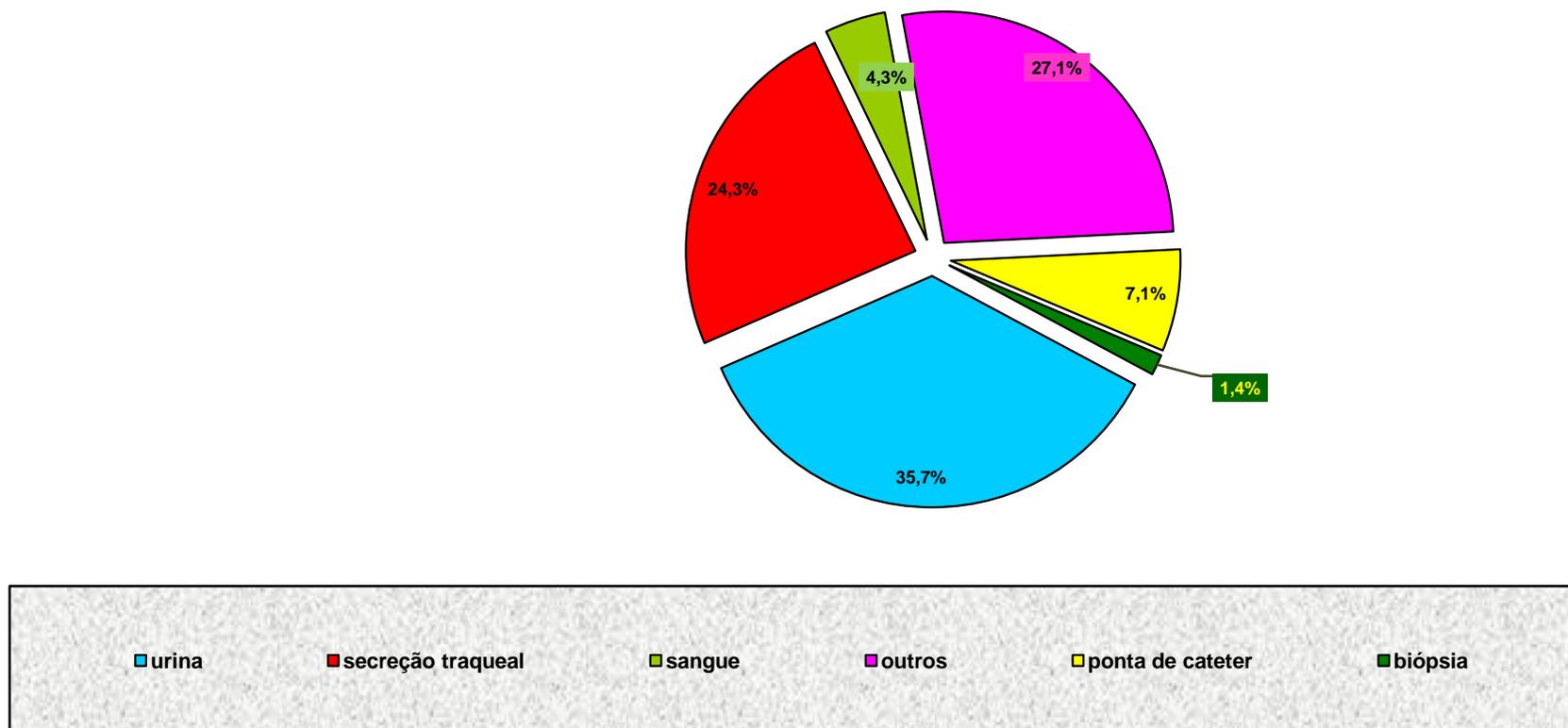


Figura 5 – Espécimes clínicas de onde foi isolada *P. aeruginosa* em pacientes internados em dois hospitais de Campo Grande de 01/01/2007 a 30/08/2009.

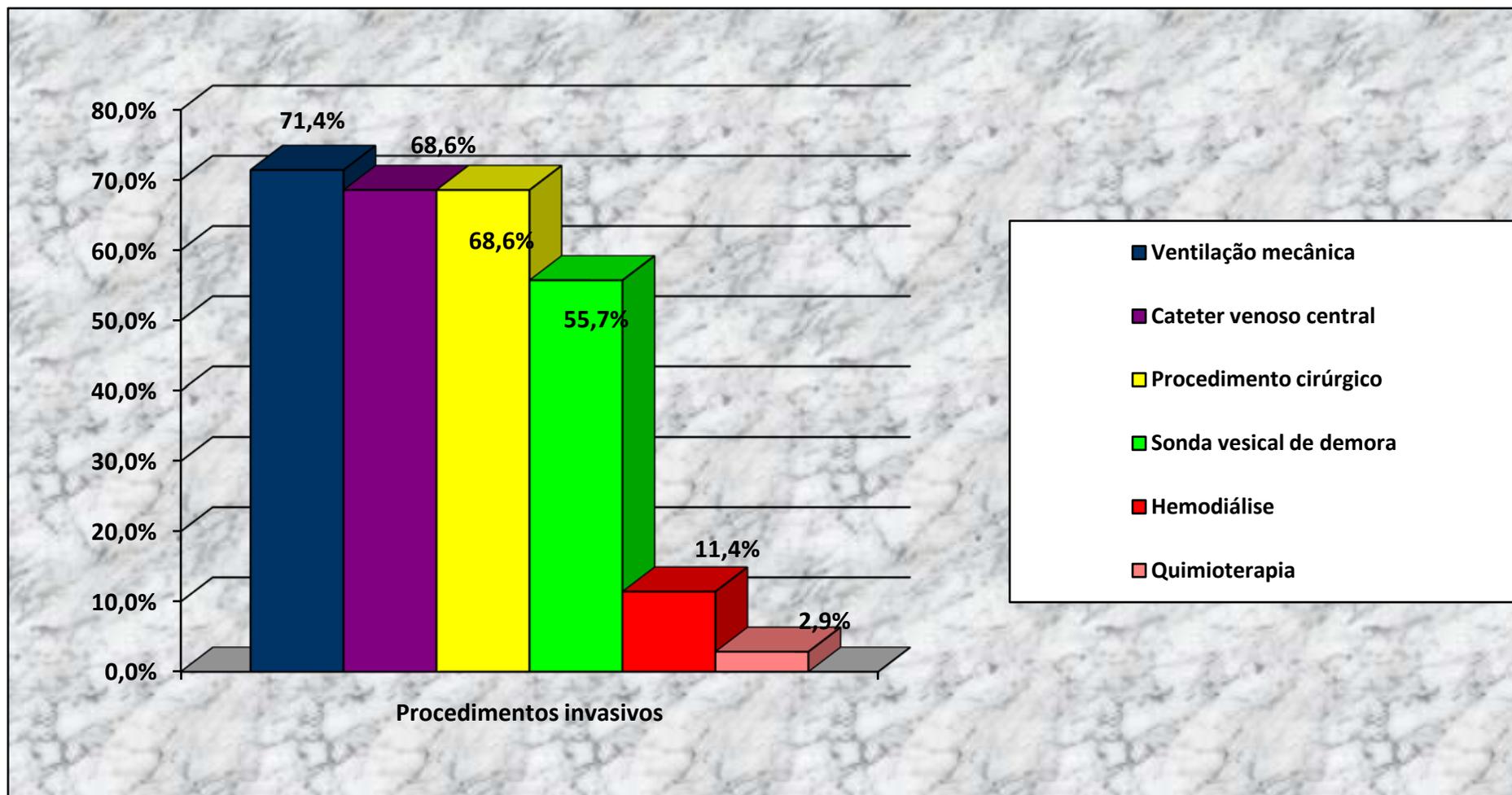


Figura 6 – Condições de risco que podem estar relacionadas à colonização/infecção por *P. aeruginosa* resistente a ceftazidima e/ou imipenem.

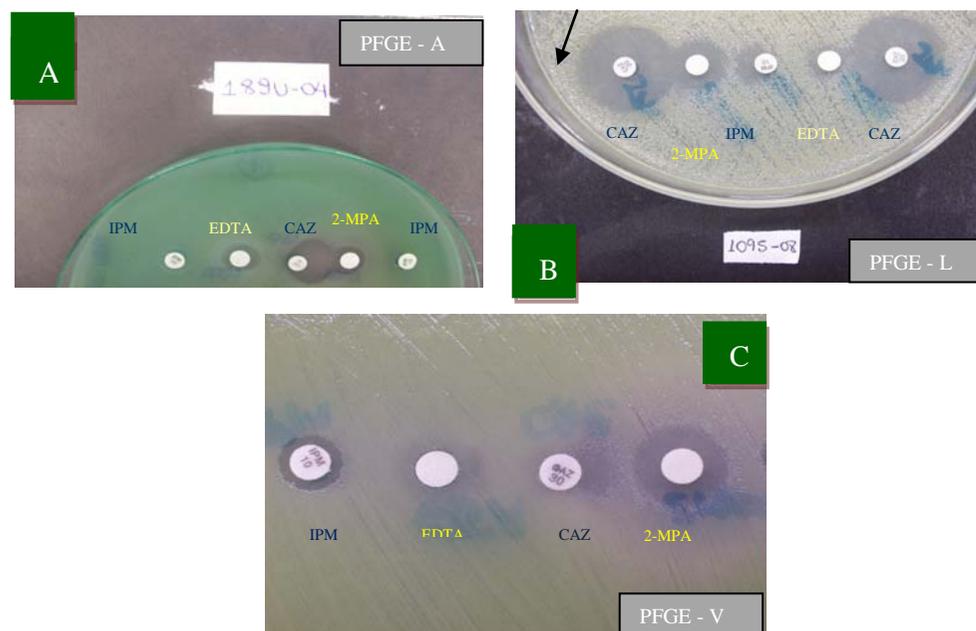


Figura 7 – Amostras positivas para produção de MBL no teste fenotípico de disco aproximação. A e C – Ceftazidima frente ao 2-MPA; B – ácido 2-MPA frente à imipenem.



Figura 8 – *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 (controle positivo) em teste fenotípico pelo método de disco-aproximação.

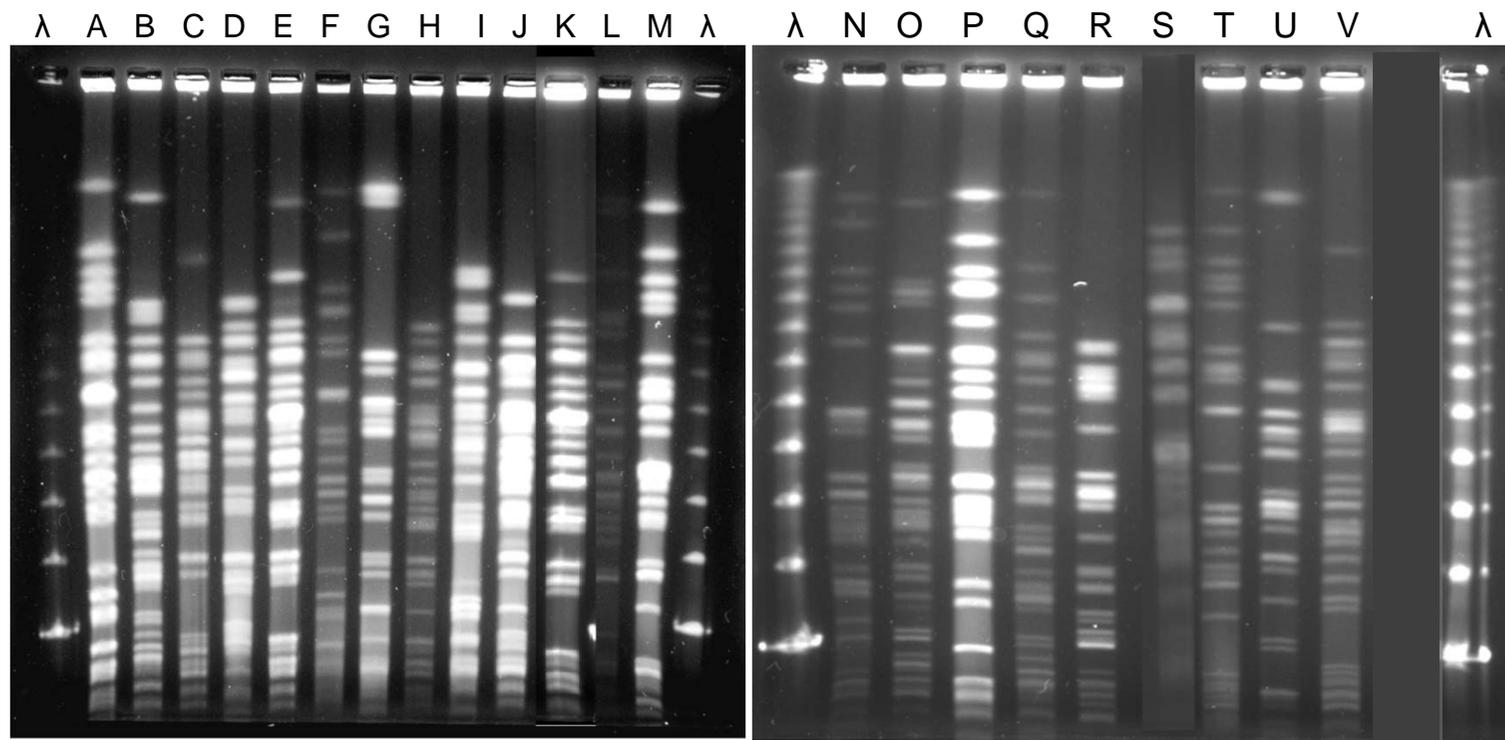


Figura 9 – Padrões gerados por PFGE de 70 *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados dois hospitais de Campo Grande entre 01/01/07 a 30/06/08. λ- marcador molecular (Kb), A (1689, 1694-96, 1701, 1709, 1712, 1713, 1718, 1726, 1753, 1754, 1770, 1775), B (1687, 1688, 1700, 1703, 1704, 1708, 1743, 1746, 1750, 1771, 1778), C (1699, 1742, 1749, 1766, 1768, 1769, 1773, 1776, 1781), D (1720, 1721, 1723, 1728, 1740, 1747), E (1690, 1722, 1765, 1782), F (1715, 1719, 1751), G (1691, 1731), H (1717), I (1725), J (1711, 1756, 1758, 1762), K (1752, 1772), L (1757), M (1697), N (1759), O (1698), P (1705), Q (1706, 1764), R (1779, 1780), S (1732), T (1716), U (1727), V (1730).

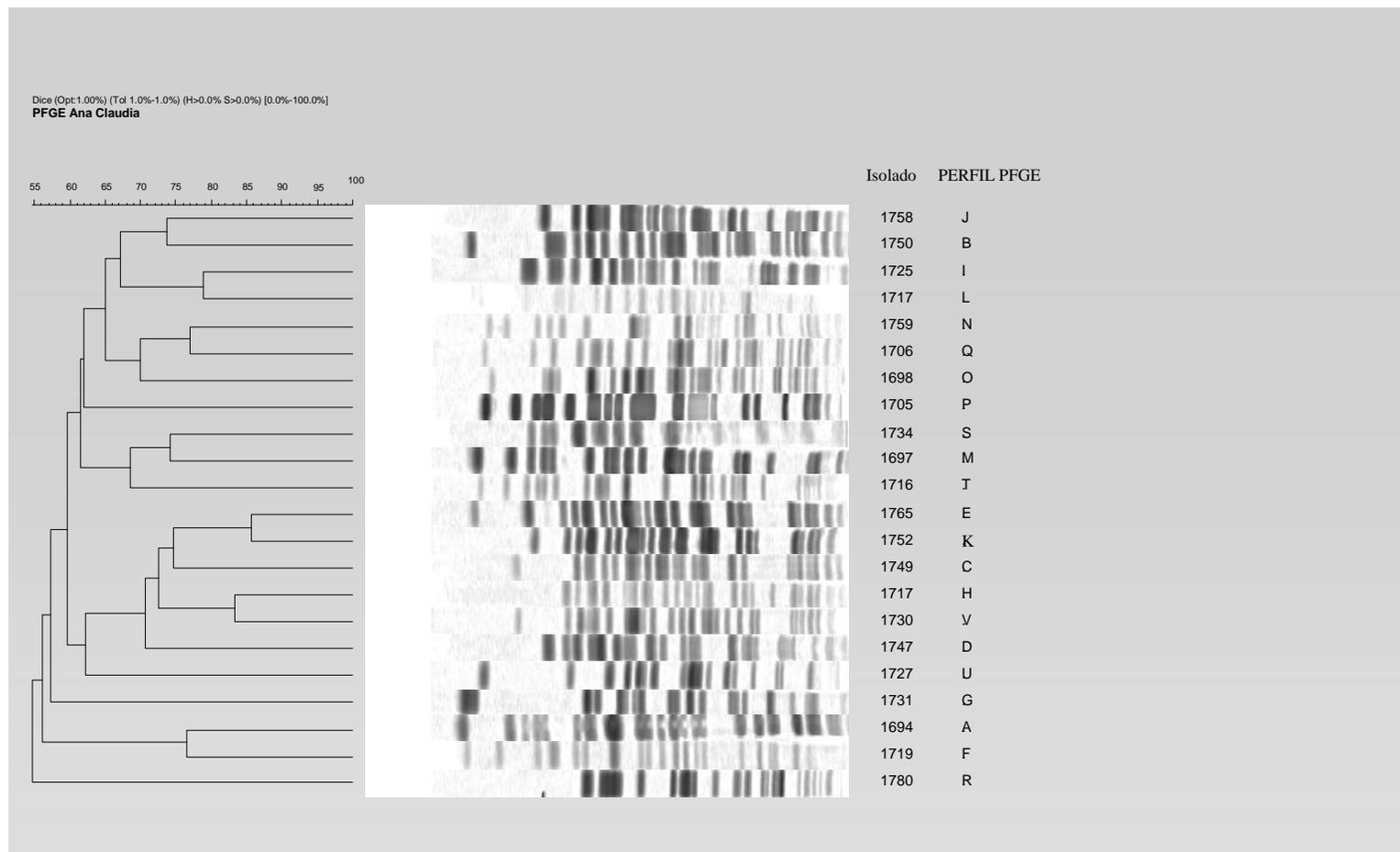


Figura 10 – Dendrograma de padrões gerados por PFGE de 70 cepas de *P. aeruginosa* isoladas em pacientes internados em dois hospitais de Campo Grande – MS de 01/01/07 a 30/06/08.

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas de 70 pacientes com *P. aeruginosa* internados no HU/UFMS e HRMS de 01/01/2007 a 30/06/2008.

	Variáveis	HRMS (n=49)	HU/UFMS (n=21)	p
	Média de idade (anos)	58,71 (±20)	57,50(±21,16)	
Tempo de internação	0-19 dias	14,3% (7)	14,3% (3)	0,71
	20-39 dias	22,5% (11)	47,6% (10)	0,07
	40-59 dias	32,6% (16)	13,8% (4)	0,18
	60-80 dias	16,3% (8)	9,5% (2)	0,71
	>80 dia	14,3% (7)	9,5% (2)	0,87
Comorbidades	Doença neurológica	16,3% (8)	23,8% (5)	0,69
	AVE	6,1 % (3)	9,5% (2)	1,0
	Alzheimer	4,0 % (2)	9,5% (2)	0,89
	Encefalopatia	4,0% (2)	4,3% (1)	0,89
	Edema cerebral	2,0% (1)	0,0% (0)	0,65
	Doença cardíaca	4,0 % (2)	9,5% (2)	0,73
	Doença pulmonar	18,4% (9)	9,5% (2)	0,56
	Tumor sólido	10,2% (5)	4,8% (1)	0,78
	Diabetes mellitus	20,4% (10)	14,3%(3)	0,79
	Insuficiência renal	24,4% (12)	0,0% (0)	0,03
	Cirrose hepática	2,0% (1)	4,8% (1)	0,89
	AIDS	2,0% (1)	4,8% (1)	0,89
Antimicrobiano prévio a pelo menos 5 dias	Quinolonas	22,4% (11)	14,3% (3)	0,65
	Aminoglicosídeos	6,0% (3)	14,3% (3)	0,50
	Cefalosporinas terceira e quarta geração	38,8% (19)	52,4% (11)	0,43
	Carbapenêmicos	49,0% (24)	42,8%(9)	0,83
	Piperacilina+tazobactam	32,5% (16)	0,0% (0)	0,008
	Clindamicina	16,3 (8)	28,6% (6)	0,39
	Vancomicina/teicoplanina	30,6% (15)	38,1% (8)	0,74

Tabela 4 – Perfil de resistência microbiana de amostras de *P. aeruginosa* isoladas em dois hospitais públicos de Campo Grande – MS entre 01/01/2007 a 30/06/2008.

Antimicrobiano	Resistência HRMS n = 49	Resistência HU/UFMS n= 21
Ceftazidima	75,5% (37)	81,0% (17)
Cefepime	93,9% (46)	95,2% (20)
Gentamicina	91,8% (45)	90,5% (19)
Amicacina	57,1% (28)	85,7% (18)
Aztreonam	91,8% (45)	76,2% (16)
Ciprofloxacina	71,4% (35)	100,0% (21)
Tazobactam+piperacilina	71,4% (35)	47,6% (10)
Imipenem	87,8% (43)	95,2% (20)
Meropenem	57,1% (28)	81,0% (17)
Polimixina B	0,0% (0)	0,0% (0)

Tabela 5 – Resistência microbiana e padrões de PFGE de *P.aeruginosa* isoladas no período 01/01/2007 a 30/06/2008 em hospitais públicos de Campo Grande - MS.

Perfil de resistência microbiana	Hosp	Perfil de PFGE	N. cepas
1. PPT/AMI/ATM/CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM/MER	HRMS	A/B/C/D/E/R/V	7/1/2/1/1/1/1
	HU/UFMS	A/C/K	4/2/1
2. PPT/AMI/ATM/CAZ/CIP/GEN/IPM/MER	HRMS	F	1
3. PPT/CPM/ATM/CAZ/CIP/GEN/IPM	HRMS	A	1
4. PPT/CPM/ATM/CAZ/CIP/GEN/IPM/MER	HRMS	A/B/R	1/1/1
5. PPT/AMI/ATM/CPM/CAZ/CIP/GEN	HRMS	B	1
6. CIP/GEN/IPM	HRMS	B	1
7. AMI/ATM/CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM/MER	HRMS	A	1
	HU/UFMS	E/C	1/1
8. PPT/AMI/ATM/CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM	HRMS	B/C	1/1
	HU/UFMS	Q	1
9. AMI/CPM/CIP/GEN/IPM	HRMS	B	1
10. CPM/GEN/CIP/IPM	HRMS	B	1
11. AMI, CPM, ATM, CIP, GEN, IPM, MER	HRMS	B/C	1/1
	HU/UFMS	C/J	2/1
12. ATM/CPM/GEN/IPM/MER	HRMS	S/T	1/1
13. PPT/ATM/CPM/CAZ/IPM/MER	HRMS	U	1
14. PPT/ATM/CPM/CAZ/IPM	HRMS	D/I	1/1
15. PPT/AMI/ATM/CPM/CAZ/GEN/IPM	HRMS	D	1
16. PPT/ ATM/CPM/CAZ/GEN/IPM	HRMS	D	2
17. PPT/ ATM/CPM/CAZ/GEN	HRMS	M/Q	1/1
18. PPT/ATM/CPM/CAZ/CIP/IPM/MER	HRMS	E	1
19. ATM/CPM/CAZ/GEN/ CIP/IPM/MER	HU/UFMS	B	1
20. ATM/CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM	HRMS	B	2
21. PPT/AMI/ATM/CPM/CIP/GEN/IPM/MER	HRMS	F/J/H/D	1/1/1/1
	HU/UFMS	J	1
22. AMI/CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM/MER	HU/UFMS	L	1
23. ATM/CPM/CAZ/GEN/IPM	HRMS	P	1
24. CPM/CAZ/CIP/IPM/MER	HU/UFMS	N	1
25. AMI/ATM/CPM/CAZ/GEN	HRMS	O	1
26. CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM/MER	HU/UFMS	F	1
27. ATM/CPM/CAZ/GEN	HRMS	G	1
28. AMI/CPM/CAZ/CIP/IPM	HU/UFMS	G	1
29. AMI/ATM/CAZ/CPM/CIP/GEN	HU/UFMS	K	1
30. PPT/AMI/CPM/CAZ/CIP/GEN/IPM	HU/UFMS	J	1
31. ATM/GEN/CAZ	HRMS	E	1

AMI – amicacina; ATM – aztreonam; CAZ – ceftazidima; CIP – ciprofloxacina; CPM – cefepime; GEN – gentamicina; IPM – imipenem; MER – meropenem; PPT – piperacilina + tazobactam; POL – polimixina B. HRMS – Hospital Regional de Mato Grosso do Sul; HU/UFMS – Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul.

Tabela 6 – Características clínicas e laboratoriais de pacientes colonizados ou infectados por *P. aeruginosa* multiresistentes pertencentes ao perfil “A” determinado por técnica de PFGE.

N° do isolado	Hospital	Data de coleta	Clínica	Comorbidades	Material	Idade (anos)	Tempo de internação (dias)	Sensibilidade	Evolução
1689	HRMS	09/01/07	UTI AD	Doença renal	U	20	120	POL	Óbito
1694	HRMS	21/02/07	UTI AD	Doença neurológica	ASTRA	32	120	POL	Alta
1695	HRMS	07/03/07	UTI AD	Doença neurológica	ASTRA	60	30	POL	Óbito
1718	HRMS	23/03/07	UTI AD	AIDS	PCAT	38	36	POL, MER	Óbito
1696	HRMS	17/04/07	UTI AD	Diabetes mellitus	U	80	60	POL	Óbito
1754	HU/UFMS	18/04/07	CM	Diabetes mellitus	U	82	60	POL	Óbito
1753	HU/UFMS	18/05/07	CM	Doença neurológica	ESC	58	31	POL	Alta
1770	HU/UFMS	26/06/07	UTI AD	Doença cardíaca	U	82	20	POL	Óbito
1701	HRMS	11/07/07	UCO	Doença respiratória	ASTRA	52	35	POL	Alta
1713	HRMS	01/10/07	CM	Osteomielite	SECULC	44	70	POL, AMI	Alta
1726	HRMS	08/11/07	UTI AD	Doença respiratória	ASTRA	78	59	POL	Alta
1712	HRMS	27/11/07	UTI AD	Doença hepática	SG	40	18	POL	Óbito
1775	HU/UFMS	29/12/07	CM	Doença neurológica	U	20	30	POL	Alta
1709	HRMS	24/01/08	UTI AD	Encefalopatia	SECULC	32	120	POL, PPT	Alta

ASTRA – aspirado traqueal; U – urina; SG – sangue ; PCAT – ponta de cateter; SECULC – secreção de úlcera; ESC – Escara; HRMS – Hospital Regional; HU – Hospital Universitário; UTI AD – Unidade de terapia intensiva de adultos; CM – Clínica médica.

Tabela 7 - Características clínicas e laboratoriais de pacientes colonizados ou infectados por *P. aeruginosa* multiresistentes pertencentes ao perfil “B” determinado por técnica de PFGE.

N° do isolado	Hospital	Coleta	Clínica	Comorbidade	Material	Idade (anos)	Tempo de internação (dias)	Sensibilidade	Evolução
1687	HRMS	02/01/07	UTI AD	Ca próstata	U	88	30	POL, PPT, AMI, ATM, CPM, CAZ, MER	Óbito
1688	HRMS	03/01/07	UTI AD	Diabetes mellitus	ASTRA	75	30	POL, PPT, ATM, CAZ, MER	Óbito
1778	HRMS	23/01/07	CM	-----	PCAT	68	35	POL, PPT, AMI, MER	Óbito
1700	HRMS	13/06/07	UTI AD	Doença respiratória	ASTRA	47	10	POL, PPT, AMI, ATM, CPM, CAZ, MER	Óbito
1703	HRMS	17/07/07	UTI AD	Diabetes mellitus	ASTRA	77	44	POL, IPM, MER	Óbito
1771	HU/UFMS	17/07/07	CM	-----	ASTRA	70	20	POL, PPT, AMI	Alta
1708	HRMS	14/08/07	CM	Doença renal	U/SG	75	45	POL	Óbito
1704	HRMS	17/12/07	CM	Doença renal	SECULC	75	45	POL, MER	Óbito
1746	HRMS	20/01/08	CM	Doença renal	U	71	50	POL, PPT, AMI, MER	Alta
1743	HRMS	20/03/08	CM	-----	ULSAC	25	15	POL, AMI	Alta
1750	HRMS	07/04/08	UTI AD	Diabetes mellitus	ASTRA	84	20	POL, PPT, CAZ	Óbito

ASTRA – aspirado traqueal; U – urina; SG – sangue ; PCAT – ponta de cateter; SECULC – secreção de úlcera; ULSAC – úlcera sacral; HRMS – Hospital Regional; HU – Hospital Universitário; UTI AD – Unidade de terapia intensiva de adultos; CM – Clínica médica; Ca - câncer.

6 DISCUSSÃO

P. aeruginosa é um agente oportunista e pode colonizar superfícies e mucosas de pacientes imunodebilitados. Dados da literatura reportam que a presença de comorbidades, tempo de internação prolongado e utilização de procedimentos invasivos como cateteres e aparelhos de ventilação mecânica tornam as UTI's, um local propício para a disseminação deste microrganismo (GALES *et al.*, 2003; LIBISH *et al.*, 2006; TSAKRIS *et al.*, 2006).

Na presente investigação, *P. aeruginosa* foi mais frequentemente isolada em pacientes de UTI de adultos seguida do setor de clínica médica. O que pode justificar esta prevalência é a maior quantidade de pacientes críticos internados na UTI e maior número de leitos no setor de clínica médica. Além disso, muitos pacientes internados na clínica médica estiveram anteriormente internados na UTI de adultos estabelecendo relação entre estes dois setores.

Consistente com esta observação, estudo realizado no Hospital Geral de Fortaleza reporta maior número de isolamentos de *P. aeruginosa* na UTI de adulto daquele hospital (TORRES *et al.*, 2006).

Corroborando com dados da literatura que relatam trato respiratório inferior e trato urinário como mais acometidos por *P. aeruginosa* (FURTADO *et al.*, 2006; PITOUT *et al.*, 2007; RAJA & SINGH, 2006; SADER *et al.*, 2001), neste estudo este microrganismo foi isolado principalmente de urina (35,7%) e aspirado traqueal (24,3%) .

Inúmeros são os fatores que contribuem para colonização e infecção por *P. aeruginosa* multiresistentes. Pacientes pediátricos, especialmente até um ano de idade, apresentam maior predisposição a este agente (CHANG *et al.*, 2003), principalmente quando possuem doença de base importante, como fibrose cística ou tumor (CHATZINIKOLAOU *et al.*, 2007; GILIO *et al.*, 2000; GRISARU-SOEN *et al.*, 2000). Em nossa casuística apenas um caso foi de paciente pediátrico, recém nascido com infecção perinatal que foi a óbito após 65 dias de internação.

Nossos resultados evidenciam a importância de infecções por *P. aeruginosa* em pacientes idosos, pois a média ($58,11 \pm 21,08$) e mediana ($63,50 \pm 44,25$ e 75) das idades dos pacientes foram próximas aos 60 anos. Algumas alterações físicas

ocorridas com a idade, aliadas a maior prevalência de doenças graves e subclínicas, principalmente após os 60 anos podem causar grande vulnerabilidade.

Entre as comorbidades mais observadas nesta investigação, doença neurológica, em especial o AVE foi mais freqüente em pacientes internados no HU/UFMS e com insuficiência renal e diabetes mellitus no HRMS. Doentes com comprometimento neurológico grave e acamados podem apresentar diversos fatores de risco para o desenvolvimento de infecções por *P. aeruginosa*, como internações prévias, tempo de internação prolongado e utilização de procedimentos invasivos (LISBOA *et al.*, 2007; LODISE *et al.*, 2007a).

Pacientes com insuficiência renal são geralmente submetidos a procedimentos de hemodiálise, conduta que aumenta a exposição a microrganismos patogênicos. Isto pode ter colaborado com maior isolamento de *P. aeruginosa* em pacientes com doenças renais no HRMS, hospital referência em nefrologia de Mato Grosso do Sul.

O isolamento deste microrganismo em pacientes com DM descrita neste estudo corrobora com relatos da literatura (VARAYIA *et al.*, 2008). O DM consiste em síndrome de etiologia múltipla que pode ser causa de incapacidade e morte prematura. Sabe-se que esta patologia também aumenta o risco de doenças cardiovasculares e neurológicas.

Doenças depressoras do sistema imunológico, tais como AIDS e tumores, também podem ser condições predisponentes de infecções oportunistas. Pacientes imunocomprometidos ficam extremamente propensos a infecções bacterianas com grave comprometimento da barreira cutâneo-mucosa e alto índice de mortalidade.

Hirakata *et al.* (2003) relataram quimioterapia e uso de corticóides como fatores associados a ocorrência de infecções por *P. aeruginosa*.

Estudo realizado por Zavascki & BARTH (2006b) com *P. aeruginosa* multiresistentes isoladas de pacientes com doenças crônicas, neoplasias, transplante e uso de imunossupressores revelou que insuficiência renal crônica foi o principal fator de risco relacionado a infecções por este agente.

O tempo de internação prolongado também pode estar relacionado com a ocorrência de IH's (LISBOA *et al.*, 2007). Na presente investigação, quando comparado período de internação dos pacientes dos perfis "A" e "B" (PFGE), os de perfil "A" permaneceram mais tempo internados e desenvolveram infecções mais

resistentes. A maioria dos doentes dos quais foram isoladas *Pseudomonas* com este perfil estiveram internados por mais de 30 dias (85,7%). Diante do exposto acredita-se que a maior permanência no hospital pode predispor infecções por microrganismos multiresistentes.

A utilização de procedimentos invasivos ocasiona quebra de barreira anatômica, carrega microrganismos e facilita infecções hospitalares (BRASIL, 2000). Nesta casuística, muitos pacientes dos quais foram isolados *P. aeruginosa* utilizaram procedimentos invasivos, principalmente uso de ventilação mecânica, sonda vesical de demora e cateter venoso central, semelhante a relatos da literatura (OBRITSCH *et al.*, 2004). Dados recentes referem que *P. aeruginosa* é o segundo patógeno mais importante em pneumonias associadas à ventilação (VAP) e o quarto em infecções urinárias associadas à sonda vesical de demora (HIDRON *et al.*, 2008).

A utilização indiscriminada ou inadequada de antimicrobianos parece favorecer a seleção de microrganismos multiresistentes (ALOUSH *et al.*, 2006). Dados da literatura descrevem relação significativa entre utilização prévia de antimicrobianos e desenvolvimento de multiresistência (LODISE *et al.*, 2007a). A exemplo disto, Paramythiotou *et al.* (2004) relataram uso prévio de drogas anti-pseudomonas como importante fator de risco para o desenvolvimento de cepas multiresistentes.

Reforçando esta idéia, estudo do tipo caso controle (FORTALEZA *et al.*, 2006), realizado em hospital de 400 leitos entre 1992 a 2002, também sugeriu que o uso prévio de antimicrobianos é um dos principais fatores de risco para infecções por *P. aeruginosa*. Além disto, os autores concluíram que período de internação e realização de hemodiálise foram estatisticamente significantes para desenvolvimento de resistência ao imipenem. Estes autores recomendam o uso limitado deste antibiótico no ambiente hospitalar.

Nesta casuística, os principais antimicrobianos utilizados antes do isolamento de *P. aeruginosa* foram carbapenêmicos em pacientes do HRMS e cefalosporinas, em especial o cefepime no HU/UFMS.

Apesar de todos os avanços tecnológicos para o diagnóstico e o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, esta continua sendo associada à altos índices de morbi-mortalidade (LODISE *et al.*, 2007b; ZAVASCKI, 2006c).

Zavascki *et al.* (2006a) descreveram 37,3% de óbito (30 dias) em pacientes com infecções por *P. aeruginosa*, sendo que cepas produtoras de MBL apresentaram taxas mais elevadas de mortalidade. Torna-se importante ressaltar que a gravidade das infecções e não adequação da terapia empírica parece ter contribuído para estes resultados.

Outro estudo, coorte prospectivo reporta que não houve associação entre produção de MBL e mortalidade de pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa*, porém fatores como exposição prévia a antibióticos e terapia empírica inadequada foram decisivos para a má evolução destes pacientes (ZAVASCKI *et al.*, 2006c). Pinheiro *et al.* (2008) reportaram 51,1% de mortalidade (30 dias) em pacientes com infecção por este agente, não encontrando relação estatisticamente significativa entre a presença de multiresistência e a evolução. Entre os pacientes estudados na presente investigação a ocorrência de óbito foi de 60,7% (30 dias), índice mais elevado provavelmente pela seleção de amostras mais resistentes.

Marra *et al.* (2006) reportaram que mortalidade em 14 dias após infecção de pacientes com bacteremias causadas por Psa-MBL foi de 71,4%. Uso de terapia inadequada nestas infecções também parece ter contribuído para alta mortalidade.

Estudo de coorte retrospectivo estimou efeito da terapia empírica na mortalidade de pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*. Segundo os pesquisadores, houve uma redução de 7% na mortalidade quando utilizada droga apropriada, reforçando a importância do emprego correto do antimicrobiano (OSIH *et al.*, 2007). Outra investigação conduzida com pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*, sugere que introdução de terapia apropriada dentro de dois dias após admissão hospitalar diminuiu significativamente o risco de mortalidade em 30 dias nestes pacientes (LODISE *et al.*, 2007b).

Resistência microbiana é um grande desafio enfrentado pelos serviços de saúde no Brasil e em todo mundo. Prolonga o tempo e o custo de internação dos pacientes dificultando também o tratamento destas infecções (GALES *et al.*, 2001; LOUREIRO *et al.*, 2002).

Apesar do surgimento de novos antimicrobianos, a exposição de *P. aeruginosa* a novas drogas fez com que este agente desenvolvesse mecanismos de resistência para a sua sobrevivência. O que se observa é que a capacidade das bactérias adquirirem resistência parece estar além do desenvolvimento de novos antibióticos.

Dados do estudo SENTRY entre 1997 a 1999 mostraram 8,2% de *P. aeruginosa* multiresistentes na América Latina (GALES *et al.*, 2001). Revisão sistemática realizada por Obritsch *et al.* (2004) revelou aumento de 10% nos padrões de multiresistência deste microrganismo de 1993 a 2002 em UTI's americanas. Da mesma forma, dados do sistema NNIS (1986 – 2003) revelaram aumento gradual de resistência de *P. aeruginosa* ao imipenem e ceftazidima nestas unidades (GAYNES & EDWARDS, 2005). A comparação destes dados entre diversos estudos tem sido prejudicada por falta de padronização na definição de multiresistência.

A frequência de *P. aeruginosa* multiresistentes, definida aqui como resistente a pelo menos seis antimicrobianos, e de isolados pan-resistentes foi muito próxima nos dois hospitais estudados. Isso pode ser explicado pela semelhança entre as duas instituições públicas que são hospitais terciários de alta complexidade e prestam atendimento público.

Em nossa investigação foi observada resistência acima de 60% a maioria dos antimicrobianos testados, valores mais elevados do que os descritos por outros autores (GALES *et al.*, 2001; ZAVASCKI *et al.*, 2006b). Estes resultados se devem provavelmente a inclusão somente de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima ou imipenem. Dados semelhantes aos encontrados neste estudo foram reportados por Varayia *et al.* (2008), que em isolados previamente resistentes a carbapenêmicos, descreveu 91,7% de resistência a ceftazidima, gentamicina e a ciprofloxacina, 81,7% a piperacilina+tazobactam e 77% amicacina. Agodi *et al.*(2006) também descreveram índices elevados de resistência microbiana em isolados de UTI's italianas.

Pitout *et al.* (2007) relataram índices de resistência menos preocupantes entre amostras hospitalares resistentes a imipenem no Canadá, tais como 34% de resistência a ceftazidima, 62% a gentamicina 49% a ciprofloxacina e 9% piperacilina+tazobactam.

Outros autores reportam taxas de resistência menos elevadas quando incluem todos os isolados de *P. aeruginosa*. Como exemplo, podemos citar o estudo SENTRY que relatou 40,5% de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima, 41,3% a ciprofloxacina, 29,2% piperacilina+tazobactam, 37,9% amicacina e 69,8% a imipenem (SADER *et al.*,2001).

Nas instituições hospitalares sulmatogrossenses avaliadas, cefepime e ceftazidima apresentaram resultados concordantes em 77,14% das amostras. Altos níveis de resistência a estas drogas podem indicar a produção de betalactamase de espectro estendido (classe A de Ambler). As maiores taxas de resistência foram frente ao cefepime (HRMS: 93,9%; HU/UFMS: 95,2%), gentamicina (HRMS: 91,8%; HU/UFMS: 90,5%) e imipenem (HRMS: 87,8%; HU/UFMS: 95,2%), sendo que a resistência a ceftazidima (HRMS: 75,5%; HU/UFMS: 81%) foi menor do que o cefepime nas duas instituições. Estes dados divergem de alguns relatos da literatura que demonstram sensibilidade maior ao cefepime quando comparado a ceftazidima (RODRIGUES *et al.*, 2006; VARAYIA *et al.*, 2008). Isto acontece porque o cefepime penetra mais rapidamente na membrana, sendo assim mais estável a β -lactamases AmpC. A hiperprodução desta β -lactamase é o principal mecanismo de resistência das cefalosporinas de amplo espectro (HANCOCK & BELLIDO, 1992; LIVERMORE, 1995). Na presente investigação, somente um isolado apresentou este comportamento.

A maior sensibilidade a ceftazidima, quando comparado ao cefepime, encontrada neste estudo pode ser efeito de um tipo de oxacilinase que tem como substrato preferencial o cefepime, tais como OXA-31 (AUBERT *et al.*, 2001). Esta divergência demonstra que não podemos extrapolar resultados de uma cefalosporina para outra, pois resultados "in vitro" dependerão dos mecanismos de resistência existentes.

A resistência a aztreonam, ciprofloxacina e em algumas ocasiões aos aminoglicosídeos pode ocorrer com a combinação de pelo menos dois mecanismos: alteração na permeabilidade de membrana e expressão de sistemas de efluxo. O principal sistema de efluxo para resistência a aminoglicosídeos e quinolonas é denominado MexX-MexY, o que poderia justificar altos níveis de resistência a estas drogas.

Nas instituições estudadas houve divergência entre susceptibilidade a alguns antimicrobianos. No HU/UFMS todas as amostras foram resistentes a ciprofloxacina e os níveis de resistência a meropenem e amicacina foram maiores quando comparados aos resultados do HRMS. De forma semelhante, houve maior taxa de resistência a tazobactam+piperacilina e aztreonam no HRMS. Estes dados

demonstram a importância de se conhecer os padrões de susceptibilidade em cada hospital.

Como os principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa* são os carbapenêmicos, cepas produtoras de carbapenemases, deixam os clínicos sem opção terapêutica. Dados nacionais relatam elevadas taxas de resistência à esta classe antimicrobiana. Sader *et al.* (2001) descrevem 30,2% de resistência frente ao imipenem. Estudo de LODISE *et al.*, 2007a relata 56% frente ao meropenem. Resultados bastante elevados de resistência a imipenem (38,3% a 42,3%) também foram reportados em Hospital do Rio de Janeiro (PELLEGRINO *et al.*, 2002). Desta forma, torna-se fundamental o monitoramento desta resistência.

No presente estudo, foram observados níveis mais altos de resistência aos carbapenêmicos devido ao critério de seleção de amostras (resistentes a ceftazidima ou imipenem). O imipenem e o meropenem apresentam mecanismo de ação semelhante, por meio de inibição da síntese da parede celular bacteriana, porém o meropenem pode-se apresentar mais ativo do que o imipenem contra *P. aeruginosa*, justificando assim 24,28% de amostras resistentes a imipenem e sensíveis a meropenem. Este fato pode ser explicado porque a modificação no canal de OprD, que promove a passagem de aminoácidos, pequenos peptídeos e antimicrobianos, confere vantagem seletiva para a passagem de antibióticos, como por exemplo meropenem (EPP *et al.*, 2001).

Na mesma linha de pensamento, a resistência aos dois carbapenêmicos, encontrada em 62,8% dos isolados pode acontecer quando há perda de porina OprD na parede bacteriana, geralmente combinado com superexpressão de bomba de efluxo (MexA-MexB-OprM/ MexE-MexF-OprN) ou produção de MBL (LIVERMORE, 1992).

Nenhuma cepa de *P. aeruginosa* foi resistente ao meropenem e sensível ao imipenem, o que sugere que o mecanismo de bomba de efluxo, promovido geralmente por MexAB-OprM não deve ser mecanismo de resistência prevalente entre as amostras testadas.

As drogas mais eficientes “in vitro” para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* nas instituições estudadas foram polimixina B, piperacilina+tazobactam no Hospital Universitário e meropenem no HRMS. Estes dados reforçam a

necessidade de se conhecer a epidemiologia destas infecções em cada instituição para conter potencial transmissão de pacientes infectados ou colonizados por *P. aeruginosa*.

A classe dos polipeptídeos pode significar a última opção terapêutica para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pan-resistentes. Tendo em vista relatos de diminuição na sensibilidade a estes antimicrobianos e de falha terapêutica, principalmente em pacientes com fibrose cística, torna-se importante o monitoramento de susceptibilidade e de resposta clínica a esta droga (GALES *et al.*, 2002; HOGARDT *et al.*, 2004).

Vinte e uma amostras (30%) de *P. aeruginosa* foram pan-resistentes e todos os isolados foram sensíveis a polimixina. Essa observação corrobora com dados de Pelegrino (2002) que relatou 40% de *P. aeruginosa* pan-resistentes no Rio de Janeiro. Outra investigação, em hospitais de Porto Alegre, reportou taxa de apenas 8% de pan-resistência (ZAVASCKI *et al.*, 2006d), sugerindo que características dos pacientes e da instituição interferem nestes resultados.

Entre as amostras pan-resistentes, treze foram isoladas em pacientes internados na UTI de adulto, o que reforça a importância de controlar infecções por este agente neste setor. A diversidade dos perfis de susceptibilidade encontrada demonstra grande variedade de *P. aeruginosa* e pode indicar a versatilidade deste microrganismo em adquirir mecanismos de resistência.

Dados da literatura mostram que para testar a produção de MBL, a técnica fenotípica com disco aproximação utilizando ácido 2-MPA frente à ceftazidima é mais eficiente do que o EDTA e outros agentes tiólicos (ARAKAWA *et al.*, 2000; PICÃO *et al.*, 2008). Neste estudo, utilizamos este método incluindo também o EDTA como substrato frente à imipenem (ARAKAWA *et al.*, 2000).

O aparecimento e a disseminação de MBL têm contribuído para altas taxas de resistência entre *P. aeruginosa* que eram pouco observadas até o surgimento dessa enzima (LEE *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2003).

Dados nacionais de investigação de MBL por métodos moleculares demonstram que a produção desta enzima por *P. aeruginosa* varia de acordo com a instituição e a região estudada. Como exemplo, podemos citar: 30,3% em São Paulo (MARRA *et al.*, 2006), 10% e 38,4% em hospitais do Rio Grande do Sul (GRAF *et al.*, 2008; ZAVASCKI *et al.*, 2006d) e 17,1% no Rio de Janeiro – RJ (FIGUEIREDO

et al., 2009). Figueiredo-Mendes *et al.* (2005) descreveram índice ainda mais elevado de produção de MBL (77,8%) entre *P. aeruginosa* previamente resistentes a carbapenêmicos nos hospitais de São Paulo e Brasília.

Alguns relatos brasileiros descreveram grande freqüência de *P. aeruginosa* produtoras de MBL. Sader *et al.* (2005b) estudando amostras da América Latina entre 2001 e 2003, testou isolados resistentes a imipenem, ceftazidima e meropenem por vários métodos, tais como disco aproximação, teste de hidrólise e PCR. Do total de 1186 isolados deste agente, 54% das amostras provenientes do estado de São Paulo foram positivas para produção de MBL também demonstrando grande diversidade clonal (IMP, VIM, SPM).

Nesta investigação três amostras (4,28%) de *P. aeruginosa* foram identificadas como produtoras de MBL nos testes fenotípicos. Isso concorda com resultados de Santos Filho (2002), que descreveram 2% de Psa-MBL em João Pessoa (PB) com a utilização deste teste e dados da Korea de 6,2% de Psa-MBL entre amostras resistentes a cabapenens (YONG *et al.*, 2006). Apesar da PCR ter sido realizada com iniciadores para detecção de SPM-1, VIM-1, VIM-2, IMP-1 e IMP-2, o resultado negativo desta técnica pode indicar que em nossa região este mecanismo de resistência ainda não é frequente.

Técnicas de PCR e PFGE tem se mostrado poderosas ferramentas para o esclarecimento de infecções e surtos hospitalares e controle de infecções por agentes multiresistentes (CORNAGLIA, *et al.*, 2000).

O número de padrões distintos (22) revelados por PFGE entre as *P. aeruginosa* isoladas demonstra grande heterogeneidade genética. O perfil de PFGE A foi o mais frequente, estando presente nos dois hospitais, principalmente na UTI do HRMS e na CM do HU/UFMS. Este perfil foi isolado em diferentes períodos, sugerindo que *Pseudomonas* com esse perfil possam ser endêmicos nos dois hospitais. Não houve nenhuma relação entre ocorrência deste perfil, espécime clínica isolada, e idade ou evolução do paciente.

Onze cepas (84,6%) com perfil A apresentaram pan-resistência, o que sugere que este clone tem característica multiresistente. Apesar do maior número de amostras, a pan-resistência não foi exclusiva deste genótipo, já que outros padrões ("B", "C", "D", "E", "K", "Q", "R", "V") também apresentaram a mesma peculiaridade. Da mesma forma o perfil genético "B" apresentou isolados multiresistentes e foi

observado nos mesmos setores onde o perfil “A” foi encontrado, o que reforça a disseminação de clones nas instituições.

Pseudomonas aeruginosa com perfis “A” e “B” foram encontradas em pacientes de diferentes setores do mesmo hospital, sugerindo disseminação intra-hospitalar. O rodízio de profissionais da saúde entre setores e a internação de pacientes em mais de um setor pode ter contribuído para estes resultados. Autores relatam que a disseminação intra-hospitalar parece ser um processo ativo e dinâmico que requer contínua vigilância (PITOUT *et al.*, 2007; ZAVASCKI *et al.*, 2006d).

A ocorrência de sete perfis idênticos (“A”, “B”, “C”, “E”, “F”, “G”, “Q”) em instituições diferentes sugere disseminação inter-hospitalar. Em Campo Grande é comum profissionais da saúde trabalharem em mais de um hospital e isso pode ter colaborado com a disseminação de genes de resistência entre as duas instituições.

Esta hipótese está de acordo com Lagatolla *et al.* (2006), que investigando amostras provenientes da Itália do ano de 2000 à 2002, demonstraram que um clone idêntico de VIM-1 circulou neste período em vários hospitais italianos. Do mesmo modo, seis tipos de PFGE idênticos em dois ou mais hospitais foram reportados por Sekiguchi *et al.* (2008) reforçando a possibilidade de disseminação inter-hospitalar.

Corroborando ainda com estes dados, Figueiredo-Mendes *et al.* (2005) sugeriram disseminação clonal inter-hospitalar entre amostras multiresistentes de *P. aeruginosa* provenientes de UTI de instituições em São Paulo e Brasília. Para estes autores a transferência de pacientes infectados, troca de equipamentos entre instituições e deslocamento de trabalhadores em saúde poderiam ser hipóteses para explicar esta disseminação.

A análise de similaridade genética no dendrograma não demonstrou cepas intimamente relacionadas, porém os padrões “E” e “K” apresentaram 85% de similaridade (parcialmente relacionadas). Os demais isolados formaram grupos distintos com grande polimorfismo, concluindo que há uma grande variabilidade genética entre *P. aeruginosa* nos dois hospitais.

Considerando que infecções correspondem ao desequilíbrio no sistema parasita-hospedeiro-ambiente, as conquistas no campo da microbiologia tornaram possível seu controle. A identificação precoce de patógenos e a análise da resistência de microrganismos aos antimicrobianos constituem importante

ferramenta para auxiliar os clínicos no tratamento de infecções. Dessa forma, conhecer o perfil de susceptibilidade aos antibióticos de *P. aeruginosa* pode nortear a escolha de terapia empírica. Além disso o conhecimento dos mecanismos de resistência deste agente presentes em cada instituição é de extrema importância para conter a disseminação de microrganismos multiresistentes reduzindo morbimortalidade de pacientes internados em nossos hospitais.

7 CONCLUSÕES

- a) De modo geral, os índices de *P. aeruginosa* multiresistentes e pan-resistentes nos dois hospitais estudados são semelhantes entre si e próximos a dados nacionais. Entre as amostras resistentes a ceftazidima ou imipenem, os índices de resistência aos antimicrobianos são bastante elevados. Todos os isolados são sensíveis a polimixina B.

- b) A UTI de adultos e CM são os setores com maior número de isolados de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima ou imipenem e este microrganismo é mais isolado em espécimes do trato urinário e trato respiratório.

- c) A instituições estudadas, *P. aeruginosa* resistente a ceftazidima ou imipenem foi isolada com maior frequência de pacientes com idade de 60 anos, portadores de doenças crônicas, submetidos a procedimentos invasivos e com mais de 20 dias de internação. As principais comorbidades para ocorrência de infecções por este agente são doenças neurológicas no HU/UFMS e doenças renais no HRMS.

- d) O perfil de susceptibilidade a cada antimicrobiano é variável nas duas instituições. Os antimicrobianos com menores índices de resistência são meropenem no HRMS e tazobactam+piperacilina no HU/UFMS. Entre as cepas de *P. aeruginosa* selecionadas há maior sensibilidade a ceftazidima do que o cefepime. O perfil de resistência destas instituições pode ser útil para avaliar a pressão antimicrobiana seletiva

em cada hospital e pode ser critério de comparação com outras regiões do país.

- e) Nesta casuística não foram encontradas cepas de *P. aeruginosa* produtoras de MBL, por meio de técnica de PCR, porém estudos com amostragem maior devem ser realizados, sendo que esta é a primeira investigação deste mecanismo de resistência na região.

- f) Grande diversidade clonal foi observada entre as *P. aeruginosa* estudadas, os perfis A e B de PFGE são os mais prevalentes nos dois hospitais e apresentam multiresistência. A ocorrência de perfis idênticos de PFGE em setores e instituições distintas com resistência elevada reforça a importância de se controlar a disseminação intra-hospitalar e inter-hospitalar deste patógeno.

- g) Após divulgação dos resultados para o corpo clínico e para Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, sugere-se que o monitoramento contínuo da resistência bacteriana e do uso de antimicrobianos possa minimizar a disseminação de *P. aeruginosa* e de seus genes de resistência. Estudos mais amplos devem ser realizados para verificar quais mecanismos de resistência são prevalentes nestes microrganismos no estado de Mato Grosso do Sul.

8 REFERÊNCIAS

Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med.* 2007; 33(7):1155-61.

Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1):43-8.

Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. *J Pediatr.* 2004; 80(5):371-9.

Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991;276 (1):269-70.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):40-3.

Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(6):1615-20.

*Normas das referências de acordo com estilo Vancouver [acesso em 20/02/2010].

Disponível em: <http://www.bu.ufsc.br/ccsm/vancouver.html>

Bert F, Branger C, Lambert-zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J. Antimicrob Chemother. 2002; 50(1): 11-8.

Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006;43 Suppl 2:S49-56.

Brasil. Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 13 de maio de 1998.

Brasil. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar [on line]. In: ANVISA : Agência Nacional de Vigilância Sanitária [acesso em 28/06/2008]. 2000. Disponível em : <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoB.pdf>

Brasil. Procedimentos laboratoriais da requisição do exame à análise microbiológica [on line]. In: ANVISA : Agência Nacional de Vigilância Sanitária [acesso em 28/06/2008]. 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_3_2004.pdf

Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y, Chen M. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Hosp Infect. 2004; 57 (2):112-8.

Carvalho KR. Detecção de β -lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes internados em hospitais de São Luís do Maranhão [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz; 2004.

Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques Ede A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist.* 2006;12 (2):103-8.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 48: 4654-61, 2004.

Castanheira M, Debbia E, Marchese A, Jones RN. Emergence of a plasmid mediated *bla* (VIM-1) in *Citrobacter koseri*: report from the SENTRY Antimicrob Surveillance Program (Italy). *J Chemother.* 2009; 21(1):98-100.

Chambers HF, Miller RT, Newman MD. Right-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug abusers: two-week combination therapy. *Ann Intern Med.* 1988; 109 (8):619-24.

Chang MR, Carvalho, NCP, Oliveira ALL, Moncada PMF, Moraes BA, Asensi MD. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7(2)149-160.

Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Rolston KV, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: Retrospective analysis of 245 episodes. *Arch Intern Med.* 2000; 160(4): 501-9.

Choy MH, Stapleton F, Willcox MD, Zhu H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. *J Med Microbiol.* 2008; 57(12):1539-46.

Claeys G, Verschraegen G, de Baere T, Vaneechoutte M. PER-1 beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(6):924-5.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2006. M100-S16.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2007. M100-S17.

Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenêmico-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis.* 2000;31(5):1119-25.

Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. Etiology of urinary tract infections and antimicrobial susceptibility of urinary pathogens. *Acta Med Port.* 2007;20(6):543-50.

de Freitas AL, Barth AL. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. Braz J Infect Dis. 2002;6(1):1-7.

Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J. 2000;16 (4):749-67.

Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, Quentin C. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. 2001; 39:2072-78.

Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C. First Organisms with Acquired Metallo-beta-Lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) Reported in Austria. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 2221-2

Epp SF, Kohler T, Plesiat P, Michea-Hamzhepour M, Frey J, Pechere JC. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1780–7.

Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. J Hosp Infect. 2006; 64(1):7-15.

Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu. 2000; p. 215-65.

Figueiredo DQ, Castro LFS., Santos KRN, Teixeira LM, Mondino SSB. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. J Bras Patol Med Lab. 2009; 45(3): 177-84.

Figueiredo-Mendes, CM. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. Enferm Infec Microbiol Clin. 2005; 23: 402 – 5.

Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR, Pryor ER, McGowan JE, Jr., Archibald LK, et al. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrob Resistance Epidemiology (ICARE) hospitals. Clin Infect Dis. 1999; 29(2):245-52.

Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis. 2005;41 Suppl 4:S276-8.

Fortaleza CM, Freire MP, Filho Dde C, de Carvalho Ramos M. Risk factors for recovery of imipenem- or ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among patients admitted to a teaching hospital in Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27(9):901-6.

Furtado GH, Martins ST, Machado AM, Wey SB, Medeiros EA. Clinical culture surveillance of carbapenêmico-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in a teaching hospital in Sao Paulo, Brazil: a 7-year study. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27(11): 1270-3.

Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:183-90.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmico-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(4):699-702.

Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL. Occurrence of blaSPM-1 and blaIMP-1 genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Brazil J of Microbiol.* 2007; 38: 108-9.

Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(6):848-54.

Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, et al. Nosocomial outbreak of carbapenêmico-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):255-8.

Gilio AE, Stape A, Pereira CR, Cardoso MF, Silva CV, Troster EJ, et al. Risk factors for nosocomial infections in a critically ill pediatric population: a 25-month prospective cohort study. *Inf Control Hosp Epidemiol* 2000; 21:340-2.

Gillardi GL. Medical Microbiology. In: Sabath. L.D. *Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes, and their treatment.* Vienna, Hans Huber Publishers, 1990.

Giske CG, Rylander M, Kronvall G. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(9):3034-5.

Gonçalves DC, Lima AB, Leao LS, Filho JR, Pimenta FC, Vieira JD. Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Goiania, State of Goias. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(4):411-4.

Goodman LS, Gilman A, Burton LL, Lazo JS. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* 11.ed.Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006.

Graf T, Fuentefria DB, Corcao G. Occurrence of multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase $\text{bla}_{\text{SPM-1}}$ in clinical samples. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(3):306-8.

Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Keller N, Berger H, Passwell JH, Barzilai A. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children: analysis of trends in prevalence, antibiotic resistance and prognostic factors. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19(10):959-63.

Gupta, V. Metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008; 17(2):131-43.

Hancock R.E.e Bellido F - Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother,* 29 (Suppl A):1-6, 1992.

Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis. 1998; 27 Suppl 1:S93-9.

Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, et al. Functional analysis of the active site of a metallo-beta-lactamase proliferating in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(9):2304-9.

Haussler S, Ziegler I, Lottel A, Gotz F, Rohde M, Wehmhohner D, Saravanamuthu S, Tummler B, Steinmetz I. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. J Med Microbiol. 2003; 52: 295-301.

Head NE, Yu H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. Infect Immun. 2004; 72(1):133-44.

John E. Heinze and Frank Yackovich. Washing with contaminated bar soap is unlikely to transfer bacteria. Epidemiology and Infection. 1988; 101: 135-142

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollack DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29(11):996-1011.

Hirakata Y; Izumikawa K; Yamaguchi T; Takemura H; Tanaka H; Yoshida R et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant

gram-negative rods carrying the metallo beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42:2006-11.

Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 2003;37(1):26-32.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997; 350(9092):1670-3.

Hogardt M, Schmoldt S, Gotzfried M, Adler K, Heesemann J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 1057–61.

Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:710-12

Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *J Microbiol.* 2006;44(4):423-31.

Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenêmicoase & metallo-beta- lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res.* 2005; 121(6):780-3.

Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(2):88-91.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(11):4485-91.

Li XZ, Zhang L, Poole K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45(4):433-6.

Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minarovits J, Knausz M, Watine J, et al. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* sp isolates in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(12):4220-3.

Lisboa T, Faria M, Hoher J A, Borges LAA, Gómez J, Schifelhain L et al . The prevalence of nosocomial infection in Intensive Care Units in the State of Rio Grande do Sul *Rev Bras Ter Intensive*. 2007 ; 19(4): 414-420.

Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; 36(9):2046-8.

Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):557-84.

Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3(5):489-95.

Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(3):247-50.

Livermore DM. Doripenem: antimicrobial profile and clinical potential. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63(4):455-8.

Lodise TP, Miller CD, Graves J, Furuno JP, McGregor JC, Lomaestro B, et al. Clinical prediction tool to identify patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk for multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007a;51(2):417-22.

Lodise TP, Jr., Patel N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007b;51(10):3510-5.

Loureiro MM, de Moraes BA, Mendonca VL, Quadra MR, Pinheiro GS, Asensi MD. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(3):387-94.

Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(5):1865-70.

Magalhães V, Lins AK, Magalhães M. Metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2005; 36(2): 123-125.

Marra AR, Pereira CA, Gales AC, Menezes LC, Cal RG, de Souza JM, et al. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):388-90.

McPhee JB, Tamber S, Bains M, Maier E, Gellatly S, Lo A, et al. The major outer membrane protein OprG of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to cytotoxicity and forms an anaerobically regulated, cation-selective channel. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 ; 296(2): 241-7.

Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2009; 201:71-115.

Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(1):44-51.

Merino LA. *Pseudomonas aeruginosa*: a bacterium with multiple personalities. *Rev Argent Microbiol.* 2007; 39(3):143.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(4):727-37.

Mitsugui CS, Tognim MC, Bronharo CM, Floristher E, Garcia LB. Efeito antimicrobiano in vitro da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Ciênc Cuid. Saúde. 2008; 7(1):76-81.

Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrob Surveillance Program (1998-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57(1):7-13.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

Naija W, Mateo J, Raskine L, Timsit JF, Lukaszewicz AC, George B, et al. Case report: greater meningeal inflammation in lumbar than in ventricular region in human bacterial meningitis. Crit Care. 2004; 8(6):R491-4.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67(4):593-656.

Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(5):962-9.

Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 1998; 42(2):128-31.

Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12):4606-10.

Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, et al. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J Microbiol Methods.* 2003; 54(3):411-8.

Osih RB, McGregor JC, Rich SE, Moore AC, Furuno JP, Perencevich EN, et al. Impact of empiric antibiotic therapy on outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(3):839-44.

Palleroni NJ, Ballard RW, Ralston E, Doudoroff M. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J Bacteriol.* 1972;110(1):1-11.

Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, et al. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(5):670-7.

Pellegrino F L. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7): 2420-24.

Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus

combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(6):2028-37.

Pinheiro MR, Lacerda HR, Melo RG, Maciel MA. *Pseudomonas aeruginosa* infections: factors relating to mortality with emphasis on resistance pattern and antimicrobial treatment. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12(6):509-15.

Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(2):294-8.

Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(4):891-7.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(9):2598-603.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2007;2(5):501-12.

Poirel L, Yakupogullari Y, Kizirgil A, Dogukan M, Nordmann P. VIM-5 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* from Turkey. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(3):287.

Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. Principles and Practices of Infectious Diseases. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2000: 2310-2335.

Poletto KQ, Reis C. Antimicrobial susceptibility of the uropathogens in out patients in Goiania City, Goias State. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(5):416-20.

Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2005;56(1):20-51.

Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):565-9.

Raja NS, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. J Microbiol Immunol Infect. 2007;40(1):45-9.

Rang HP, Dale MM; Ritter JM. Farmacologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

Rao S, Grigg J. New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 2006;91(9):786-8.

Rodriguez CN, Rodriguez-Morales AJ, Garcia A, Pastran B, Meijomil P. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surgical infections in a 7-year period at a general hospital in Venezuela. *Surg Infect (Larchmt)*. 2006;7(3):269-73.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo, Atheneu, 2005.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*. 2001;5(4):200-14.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents*. 2005a; 25(1):57-61.

Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2005b; 11(1):73-6.

Santos Filho L. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J Bras Patol Med Lab*. 2002; 38: 79-84.

Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Fujino T, Kobayashi I, Morita K, Kikuchi Y, Kuratsuji T, Kirikae T. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain That Caused

an Outbreak in a Neurosurgery Ward and Its *aac(6')*-Iae Gene Cassette Encoding a Novel Aminoglycoside Acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005 49: 3734-3742.

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(11):4194-7.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(12):2909-13.

Silva N, Radhouani H, Goncalves A, Araujo C, Rodrigues J, Igrejas G, et al. In vitro activity of ceftobiprole against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(4):801-3

Sirvent E, Ruiz M, Rodriguez JC, Royo G. Study investigating the activity of several fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* using the mutant prevention concentration. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2006; 24(10):603-7.

Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3648-63.

Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. The aerobic pseudomonas: a taxonomic study. *J Gen Microbiol.* 1966; 43(2):159-271.

Stanzani M, Tumietto F, Giannini MB, Bianchi G, Nanetti A, Vianelli N, et al. Successful treatment of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis after allogeneic bone marrow transplantation with a combination of colistin and tigecycline. J Med Microbiol. 2007; 56(12):1692-5.

Sunenshine R, Schultz M, Lawrence MG, Shin S, Jensen B, Zubairi S, et al. An outbreak of postoperative gram-negative bacterial endophthalmitis associated with contaminated trypan blue ophthalmic solution. Clin Infect Dis. 2009; 48(11):1580-3.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33:2233-39.

Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, et al. Carbapenêmico resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis. 2006; 12(8):1209-13.

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(5): 673-9.

Torres M, Blanca M. The contribution of major and minor determinants from benzylpenicillin to the diagnosis of immediate allergy to β -lactams. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006; 117:(1)220-221.

Trabulsi LR. Microbiologia, 5ª ed. Atheneu . 2008; cap X. 219-27.

Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J Clin Microbiol. 2000; 38(3):1290-2.

Turrini RN, Santo AH. Nosocomial infection and multiple causes of death. J Pediatr Rio J. 2002; 78(6):485-90.

Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988;1(8575-6):57-8.

Varaiya A, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in diabetes and cancer patients. Indian J Pathol Microbiol. 2008; 51(2):200-3.

Walsh TR, Neville WA, Haran MH, Tolson D, Payne DJ, Bateson JH, et al. Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-beta-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(2):436-9.

Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. Curr Opin Chem Biol. 1999;3(5):614-22. Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 2006;57(6):1261-2.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(1):147-51.

Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su IJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1438-42.

Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2224-8.

Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49(1):5-11.

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3798-801.

Zanetti G, Bally F, Greub G, Garbino J, Kinge T, Lew D, et al. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3442-7.

Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro AL, Goncalves AL, Goldani LZ. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care.* 2006a; 10(4):114.

Zavascki AP, Barth AL, Gaspareto PB, Goncalves AL, Moro AL, Fernandes JF, et al. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. J Antimicrob Chemother. 2006b;58(4):882-5.

Zavascki AP, Barth AL, Goncalves AL, Moro AL, Fernandes JF, Martins AF, et al. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Antimicrob Chemother. 2006c;58(2):387-92.

Zavascki AP, Goldani LZ, Goncalves AL, Martins AF, Barth AL. High prevalence of metallo-beta-lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. Epidemiol Infect. 2006d;135(2):343-5.

ANEXO A – Carta de autorização do Comitê de Pesquisa e ética do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul.

Campo Grande, 04 de maio de 2009.

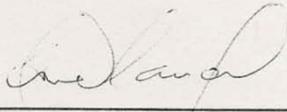
Solicitação

Eu, Ana Claudia Souza Rodrigues, CRF 1553, matrícula 15015341/FUNSAU/MS, mestranda do programa de “Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste”, cedida temporariamente para Casa da Saúde, venho por meio desta solicitar autorização para utilizar as cepas de microrganismos multiresistentes armazenados pela Microbiologia no banco de cepas do setor.

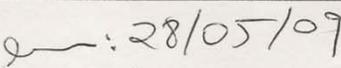
Após a autorização da antiga diretoria clínica, houve a utilização dos dados para apresentação de trabalhos em diversos congressos e em breve o artigo “Rastreamento de P.aeruginosa produtoras de Metallo-beta-lactamase em UTI’s de dois hospitais brasileiros” será enviado para publicação. Esse material ainda está sendo utilizado para a conclusão de minha dissertação de Mestrado que deve acontecer até o final do ano.

Como houve a extensão do projeto até dezembro de 2010, solicito que possamos continuar a parceria até essa data, reafirmando que :

- O Nome do Hospital Regional, bem como o dos pacientes serão preservados;
- Os resultados do estudo da resistência bacteriana serão transmitidos a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH);
- Todo projeto passará pelo comitê de ética do Hospital Universitário;
- Juntamente com a orientadora Marilene R. Chang, estarei a disposição da CCIH do Hospital, bem como do setor de Microbiologia para auxiliar na investigação de surtos e bactérias com padrões anormais de resistência, como já tem ocorrido.



Ana Claudia Souza Rodrigues
CRF 1553/97
Farmacêutica Bioquímica

: 28/05/09


ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1437 da Pesquisadora Marilene Rodrigues Chang intitulado "Avaliação do perfil de resistência e produção de Metallo-beta-lactamase por Pseudomonas aeruginosa de origem hospitalar", foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 06 de agosto de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 06 de agosto de 2009.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187