

LUCIANA LOBIANCO FERREIRA

ESTRUTURA CLONAL E MULTIRRESISTÊNCIA EM
Pseudomonas aeruginosa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
2005

ESTRUTURA CLONAL E MULTIRRESISTÊNCIA EM
Pseudomonas aeruginosa

Luciana Lobianco Ferreira

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Prof^a Dra Marise Dutra Asensi
Laboratório de Enterobactérias
Departamento de Bacteriologia
IOC – Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
Outubro de 2005

ESTRUTURA CLONAL E MULTIRRESISTÊNCIA

EM *Pseudomonas aeruginosa*

Luciana Lobianco Ferreira

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. _____ (IOC/FIOCRUZ).
(Dra. Marise Dutra Asensi)

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ).
(Dra. Maria Helena Simões Villas Boas)

Prof. _____ (UFRRJ).
(Dra. Norma dos Santos Lázaro)

Orientador: _____ (IOC/FIOCRUZ).
(Dra. Marise Dutra Asensi)

Rio de Janeiro

2005

Ferreira, Luciana Lobianco

Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*./ Luciana Lobianco Ferreira. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2005.

xv, 99p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2005. Orientador: Marise Dutra Asensi.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. Metallo- β -lactamase. 4. Epidemiologia molecular.

- I. Fundação Oswaldo Cruz - INCQS
- II. Título

A MEU MARIDO, JOSÉ FÁBIO
A MEUS PAIS, ANA LUCIA E ROGÉRIO
A MINHA AVÓ, LUCIANA
A MEU IRMÃO, BRUNO

**“A FALSA CIÊNCIA CRIA OS
ATEUS; A VERDADEIRA FAZ
O HOMEM PROSTRAR-SE
DIANTE DA DIVINDADE”.**

VOLTAIRE

AGRADECIMENTOS

A Deus que por toda minha vida esteve presente, me dando saúde e força para tornar real meus ideais;

A minha mãe que incondicionalmente me apoiou, me incentivou e contribuiu para que mais esse sonho se concretizasse;

A meu pai que me mostrou o caminho do amor e da dignidade;

A meu marido, que me incentivou desde o início e me apoiou neste momento tão importante da minha vida;

A minha família e amigos pelo carinho e atenção;

A Dra. Marise Dutra Asensi pela confiança e orientação que tornaram possível a realização deste trabalho;

A Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues pelo incentivo durante a realização do trabalho;

A amiga Maiara dos Santos de Araújo, pela contribuição na realização do trabalho e pelo companheirismo;

A toda equipe do Laboratório de Enterobactérias, por toda ajuda prestada e pela boa vontade;

Aos amigos e professores do curso de pós-graduação em Vigilância Sanitária, do INCQS-FIOCRUZ, que de alguma forma contribuíram para a minha formação;

A Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas, que desde o início de todo este processo se mostrou solícita para qualquer ajuda;

A Dra. Marisa Zenaide Ribeiro Gomes, pela colaboração interinstitucional;

A Dra. Marilene Rodrigues Chang, pela colaboração interinstitucional;

A Dra. Maria da Penha, pela colaboração interinstitucional;

A Dra. Maria da Penha Herkenhoff, pela colaboração interinstitucional;

A Dra. Silvia Costa do Laboratório de Controle de Infecções do Hospital das Clínicas, da USP, pelo fornecimento de cepa controle para execução de experimento;

A amiga Luciane Medeiros, que me acompanhou e com otimismo me encorajou para as novas etapas que surgiam;

A André Felipe das Mercês Santos, pelo auxílio na organização das figuras e editoração da dissertação;

Aos professores e amigos do Departamento de Bacteriologia IOC/FIOCRUZ;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho de Desenvolvimento Científico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

RESUMO

As infecções hospitalares constituem uma das maiores causas de morbidade e mortalidade entre os pacientes hospitalizados, configurando um sério problema de saúde pública. Neste contexto destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa* como uma das principais responsáveis por este tipo de infecção, ocupando nos hospitais brasileiros, o 1º lugar no “ranking” entre os microrganismos causadores de pneumonias hospitalares, ressaltando-se ainda seu envolvimento em outras patologias. Este quadro se agrava devido à presença de cepas multirresistentes, vindo a constituir-se um fator limitante no tratamento. Dentre os antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos β -lactâmicos, os carbapenemas assumem importância por possuírem amplo espectro de atividade e estabilidade à hidrólise pela maioria das β -lactamases, incluindo as β -lactamases de espectro estendido-ESBL. No entanto, atualmente, é crescente o número de cepas resistentes a este fármaco. Com base nestas circunstâncias, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a multirresistência e os fatores envolvidos na resistência aos carbapenemas, em 187 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* oriundas de hospitais no Rio de Janeiro (3) e Mato Grosso do Sul (1), e de dois laboratórios da rede de Saúde Pública (ES e BA). O mecanismo de resistência aos carbapenemas foi determinado através da pesquisa da produção de metalo- β -lactamase (Mbla) por meio de um teste fenotípico de difusão em duplo disco, utilizando EDTA, e a presença de dois genes responsáveis pela produção deste tipo de β -lactamase, foi verificada através da PCR. No computo geral, 66.3% das cepas mostraram-se resistentes a seis antimicrobianos ou mais. Resistência ao imipeném foi observada em 58.3 % dos isolados, e ao meropeném em 57.2%, com 85.3% de positividade para Mbla. A presença dos genes IMP-1 e SPM foi detectada em 6.7% e 34.5%, respectivamente. Através da Eletroforese de Campo Pulsado foram identificados 93 genótipos distintos para as 187 cepas analisadas, apontando a prevalência de um perfil genômico (A), detectado em todas as regiões que participaram do estudo. Este se caracterizou por 96.5% de positividade para Mbla e 41.4% para o gene SPM. O elevado percentual de multirresistência, e o achado de um genótipo multirresistente prevalente em diferentes regiões do Brasil, indicam a disseminação de genes de resistência o que representa uma grande preocupação principalmente quando isoladas no ambiente hospitalar, por poderem estar envolvidas com surtos e impedir o tratamento de primeira linha.

ABSTRACT

Nosocomial infections, many times are the main cause of morbidity and mortality among hospitalized patients, configuring a serious problem by public health. In this context *Pseudomonas aeruginosa* is a leading cause of this kind of infection. At Brazilian hospitals, *Pseudomonas aeruginosa*, ranked first among all nosocomial pathogens related to pneumonia in intensive care unit, emphasizing its wrapping up with pathologies. The situation is increasingly worst because *Pseudomonas aeruginosa* is becoming multiresistant, what is a limiting factor in the treatment. Among the antimicrobial agents that are used to treat infections caused by pathogens β -lactam-resistant, the carbapenems are very useful antimicrobial agent due to be stable to hydrolyzing by the most β -lactamases, including extended spectrum β -lactamases (ESBL). However, today is increasingly the number of *P. aeruginosa* resistant to this agent. Therefore, the aim of this study was evaluate the multiresistance and the factors that were involved at imipenem resistance. A total of 187 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at hospitals of Rio de Janeiro city (3) and Mato Grosso do Sul (1), and isolated in Public Health laboratories situated at Espírito Santo and Bahia states. The mechanism to carbapenem-resistance was determined using a testing method for screening the production the metallo- β -lactamase (Mbla) using a convenient test using EDTA, and the detection of two genes producing metallo- β -lactamase was verified using PCR. Among all strains, 66.3% were resistant to 6 or more agents. Imipenem resistance was detected in 58.3%, and meropenem in 57.2%, where 85.3% strains was positive to the screening test to Mbla. IMP-1 was detected in 6.7% among the strains what were tested, and SPM-1 were detected in 34.5%. The Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) identified 93 genotypes distinct among the 187 strains analyzed, and was observed the prevalence of one pattern (A), detected at all regions studied. This genotype was positive to the screening test in 96.5% and the SPM-1 gene was detected in 41.4% among the strains with this genotype. This high percentage of multiresistance and the presence of a predominant genotype common at the different regions of the Brazil, indicate the dissemination by resistance genes, representing a problem mainly when isolated at hospital, because the high possibility of an outbreak, impending the ideal treatment.

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabela 1 - Espécimes Clínicos analisados de acordo com a origem da amostra | 36 |
| Tabela 2 - Distribuição das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de acordo com o sorogrupo e origem de isolamento | 37 |
| Tabela 3 - Percentual de resistência das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos 12 antimicrobianos testados pelo TSA de acordo com a origem de isolamento | 38 |
| Tabela 4 - Perfis de resistência das 187 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| Tabela 5 - Distribuição dos perfis de resistência mais prevalentes de acordo com os sorogrupos | 40 |
| Tabela 6 - Percentual de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes à polimixina B de acordo com a origem de isolamento | 41 |
| Tabela 7 - Distribuição das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtoras de metalo- β -lactamase de acordo com a origem de isolamento | 42 |
| Tabela 8 - Frequência e distribuição das cepas de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivas para Mbla pelos testes fenotípico e genotípico | 43 |
| Tabela 9 - Distribuição e frequência dos perfis genômicos das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que participaram do estudo de acordo com a origem de isolamento | 44 |
| Tabela 10 - Distribuição dos perfis de PFGE de cepas produtoras de metalo- β -lactamase de acordo com a origem de isolamento, grupo sorológico, perfil de resistência, espécime clínico e tipo de Mbla | 45 |
| Tabela 11 - Perfil genômico e sorogrupo das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivas ao teste genotípico de detecção de metalo- β -lactamase | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 – Fluxograma de atividades | 47 |
| Figura 2 – Teste de difusão em duplo disco para detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase em cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando discos de ceftazidima (CAZ) e disco contendo EDTA | 48 |
| Figura 3 – E-teste para detecção de cepa produtora de metalo- β -lactamase utilizando fita contendo EDTA e imipeném | 49 |
| Figura 4 – Controle do teste de difusão em duplo disco para detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase em cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando apenas discos contendo EDTA em diferentes volumes | 50 |
| Figura 5 – Controle negativo do teste de difusão em duplo disco para detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase em amostra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos utilizando discos de gentamicina (GEN) e EDTA | 51 |
| Figura 6 - Distribuição dos grupos sorológicos determinados para cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 52 |
| Figura 7 – Percentual de resistência aos antimicrobianos testados de acordo com a origem de isolamento | 53 |
| Figura 8 – Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a Polimixina B pelo E-test | 54 |
| Figura 9 – Gel de agarose com os produtos da PCR para cepa padrão de SPM-1 e IMP-1 utilizando-se três diferentes métodos de extração de DNA | 55 |
| Figura 10 – Gel de agarose com produtos da PCR para detecção do gene IMP-1 | 56 |
| Figura 11 - Gel de agarose com produtos da PCR para detecção do gene SPM-1 | 57 |
| Figura 12 – Gel de PFGE exemplificando alguns perfis de cepas produtoras de Mbla | 58 |
| Figura 13 – Gel de PFGE exemplificando alguns perfis de cepas não produtoras de Mbla provenientes do Mato Grosso do Sul | 59 |
| Figura 14 – Dendrograma confeccionado com 6 genótipos distintos com cepas produtoras de Mbla | 60 |
| Figura 15 – Percentuais de resistência das cepas Mbla positivas a 6 ou mais antimicrobianos | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Auto aglutinável

AMI – Amicacina

ATCC – American Type Culture Collection

ATM – Aztreonam

BA – Bahia

CAZ – Ceftazidima

CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CIP – Ciprofloxacino

CPM – Cefepime

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido etilenodiaminotracético

ES – Espírito Santo

ESBL - β -lactamase de espectro estendido

GEN – Gentamicina

IH – Infecção Hospitalar

IMP – Imipenemase

IPM – Imipeném

LABENT – Laboratório de Enterobactérias

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LPS – Lipopolissacarídeo

Mbla – Metallo- β -lactamase

MER – Meropeném

MS – Mato Grosso do Sul

MYSTIC – Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection

NA – Não Aglutinável

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NNISS – National Nosocomial Infection Surveillance System

PCIH – Programa Nacional de Controle de Infecções Hospitalares

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PFGE – pulsed field gel electrophoresis (gel de eletroforese em campo pulsado)

PB – Polimixina B

Pb – Pares de base

PBPs – Proteínas ligadoras de penicilina

SIM – Sulfeto/ Indol/ Mobilidade

SPM – São Paulo metalo- β -lactamase

TIC – Ticarcilina + Clavulanato

TRI – Trato respiratório inferior

TRS – Trato respiratório superior

TSA – Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

TZP – Piperacilina + Tazobactam

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM – Verona imipenemase

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| Resumo | viii |
| <i>Abstract</i> | ix |
| I – Introdução | 1 |
| 1.1 A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a Infecção Hospitalar | 1 |
| 1.2 Características gerais da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2 |
| 1.3 Estruturas Antigênicas e fatores de virulência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 3 |
| 1.4 As Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| 1.5 A resistência aos antimicrobianos da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 |
| 1.5.1 Os carbapenemas e a resistência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> através da produção de β -lactamases | 8 |
| 1.5.2 Metallo- β –lactamases | 10 |
| 1.6 Polimixina e a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 12 |
| 1.7 Análise Epidemiológica | 12 |
| 1.7.1 Caracterização Fenotípica | 13 |
| 1.7.2 Caracterização Genotípica | 14 |
| 1.8 A Vigilância Sanitária e a Infecção Hospitalar | 15 |
| II – Objetivos | 17 |
| 2.1 Objetivo Principal | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| III - Materiais e Métodos | 18 |
| 3.1 Amostragem - Origem das cepas bacterianas | 18 |
| 3.2 Confirmação da Identificação Bioquímica Sumária | 19 |
| 3.3 Identificação Sorológica | 21 |
| 3.4 Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.4.1 Método da Difusão em Discos | 21 |
| 3.4.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) | 22 |
| 3.4.2.1 Realizada através da diluição em Ágar | 22 |
| 3.4.2.2 Método da fita de E-teste | 23 |
| 3.5 Determinação presuntiva da produção de Melo- β -Lactamase (Mbla) – Difusão em duplo disco - Teste fenotípico | 23 |
| 3.6 Detecção dos genes IMP-1 e SPM-1, codificadores de metalo- β -lactamases, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Teste genotípico | 25 |
| 3.6.1 Extração e Quantificação do DNA | 25 |
| 3.6.2 PCR para IMP-1 | 26 |
| 3.6.3 PCR para SPM-1 | 27 |
| 3.7 Análise dos perfis de fragmentação de DNA cromossomal após tratamento com enzima de restrição e separação pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) | 28 |
| 3.7.1 Preparo do material | 28 |
| 3.7.2 Extração do DNA cromossomal | 28 |
| 3.7.3 Eletroforese em Gel de Agarose | 29 |
| 3.7.4 Análise dos Perfis de DNA Cromossomal | 30 |
| IV – Resultados | 31 |
| V – Discussão | 62 |
| VI – Conclusão | 76 |
| VII - Referências Bibliográficas | 77 |
| Apêndice | 95 |

1.1 A *Pseudomonas aeruginosa* E A INFECÇÃO HOSPITALAR

A Infecção Hospitalar constitui um sério problema de saúde pública, principalmente porque contribui para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados, além de aumentar o tempo de internação destes pacientes e conseqüentemente o custo do tratamento (JARVIS, 1987). Esse tipo de infecção surge durante a hospitalização não estando presente no momento da admissão do paciente ao hospital (BRASIL, 1998).

Informações sobre os patógenos envolvidos em casos de infecção hospitalar são importantes, e para tal existem sistemas de vigilância para esta monitorização. Em 1996, o sistema NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance), conduzido pelo programa de infecções hospitalares do CDC (Centers for Disease Control and Prevention), nos Estados Unidos descreveu a *Pseudomonas aeruginosa* como a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com a pneumonia em Unidades de Terapia Intensiva (RICHARDS et al. 1999). A *P. aeruginosa* aparece ainda, como o 4º agente de infecção de sítio cirúrgico, o 5º de infecções hospitalares em geral e o 6º de infecções da corrente sanguínea (NNISS, 1996). No Brasil, segundo SADER e colaboradores (2001), a situação é a mesma, destacando-se nos casos de pneumonias.

O sistema de vigilância “Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection” (MYSTIC) monitora a suscetibilidade a carbapenemas e outros antimicrobianos em hospitais (MENDES et al., 2000). Dados obtidos por este sistema mostram que na Europa, a *P. aeruginosa* foi o 2º agente mais isolado em Unidades de Terapia Intensiva e o 1º em unidades para pacientes com fibrose cística.

Na América Latina, o sistema SENTRY – Programa de Vigilância de Resistência - fornece dados sobre a ocorrência de *P. aeruginosa* em infecções hospitalares, tendo sido este o microrganismo mais freqüentemente detectado entre os patógenos bacterianos de pacientes com pneumonia internados em 10 centros médicos de seis países da América Latina (SADER et al., 1998).

Um estudo epidemiológico realizado em Hospital Universitário da cidade do Rio de Janeiro mostrou que dentre as 24 espécies bacterianas identificadas nos casos de infecção hospitalar (agosto de 1995 a julho de 1997), a *Pseudomonas aeruginosa* foi o segundo agente mais predominante com 18,5%, sendo superado apenas pelo *Staphylococcus aureus* com 21,0% (ASENSI et al., 2000).

A alta incidência da *Pseudomonas aeruginosa* pode ser atribuída a diversas propriedades como fácil adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade e sua capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos (FAVERO, BOND & PETERSEN, 1971). A possibilidade de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos, permite que equipamentos e utensílios hospitalares – respiradores e nebulizadores – bem como, soluções anti-sépticas, desinfetantes e de uso terapêutico, lhe sirvam de reservatório (GRUNDMANN et al. 1995, MOOLENAR et al. 2000). Este conjunto de fatores propicia a infecção de pacientes internados, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva onde os indivíduos muitas vezes encontram-se imunodeprimidos e submetidos a procedimentos invasivos (Ibid.).

Um estudo realizado com pacientes sépticos, em aproximadamente cinquenta centros médicos nos Estados Unidos da América, aponta uma taxa de mortalidade de 46.7% de pacientes infectados pela *P. aeruginosa* e 21% nas infecções determinadas por outras bactérias (JONES et al., 1997).

1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Pseudomonas aeruginosa*

Este microrganismo da família Pseudomonadaceae (PALLERONI et al., 1973), caracteriza-se como bastonete Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (POLLACK, 1995). A pioverdina e a piocianina são pigmentos fluorescentes difusíveis no meio de cultura produzidos por este microrganismo. Algumas cepas produzem um pigmento avermelhado (piorrubina) ou preto (piomelanina) (Ibid.).

Para a classificação da espécie, devem ser consideradas algumas características metabólicas. A *P. aeruginosa* é não fermentadora de carboidratos, é produtora de

citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição ao oxigênio como acceptor final de elétrons, produzindo também Arginina dehidrolase e Ornitina-descarboxilase.

1.3 ESTRUTURAS ANTIGÊNICAS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM *P. aeruginosa*

A patogenicidade dos bastonetes Gram - negativos não fermentadores depende da aderência a células hospedeiras, produção de polissacarídeos (alginato), toxinas extracelulares, resistência aos fatores bactericidas do soro e presença de lipopolissacarídeo de parede celular (endotoxina). Por ser considerada o mais virulento dessa classe de microrganismos, esses fatores têm sido exaustivamente estudados em *P. aeruginosa* (ARNOW & FLAHERTY, 1996).

As fimbrias ou *Pili* estendem-se a partir da superfície celular e promovem a aderência da bactéria aos receptores do gangliosídeo GM-1, presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro (IRVIN et al., 1989). A neuraminidase elimina o ácido siálico e resíduos dos receptores de gangliosídeo GM-1, facilitando a ligação das fimbrias. Embora a expressão de *pili* tenha o papel de mediar a aderência bacteriana e a colonização de superfícies epiteliais, essa estrutura, pode ser prejudicial ao patógeno, pois a aderência direta a receptores na célula fagocítica pode facilitar a morte do microrganismo (KELLY et al., 1989). No entanto, a bactéria apresenta mecanismos regulatórios que limitam a expressão de *pili* (ISHIMOTO & LORY, 1998).

O alginato, polímero de polissacarídeo que confere ao microrganismo uma aparência mucóide (HOIBY, 1975), funciona como mediador de aderência à mucina, além de promover resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular em leucócitos (MAI et al, 1993). Este polímero é produzido quase pela totalidade de cepas que infectam cronicamente pacientes com fibrose cística, e é responsável pelas colônias mucóides observadas em culturas de amostras clínicas obtidas destes pacientes, sendo considerado o principal determinante de patogenicidade para esses pacientes (DERETIC et al., 1994). Diferentemente, amostras isoladas de pacientes com outros quadros clínicos e amostras do meio ambiente raramente revelam produção de alginato (MAI et al., 1993). Entretanto, todas as cepas de *P. aeruginosa* apresentam o sistema genético que codifica a produção deste tipo de polissacarídeo (DERETIC et al., 1994).

Dentre os fatores de virulência extracelulares, que facilitam o rompimento da integridade epitelial, podem ser citadas as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina e proteases como hemolisinas e exotoxinas (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995).

A fosfolipase C destrói a membrana citoplasmática; destrói o surfactante pulmonar, inativa as opsoninas.

A exotoxina A inibe a síntese protéica em células eucarióticas, e é produzida pela maioria das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos e apresenta potentes efeitos locais e sistêmicos, incluindo necrose de tecidos moles e choque séptico, interrompe a atividade celular e a resposta macrofágica (POLLACK, 1983).

A enterotoxina interrompe a atividade gastrointestinal normal, produzindo diarreia.

Entre as proteases extracelulares, principalmente a elastase e a protease alcalina, há uma contribuição para a aderência e também para a virulência do microrganismo. Pesquisas com estas enzimas, mostram que em extratos purificados elas causam a necrose de tecidos conectivos por degradarem elastina, laminina e colágeno (HECK et al., 1986). Estas enzimas também apresentam a capacidade de inativar componentes do complemento, clivar IgG e IgA, particularmente em pacientes com fibrose cística (DORING et al., 1984; FICK et al., 1985) e degradar citocinas, incluindo interleucina 2 (IL2), Interferon γ (INF γ) e fator de necrose tumoral (TNF α) (PARMELY et al., 1990).

O lipolissacarídeo da parede celular, existente em múltiplos imunotipos, permite a determinação do sorogrupo da bactéria em estudo; é responsável pelas propriedades endotóxicas do microrganismo e a causa da síndrome séptica: febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada, anomalias metabólicas.

O biofilme permite a colonização de cateteres vasculares (KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, 1991), peritoniais (DASGUPTA & COSTERTON, 1989), urinários (NICKEL, DOWNEY & COSTERTON 1989), tubos nasogástricos (MARRIE, SUNG & COSTERTON, 1990), dispositivos ortopédicos, reservatórios de armazenamento de água em farmácia e/ou laboratório (CRISTINA & COSTERTON 1984).

1.4 AS INFECÇÕES CAUSADAS POR *Pseudomonas aeruginosa*

O espectro de doenças causadas por este agente, compreende desde infecções superficiais da pele a sepse fulminante (MURRAY, 1995). A *P. aeruginosa* pode causar infecção aguda pela produção de toxinas e infecção crônica pela ação da camada espessa que consiste no seu biofilme, e ainda, pode resultar no somatório dos tipos de infecção pela ação concomitante desses componentes (PALLERONI, 1998).

Infecções por este microrganismo, adquiridas na comunidade, estão associadas ao contato com água ou soluções contaminadas, quando acometem indivíduos imunocompetentes tendem a ser localizadas (Ibid).

A *P. aeruginosa*, é um importante patógeno respiratório em pacientes com fibrose cística, doença genética que apresenta como manifestações clínicas principais a doença pulmonar obstrutiva crônica e a insuficiência pancreática exócrina. A água presente em equipamentos de terapia respiratória, quando contaminada pode atingir facilmente pacientes internados, principalmente em uso de antimicrobianos e submetidos a procedimentos invasivos (KNOWLES, GILLIGAN & BOUCHER, 1995; BARTH & PITT, 1998).

As infecções da corrente sanguínea, também podem ser ocasionadas por este agente, principalmente em pacientes com doenças neoplásicas ou hematológicas e, em outras situações, em ocorrência de queimaduras, endocardite, pneumonia, problemas urológicos e a infecção em neonatos (FLICK & CLUFF, 1976).

Uma característica marcante das infecções por *P. aeruginosa* adquiridas em UTI é a multirresistência (SADER et al., 1993; GOLDMANN & HUSKINS, 1997). Os percentuais de resistência são mais elevados nas amostras isoladas nestas unidades de tratamento, refletindo maior intensidade de uso de antimicrobianos nesse ambiente, e, possivelmente transmissão de cepas multirresistentes entre os pacientes.

1.5 A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DA *Pseudomonas aeruginosa*

Os antimicrobianos podem ser classificados segundo sua estrutura química (derivados de aminoácidos, derivados de açúcares, derivados de acetatos e propionatos e outro), tipos de microrganismos sobre os quais atuam ou ainda, efeito provocado no microrganismo (MANRIQUE & GALVÃO, 1997).

Em relação ao mecanismo de ação dos antimicrobianos, descreve-se a interferência na síntese da parede celular; alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática; interferência na replicação do cromossomo; interferência na síntese protéica (Ibid).

Um importante grupo de antimicrobianos que agem interferindo na síntese da parede celular, é o grupo dos β -lactâmicos, que constituem uma família de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico heterocíclico azetidiona denominado anel β -lactâmico. Este grupamento é o responsável pela atividade antimicrobiana deste grupo de antibióticos e seu rompimento em qualquer ponto resulta na perda completa da ação antibiótica da droga (LIVERMORE, 1995).

Ao grupo dos β -lactâmicos pertencem duas das mais importantes classes de antibióticos: as penicilinas (que podem ser naturais ou sintéticas) e as cefalosporinas. O desenvolvimento da química e da farmacologia permitiu a descoberta de novos β -lactâmicos que vêm sendo descritos, entre os quais destacam-se as cefamicinas e carbapenemas (HANCOCK, 1998).

Pode-se definir resistência bacteriana como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estas estão sendo submetidas. No caso da resistência intrínseca, o microrganismo possui naturalmente determinada estrutura que lhe confere resistência a aquele antimicrobiano (LIVERMORE, 1995).

Até a década de 1960, dentre os antimicrobianos existentes, a *Pseudomonas aeruginosa* só se mostrava sensível à ação das polimixinas, sendo reconhecida por sua resistência natural às diferentes classes de antimicrobianos disponíveis. Posteriormente, com a descoberta de novas substâncias antimicrobianas, verificou-se a sensibilidade desta bactéria a alguns aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, tobramicina e metilmicina), as carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, a algumas cefalosporinas de terceira geração,

sobretudo a ceftazidima, as cefalosporinas de quarta geração, aos carbapenemas, ao aztreonam e as fluoroquinolonas, especialmente o ciprofloxacino. No entanto, a facilidade deste microrganismo em adquirir resistência, por fenômeno de mutação, conjugação, transposição e indução, tornou a ação dos antimicrobianos obsoleta, como no caso da carbenicilina, ou imprevisível, como no caso da ceftazidima ou da gentamicina. A existência de genes de resistência intrínseca habitualmente confere pequena permeabilidade da parede celular à penetração das drogas antimicrobianas. Somadas a isso a aquisição de novos genes de resistência, por exemplo determina a produção de β -lactamases inativadoras de antibióticos β -lactâmicos através da hidrólise do anel heterocíclico; determina também a produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e a produção de um mecanismo de efluxo que retira as drogas do meio intracelular como ocorre com as quinolonas (HANCOCK, 1998). A emergência de resistência aos agentes antimicrobianos, detectada logo após a introdução de cada um deles, esta relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso indiscriminado desses medicamentos e a fatores relacionados às bactérias (FRIEDRICH, WHITE & BOSSO, 1999).

Um estudo realizado por SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, entre os anos 1997 e 2000, determinou a frequência da ocorrência de infecção urinária e a sensibilidade aos antimicrobianos desses uropatógenos coletados na América Latina. Neste período, isolou-se um total de 1961 cepas de pacientes hospitalizados. A *P. aeruginosa* foi o terceiro patógeno mais prevalente com 8,0% entre 1997 e 1999 e 6,2% em 2000. O meropeném foi o composto mais ativo (CMI₅₀ 2 μ g/ml; 73,7 – 81,1% de suscetibilidade), seguido da piperacilina/tazobactam (CMI₅₀ 16 - 32 μ g/ml; 70,2 – 81,8% de suscetibilidade) e imipeném (CMI₅₀ 1 - 2 μ g/ml; 63,8 – 75,8% de suscetibilidade). Ceftazidima e cefepime mostraram-se similares, no período de 1997 a 2000, já nos isolados de 2000, a ceftazidima (CMI₅₀ 4 μ g/ml, 72,7% de suscetibilidade) foi um pouco mais ativa que o cefepime (CMI₅₀ 8 μ g/ml, 60,6% de suscetibilidade). Embora a amicacina tenha sido o melhor aminoglicosídeo, ela inibiu menos que 50% dos isolados, e as fluoroquinolonas mostraram pouca atividade, inibindo menos que 45% da *P. aeruginosa* isoladas (SADER et al. 2002).

Loureiro e colaboradores (LOUREIRO et al., 2002) determinaram a taxa de resistência a antimicrobianos de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de casos de infecção hospitalar na UTI neonatal de uma maternidade da cidade do Rio de Janeiro no período de 1997 a 1999 (dividido em dois 1997-1998 e 1998-1999). Essas cepas se mostraram muito

resistentes a cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, cefuroxima, cloranfenicol, trimetropim/sulfametaxazol e tetraciclina nos dois períodos estudados. Para o cefepime, ceftazidima, carbenicilina e ticarcilina/ác.clavulânico durante o primeiro período analisado e nenhuma resistência no segundo período do estudo. Em relação a piperacilina/tazobactam, apresentaram baixa taxa de resistência (0 – 35%) no primeiro período estudado e nenhuma resistência no segundo. Um aumento significativo no segundo período de estudo foi observado para gentamicina e amicacina (10,7% para 50% e 25% respectivamente). Resistência ao imipeném e ciprofloxacino, foram identificadas apenas no segundo período.

1.5.1 – OS CARBAPENEMAS E A RESISTÊNCIA DA *Pseudomonas aeruginosa* ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES

Entre os vários β -lactâmicos, os carbapenemas principalmente o imipeném e o meropeném apresentam largo espectro de atividade bactericida (LIVERMORE, 1992) e são estáveis a hidrólise pela ação da maioria das β -lactamases, produzidas por estes organismos, incluindo β -lactamases de espectro estendido, as ESBL (JACOBY, & MEDEIROS, 1991; YAN et al., 2001). Estes antimicrobianos atravessam rapidamente a membrana externa bacteriana por apresentarem alta afinidade por proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) em bactérias Gram – negativas, o imipeném apresentando afinidade por PBPs do tipo 2 e o meropeném por PBPs do tipo 3 (CORNAGLIA et al., 1995).

Apesar destas características, o número de isolados clínicos carbapenemas-resistente, pertencentes à família Enterobacteriaceae ou Pseudomonadaceae vêm crescendo (WATANABE et al., 1991; IYOBE, YAMADA & MINAMI, 1996; MARUMO et al., 1995).

A resistência aos carbapenemas é normalmente observada em baixos níveis (CMI, 8 a 32 μ g/mL), nesses casos a resistência ao imipeném ocorre em consequência da baixa expressão de porinas OprD, sendo este mecanismo dependente da expressão continuada da β -lactamase AmpC cromossomal. A resistência ao meropeném e não ao imipeném pode aumentar através da alta expressão do sistema de efluxo MexA-MexB-OprM (POOLE et al, 1993; LIVERMORE, 1995). A β -lactamase do tipo AmpC, é produzida por todas as cepas

de *P. aeruginosa* e é codificada por genes cromossômicos, e sua expressão é induzida (LIVERMORE, 1989). Agentes como benzilpenicilinas, ampicilina e a maioria das cefalosporinas de 1ª geração são fortes indutores da produção desta enzima, sofrendo rapidamente a hidrólise por sua ação (Ibid).

A hidrólise de β -lactâmicos constitui um mecanismo adicional de resistência aos antimicrobianos, que aumenta seus efeitos na resistência à ação dos sistemas de efluxo (LI, NIKAIDO & POOLE, 1995) e da baixa permeabilidade celular (LIVERMORE, 1989).

Os genes que codificam as β -lactamases, podem ser cromossômicos ou plasmidiais, e a mobilidade genética pode ser ampliada através de transposons, que transportam os respectivos genes dos plasmídios para os cromossomas; apesar de mais incomum, o inverso também pode ocorrer. Nos casos de mutação dos genes de resistência, pode-se ter o espectro de resistência aumentado, sem que o laboratório responsável pela análise do material seja capaz de identificar o tipo desta resistência (TENOVER, 1995).

Em *P. aeruginosa*, além da β -lactamase cromossômica, um grande número de β -lactamases mediadas por plasmídios ou transposons foi detectado (PITT, 1998). Nos últimos anos uma grande variedade de β -lactamases plasmidiais tem sido detectada em *P. aeruginosa*, incluindo β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) e enzimas que hidrolisam carbenicilina. As ESBLs, pertencem à classe A de Ambler (TEM, SHV, PER-1 e VEB-1) (NORDMAN & GUIBERT, 1998), enquanto as oxilinasas OXA 2 a 19 e carbenicilinasas (CARB 3 e 4) pertencem à classe D de Ambler (CARB 3 e 4) (POIREL, COLLET & NORDMANN, 2000).

Altos níveis de resistência aos carbapenemas, com CMI > 32 μ g/mL, não eram comuns em *P. aeruginosa*, mas atualmente são observados devido ao surgimento de um grupo particular de β -lactamases com capacidade de hidrolisar carbapenemas. Essas enzimas pertencentes a classe B de Ambler, representam um único grupo entre as β -lactamases com íons zinco em seu sítio ativo, conhecidas como Metallo- β -lactamases (Mbla) (BUSH, 1998).

1.5.2 - Metallo- β -lactamases

A primeira metallo- β -lactamase (Mbla) foi descrita em meados dos anos 60 em *Bacillus cereus*. Já a primeira metallo- β -lactamase plasmidial isolada de *Pseudomonas aeruginosa*, foi em 1991, conhecida como IMP-1 (SABATH & ABRAHAM, 1966).

Essas enzimas são caracterizadas por um centro catalítico binuclear de zinco, e por isso sofrem a inibição por quelantes iônicos, como EDTA, mas não são bloqueadas por inibidores de β lactamases que apresentam serina no seu sítio ativo. Essas emzimas inibidoras de β lactamases, como por exemplo o ácido clavulânico, com serina em seu sítio ativo também são hidrolisados pelas metallo- β -lactamases (CONCHA et al. ,1996; CARFI et al, 1998.; ULLAH et al., 1998).

Estas degradam antimicrobianos β lactâmicos, incluindo carbapenemas, cefamicinas, as drogas β lactâmicas de amplo espectro e ainda, como já mencionado, os inibidores de β lactamases (BUSH, 1998).

A Mbla denominada IMP-1 foi a primeira enzima desta classe a ser descrita em *P. aeruginosa* (WATANABE et al., 1991), seu gene, *bla*_{IMP}, foi primeiramente disseminado entre as *P. aeruginosa* e outros bastonetes Gram-negativos no Japão (SENDA et al., 1996; KOHLER, 1999). A associação do *bla*_{IMP} com elementos do integron e o intenso uso de carbapenemas neste país, aparentemente contribuíram para essa resistência (SENDA et al., 1996). Na Europa, IMP-1 foi identificado em uma cepa de *Acinetobacter baumannii*, isolado na Itália, altamente resistente ao imipeném (CORNAGLIA et al., 1999). Outras 3 variantes de Mbla do tipo IMP, foram descritas: IMP-2, em uma cepa de *Acinetobacter baumannii*, isolado na Itália (RICCIO et al., 2000), IMP-3 em *Shigella flexneri* no Japão e IMP-4 em *Acinetobacter* spp., ambos no Japão (CHU et al., 2001).

Uma cepa de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenemas isolada de um paciente em um hospital italiano, em 1997, produzia uma nova β -lactamase da classe B de Ambler do tipo VIM (Verona imipenemase). Esta enzima com menos de 40% de homologia na seqüência de aminoácidos quando comparados ao grupo IMP, foi descrita em 1999 e denominada VIM-1 (LAURETTI et al., 1999). Uma outra variante de VIM, VIM-2, foi descrita em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada na França em 1996 (POIREL et al., 2000) revelando 90% de homologia na seqüência de aminoácidos quando comparada com a enzima VIM-1.

O gene *bla_{imp-1}* que codifica a β -lactamase IMP-1, assim como *bla_{vim-1}* e *bla_{vim-2}* que codificam VIM-1 e VIM-2 respectivamente são geralmente mediados por integrons carregados por um grande plasmídeo transferível (ARAWAKA et al., 2000).

A disseminação de *P. aeruginosa*, resistente aos carbapenemas, tem sido confirmada em vários locais, como: Japão, Itália, Cingapura, Inglaterra, Portugal, Grécia, Taiwan e França (WOODFORD et al., 1998; POIREL et al., 2000; TSARKIS et al., 2000; YAN et al., 2001). No Brasil, foram isoladas as primeiras cepas no Hospital Universitário do Rio de Janeiro, havendo registros também na região nordeste, na cidade de João Pessoa e em São Paulo (PELLEGRINO, MOREIRA & NOUER, 2001; SANTOS et al., 2002; TOLLEMAN et al., 2002).

Em janeiro de 2001, em uma paciente pediátrica internada em um hospital da cidade de São Paulo, observou-se quadro de neutropenia com episódios de febre alta. O tratamento empírico foi feito com ceftriaxona e amicacina, sendo posteriormente substituído pela ceftazidima. Uma cultura pura de *P. aeruginosa* suscetível apenas a polimixina B foi isolada da urina da paciente, e portanto substituiu-se a ceftazidima por polimixina B. Cinco dias depois se isolou, a partir de hemocultura, *P. aeruginosa* com o mesmo perfil de suscetibilidade, que provocou um choque séptico, levando a paciente ao óbito. Estudos realizados por Toleman e colaboradores (2002), utilizando esta cepa isolada em São Paulo, identificaram um novo gene produtor de Mbla, diferente dos anteriormente identificados que codificam as enzimas IMP e VIM. Este novo gene, com características próprias, foi denominado *bla_{SPM-1}* (São Paulo metalo- β -lactamase).

Em 2002, na Alemanha, o SENTRY Programa de Vigilância Antimicrobiana, detectou em 5 cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemas uma nova Mbla, configurando a 4ª subclasse das β -lactamases da classe B de Ambler, a GIM-1 (German imipenemase). Estas se apresentaram altamente resistentes aos 19 agentes antimicrobianos testados, mostrando sensibilidade apenas a polimixina B, e mostraram-se indistinguíveis a análise de PFGE. Outras seis cepas de *P. aeruginosa*, isoladas na mesma época e no mesmo hospital, sensíveis aos carbapenemas, mostraram-se diferentes ao PFGE (CASTANHEIRA et al., 2004).

1.6 POLIMIXINA E A *Pseudomonas aeruginosa*

As polimixinas, representadas pela polimixina B e pela colistina, constituem um grupo de peptídeos policatiônicos sintetizados por bactérias da espécie *Bacillus polymyxa*. Estes antimicrobianos atuam na parede celular de bactérias Gram negativas, promovendo rápidas mudanças na permeabilidade da membrana citoplasmática, levando a morte celular. Ao atravessarem a membrana externa causam deslocamento de cátions divalentes e como consequência desestabilizam a membrana externa que se torna mais permeável a passagem do antimicrobiano (HANCOCK & BELL, 1988). Apesar de mostrarem grande atividade contra a *P. aeruginosa*, estes antimicrobianos deixaram de ser comercializados no Brasil no início dos anos 80 devido a sua alta toxicidade (LEVIN et al., 1999).

Atualmente, com a alta taxa de resistência aos antimicrobianos, e consequente falta de opção para tratamento de paciente infectado por uma cepa multirresistente, apresentando suscetibilidade apenas a Polimixina B, o uso deste antimicrobiano tornou-se mais freqüente e inclusive já pode ser constatada resistência a esta substância. A proteína da membrana externa, OprH, tem a função de bloquear a passagem de polimixina pela membrana externa. Desta forma, a expressão exacerbada desta proteína por mutação ou adaptação da bactéria a um ambiente deficiente de íons magnésio pode estar associada com a resistência de *P. aeruginosa* à polimixina B (YOUNG et al., 1992).

1.7 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

A proliferação mundial de cepas bacterianas multirresistentes a antimicrobianos rotineiramente utilizados é crescente, e particularmente nos últimos anos em casos de infecção hospitalar causados por *P. aeruginosa*. Nestes, e em outros casos, pode-se destacar a importância dos estudos epidemiológicos (HARRIS et al., 1999).

A tipagem de agentes infecciosos e o estabelecimento do grau de similaridade entre cepas envolvidas em infecções nosocomiais, principalmente quando comparado a amostras isoladas em casos de infecção esporádica ou em caso de infecção comunitária, permitem a formulação de hipóteses sobre a existência de clones apresentando características especiais de virulência e sobre a transmissão hospitalar desses agentes. (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997; OLIVE & BEAN, 1999).

Geralmente, surtos de doenças infecciosas são resultado da exposição a uma fonte comum do agente etiológico. Epidemiologicamente, os microrganismos envolvidos em um surto apresentam relação clonal, indicando que possuem uma mesma origem. Amostras de uma mesma espécie, podem apresentar diversidade quando isoladas de diferentes fontes, em diferentes épocas, e em regiões geográficas distintas, sendo classificadas em subtipos. Verifica-se portanto, que todo esse processo auxilia no reconhecimento de surtos de infecção, na detecção da transmissão cruzada de patógenos, na determinação de uma fonte de infecção e no monitoramento de programas de controle de infecção hospitalar (OLIVE & BEAN, 1999).

1.7.1 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Técnicas fenotípicas são definidas como técnicas que detectam as características expressas pelos microrganismos, ou seja, resultam da expressão de genes que podem sofrer variações, baseados em mudanças nas condições de crescimento, fase de crescimento e mutação espontânea (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997).

Para a análise epidemiológica de diferentes bactérias vários métodos clássicos vêm sendo empregados, destacando-se a biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, tipagem de piocinas, perfis de resistência a antimicrobianos, entre outras técnicas fenotípicas (ARBEIT, 1995; TENOVER et al, 1995; LIPUMA, 1998).

A determinação do tipo sorológico do LPS (componente termoestável da membrana externa), consiste em uma forma útil para a tipagem fenotípica de *P. aeruginosa*, pois ela é sorologicamente heterogênea e o LPS, determina o tipo de antígeno O. Entretanto, para cepas isoladas de pacientes com fibrose cística, que apresentam LPS rugoso, o método não é eficiente (PITT, 1988).

A determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, atualmente não é considerada como eficiente para a tipagem de *P. aeruginosa*, visto que cepas expressando diferentes genótipos podem apresentar perfis similares e, ao contrário, cepas expressando o mesmo genótipo podem apresentar perfis diferentes (BINGEN et al., 1996; PUJANA et al., 1999).

1.7.2 - CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Visando uma maior precisão da tipagem de microrganismos, técnicas moleculares foram desenvolvidas, apresentando elevada importância entre as cepas envolvidas em casos de infecção hospitalar, pois se aproximaram da possibilidade de erradicação de fontes ambientais, prevenção de infecções cruzadas e monitoramento da eficácia da terapia antimicrobiana (POH, YEO & TAY, 1992). Estas técnicas baseiam-se na análise do DNA cromossomal ou extra-cromossomal, e fornecem um poder discriminatório maior que os parâmetros fenotípicos. Estudos mostram que estas técnicas permitem a identificação de cepas endêmicas e de surtos, assim como, a identificação de um clone entre cepas de uma mesma espécie, antibiograma, sorotipo e fagotipo (WASCHSMUTH, 1986; BARG, 1993; GOERING, 1993).

Esses métodos incluem determinação do perfil plasmidial (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997), avaliação do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), ribotipagem (STULL, LIPUMA & EDLIND, 1988), amplificação de seqüências do DNA em técnicas que empregam reação em cadeia da polimerase – PCR (PUJANA et al., 1999) e na separação de fragmentos do DNA tratado com enzimas de restrição através da eletroforese em campo pulsado (PFGE)(ROMLING & TUMMLER, 2000).

Consideradas como poderosas ferramentas para o rastreamento epidemiológico, as técnicas moleculares identificam uma cepa comum entre os pacientes infectados e demonstram similaridades entre cepas de origem hospitalar ou da comunidade. A análise do DNA cromossomal através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE-Pulsed Field Gel Electrophoresis) é a técnica mais recomendada para a tipagem de patógenos nosocomiais (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997), apresentando importância para o estudo da epidemiologia hospitalar de muitos microrganismos devido a sua alta capacidade discriminatória, boa reprodutibilidade e fácil interpretação (LOUREIRO et al., 2002). Através desta técnica, pode-se determinar a variabilidade genética, distâncias filogenéticas, demonstrar a inter-relação dos isolados bacterianos e elucidar as vias de transmissão (SADER et al., 1993; LEROYER et al., 1997).

1.8 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA E A INFECÇÃO HOSPITALAR

A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, chamada Lei Orgânica da Saúde, organiza o Sistema Único de Saúde e estabelece como objetivo e atribuição do SUS, “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da Saúde com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas” (BRASIL, 1990).

A Lei Orgânica da Saúde define a Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Desta forma, verificamos a importância da Vigilância Sanitária no controle das infecções hospitalares, pois se as infecções hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais e sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação de assistência hospitalar, de vigilância sanitária e outras, tomadas no âmbito do Estado, do Município e de cada hospital, fica muito bem caracterizado o papel da Vigilância Sanitária.

A Lei nº 9.431 (BRASIL, 1997) de janeiro de 1997, dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. A Portaria MS 2.616/98 (BRASIL, 1998) regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, em substituição a Portaria MS 930/92, e dispõe, na forma de anexos, diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares, determinando as ações mínimas e necessárias a serem desenvolvidas, de forma sistemática com vistas a reduzir ao máximo a incidência e a gravidade das infecções hospitalares, por meio de um Programa Nacional de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH), envolvendo Ministério da Saúde e Secretarias Municipais e Estaduais de Saúde. Mais recentemente, em junho de 2000, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária adota a Resolução de Diretoria Colegiada nº48, que tem como objetivo estabelecer a sistemática para avaliação do cumprimento das ações do Programa de Controle de Infecção Hospitalar, e contém em seu anexo o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar.

No Brasil, dados de estatística nacional sobre índices de infecção hospitalar são escassos, desconhecendo-se a eficácia dos programas, sujeitando-se a estimar custos com

base nos dados americanos, que certamente diferem de nossa realidade (FREITAS, 1997). Essa situação parece estar mudando na medida em que já se tem centros no Brasil: São Paulo, Rio de Janeiro e Florianópolis que participam do programa SENTRY de vigilância de resistência, desenhado para monitorar infecções hospitalares e algumas comunitárias, através de uma rede de laboratórios sentinelas distribuídos em todo o mundo (SADER & PIGNATARI, 1997).

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O presente trabalho visa avaliar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos e a diversidade genômica de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar, bem como os fatores envolvidos na resistência aos carbapenemas, com base em testes fenotípicos e genotípicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de suscetibilidade, e o percentual de resistência a 12 antimicrobianos de importância clínica e terapêutica, em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar em diferentes regiões do Brasil, pelo método de difusão de disco em ágar;
- Determinar *in vitro*, nas cepas de *P. aeruginosa*, a concentração mínima inibitória de Polimixina B pelo método de diluição em ágar e pelo método de tiras de E-Test, e comparar os valores obtidos com o resultado determinado pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de disco em ágar;
- Determinar a prevalência dos grupos sorológicos entre as cepas estudadas;
- Caracterizar fenotipicamente as cepas produtoras de Metallo- β -lactamase, entre as amostras resistentes aos carbapenemas;
- Identificar as cepas produtoras de Metallo- β -lactamase dos tipos IMP-1 e SPM pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR
- Determinar o perfil clonal e avaliar a diversidade genômica das cepas isoladas, através da técnica molecular de Eletroforese em Campo Pulsado – PFGE.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM – ORIGEM DAS CEPAS BACTERIANAS

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* analisadas pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Enterobactérias (LABENT), do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), onde foi realizado todo o estudo. As atividades desenvolvidas encontram-se descritas no fluxograma – Figura 1.

As cepas encaminhadas pelos hospitais foram estocadas em Ágar Nutriente fosfatado.

Participaram do estudo 187 cepas de origem hospitalar, isoladas no ano de 2003 em diferentes hospitais e regiões do Brasil, sendo:

- 43 cepas provenientes do Hospital 1 do município do Rio de Janeiro (RJ1);
- 33 cepas provenientes do Hospital 2 do município do Rio de Janeiro (RJ2);
- 17 cepas provenientes do Hospital 3 do município do Rio de Janeiro (RJ3);
- 59 cepas provenientes de um hospital federal do estado do Mato Grosso do Sul (MS);
- 29 cepas provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Espírito Santo (ES) e
- 6 cepas provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública do estado da Bahia (BA).

O quadro 1, demonstra a distribuição das amostras em função da Unidade Federativa (UF) de origem.

Quadro 1: Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* de acordo com a Unidade Federativa (UF) de origem.

| UF | NUMERO | PERCENTAGEM |
|--------------------|------------|---------------|
| Rio de Janeiro | 93 | 49,7 |
| Espírito Santo | 29 | 15,5 |
| Bahia | 6 | 3,2 |
| Mato Grosso do Sul | 59 | 31,5 |
| Total | 187 | 100,00 |

A distribuição das cepas de acordo com os espécimes clínicos de onde foram isoladas constitui informação importante e pode ser observada na tabela 1. Por exemplo, 35 das 187 cepas, foram isoladas do trato urinário, 26 do trato respiratório superior, destacando-se também o sangue com 25 amostras.

3.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA SUMÁRIA

Todas as cepas selecionadas foram reisoladas em Hektoen Enteric Agar (Oxoid), avaliando-se a morfologia colonial e confirmação bioquímica das suas características metabólicas.

Partindo-se do isolamento, após verificação da pureza das culturas, selecionou-se colônias sob o ponto de vista morfológico, e estas foram repicadas para o meio de triagem de Costa e Vernin – CV - e incubadas a 37° por 24 horas, após este tempo o meio permanece inalterado.

Em seqüência a leitura do meio de triagem, efetuou-se os testes bioquímicos para a confirmação da *P. aruginosa*, com base na utilização do citrato como única fonte de carbono, no meio Ágar Citrato de Simmons; mobilidade, ausência da produção de indol e de sulfeto de hidrogênio, no meio SIM; presença de citocromo oxidase; e ação sobre a glicose.

Quando necessário, devido a alguma dúvida em relação ao perfil bioquímico, inoculou-se a amostra no Sistema Crystal de identificação (BBL/Bekton-Dickinson) para microrganismos fermentadores e não fermentadores.

A execução das provas, leitura e interpretação seguiram critérios estabelecidos por Costa & Hofer (1972) e Koneman e colaboradores (1997).

Pesquisa do indol e do sulfeto de hidrogênio

Em um tubo contendo meio de cultura semi-sólido SIM, foi inoculada uma colônia bacteriana com o auxílio de uma agulha de semeadura e incubado a 37°C “overnight”. Para a determinação da produção de indol, uma gota do reativo de Kovacs (Difco), foi adicionada ao tubo com o crescimento. O não aparecimento de uma cor fúcsia na interface do meio com o reativo indicou resultado negativo para a produção de indol. Indol é um dos produtos metabólicos de degradação do aminoácido triptofano. As bactérias

que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptofano com produção de indol, ácido pirúvico e amônia. A prova está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído (reativos de Kovacs e Ehrlich). Neste meio SIM, não observa-se a formação de precipitado negro, caracterizando-o como negativo para produção de sulfeto de hidrogênio.

Prova do Citrato de Simmons

Em um tubo de ensaio contendo o meio de cultura Ágar Citrato de Simmons, inoculou-se uma colônia da cultura bacteriana, e posteriormente incubou-se a 37°C “overnight”, procedendo-se a leitura após o período de incubação. O meio contém citrato de sódio, um ânion, como única fonte de carbono e fosfato de amônia como única fonte de nitrogênio. As bactérias capazes de utilizar o citrato também são capazes de extrair nitrogênio do sal de amônio, levando à alcalinização do meio a partir da conversão do NH_3 em hidróxido de amônia (NH_4OH). Como indicador é utilizado o azul de bromotimol, que na presença de reação positiva ocorre a viragem para um pH acima de 7,6, sendo evidenciado pela tonalidade azul do meio.

Ação sobre a glicose

Em um tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido adicionado de glicose com indicador de Andrade, como indicador de pH, inoculou-se uma colônia bacteriana. Este tubo foi incubado “overnight” e a seguir procedeu-se a leitura. A inalteração da coloração do meio indica um resultado negativo, onde a bactéria não utilizou a glicose pelo metabolismo fermentativo. A presença de ácido no meio, em decorrência do metabolismo da bactéria, é revelado pela viragem do indicador de Andrade para uma coloração avermelhada.

Teste da oxidase

Uma tira de papel de filtro foi e impregnada com reativo de Kovac (Difco).

Com o auxílio de uma alça de sementeira de material plástico, descartável, uma colônia bacteriana foi removida e depositada em uma tira de papel de filtro impregnada

com o reativo de Kovac. O desenvolvimento de coloração arroxeadada em até 10 segundos foi considerado positivo.

3.3 IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

As cepas foram semeadas em tubos contendo Ágar nutriente inclinado, e incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente acrescentou-se 1mL de solução salina (NaCl 0.85%) esterilizada promovendo-se uma mistura de modo a obter-se uma suspensão da amostra bacteriana. A sorologia foi realizada de acordo com as especificações de Homma (1982), utilizando-se o kit de aglutinação Antisoro (Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo, Japan).

3.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

3.4.1 MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

O método de difusão de discos em Ágar foi realizado segundo Kirby & Bauer (1966), e descrito pelo “National Commite for Clinical Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), responsável por estabelecer os critérios e a padronização de “breakpoints” para os diferentes antimicrobianos.

Preparou-se uma suspensão bacteriana em caldo Mueller-Hinton (MH), contendo 10^6 UFC/mL. Com o auxílio de um Swab esterilizado, realizou-se uma semeadura continua em três a quatro direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma a obter um crescimento uniforme em toda superfície da placa de Ágar Mueller-Hinton (OXOID). Passados aproximadamente 15 minutos, os discos de antimicrobianos foram depositados sobre o ágar com o auxílio de um disc dispenser (OXOID) e incubados a 35°C por 18-24 horas. Após este período, com o auxílio de um paquímetro, mediu-se os diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento bacteriano presentes ao redor dos discos de antimicrobianos, comparados aos valores de referência fornecidos pelo NCCLS.

Como controle da qualidade, execução e confiabilidade, cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC27953) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram testadas sob as mesmas condições de meio de cultivo e incubação.

A escolha dos antimicrobianos foi baseada em dados da literatura. A seguir estão listados estes antimicrobianos com as suas respectivas concentrações:

- Amicacina (AMI) 30 μ g
- Aztreonam (ATM) 30 μ g
- Carbenicilina (CAR) 30 μ g
- Cefepime (COM) 30 μ g
- Ceftazidima (CAZ) 30 μ g
- Ciprofloxacina (CIP) 5 μ g
- Gentamicina (GEN) 10 μ g
- Imipenem (IPM) 10 μ g
- Meropenem (MER) 10 μ g
- Piperacilina + Tazobactam
100 μ g/10 μ g
- Polimixina B 30 μ g
- Ticarcilina + Ac. clavulânico
75 μ g/10 μ g

3.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

3.4.2.1 Realizada através método da diluição em Ágar

Para a polimixina B além do método de difusão em discos, empregou-se o método de diluição em Ágar, utilizando soluções deste fármaco nas concentrações previamente estabelecidas: 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 6 μ g/mL, 8 μ g/mL, 16 μ g/mL, 32 μ g/mL e 64 μ g/mL.

O Ágar Mueller-Hinton foi preparado de acordo com as especificações do fabricante, após o meio atingir temperatura de aproximadamente 50°C, acrescentou-se o volume de solução antimicrobiana calculado previamente. Foram distribuídos 22mL do meio de cultura contendo a solução antimicrobiana em placas 20X90mm. Como realizado no TSA, obteve-se uma suspensão bacteriana, com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, e semeou-se em “spots” com o auxílio de alça de platina (\cong 10 μ L), respeitando-se rigorosamente a distância de 20mm entre as cepas. Em uma placa foram avaliadas aproximadamente 28 cepas diferentes. Após o período de incubação procede-se a leitura, que é caracterizada como positiva caso ocorra crescimento no local da semeadura, e negativa quando ocorrer ausência de crescimento nas concentrações testadas. O teste foi realizado em duplicata.

3.4.1.2 Pelo método da fita de E-teste

Em caldo Muller-Hinton (MH), promoveu-se uma suspensão bacteriana contendo 10^6 UFC/mL. Com o auxílio de um Swab esterilizado, realizou-se uma semeadura contínua em três a quatro direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma a se obter um crescimento uniforme em toda superfície da placa de Ágar Mueller-Hinton (OXOID), onde se aplicou a fita ao centro com a face voltada para cima. Incubou-se as placas a 35°C por 18 horas. Após o tempo de incubação procedeu-se a leitura do valor do MIC, determinado pela tangência da elipse formada com a inibição do crescimento, visualizado na fita.

Como controle da qualidade, usou-se as cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC27953). Realizou-se este teste com fitas contendo os antimicrobianos Polimixina B e Imipeném.

3.5 DETERMINAÇÃO PRESUNTIVA DA PRODUÇÃO DE METALO- β -LACTAMASE (MBLA) – DIFUSÃO EM DUPLO DISCO - TESTE FENOTÍPICO:

As cepas submetidas a este teste foram selecionadas a partir dos resultados obtidos no TSA, e para tal, o critério de seleção utilizado foi: resistência aos carbapenemas (imipeném e meropeném) e resistência ou grau intermediário de suscetibilidade à ceftazidima.

Após a seleção, foi necessária a padronização do teste, realizado segundo Arawaka et al. (2000). Devido ao fato de não existir disponibilidade comercial de cepas controle positivo (ATCC), selecionou-se um grupo de 20 cepas suspeitas (resistente aos carbapenemas e resistente ou intermediária a ceftazidima) e submeteu-se ao teste seguindo o protocolo descrito por Arawaka et al. (2000).

Em caldo Muller-Hinton (MH), promoveu-se uma suspensão bacteriana contendo 10^6 UFC/mL. Com o auxílio de um Swab esterilizado, realizou-se uma semeadura contínua em três a quatro direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma a obter-se um crescimento uniforme em toda superfície da placa de Ágar Mueller-Hinton (OXOID). Dois discos de ceftazidima (CAZ/30 μg) foram aplicados na placa, com 4 a 5 cm de distância entre eles. Um outro disco, de papel de filtro foi colocado próximo a um dos discos de CAZ

a uma distância de 1,0 a 2,5 cm. Um volume de 5 μ L de uma solução de EDTA 100mM, previamente preparada, foi adicionado ao disco de papel de filtro e a placa foi incubada “overnight” a 37°C. Nos casos em que a cepa selecionada apresentou-se resistente aos carbapenemas e com grau de suscetibilidade intermediário à ceftazidima o teste foi realizado utilizando discos de imipeném.

A positividade deste teste é determinada quando há um aumento no halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor do disco de ceftazidima que se encontrava próximo ao disco contendo o EDTA, facilmente determinado quando comparadas ao disco de ceftazidima isolado. Em etapa subsequente a identificação de uma cepa positiva (Fig.2), procedeu-se o E-test para Mbla, contendo imipeném com EDTA (Fig.3). Após a confirmação da produção de Mbla pela cepa, as outras bactérias selecionadas foram submetidas ao mesmo teste.

Entretanto, por se tratar de uma etapa de padronização, antes de submeter todas as cepas à análise, alguns testes controle foram realizados, com o intuito de se aumentar a confiabilidade do teste:

1. Uma placa de ágar Muller-Hinton foi semeada com a cepa positiva ao teste anterior, onde foram aplicados dois discos de papel de filtro, e em cada um adicionou-se um volume de 5 μ L e 10 μ L da mesma solução de EDTA empregada anteriormente (Fig. 4).
2. Realizou-se o teste de forma idêntica, utilizando antimicrobianos de outros grupos, diferentes dos de β -lactâmicos, como o aminoglicosídeo (gentamicina) (Fig. 5).

Realizou-se também o teste com cepas sabidamente negativas, observando-se que não houve distorção no halo de inibição de crescimento.

Com resultados satisfatórios e com o método padronizado, as 102 cepas selecionadas anteriormente foram submetidas ao teste.

3.6 DETECÇÃO DOS GENES IMP-1 E SPM-1, CODIFICADORES DE METALO- β -LACTAMASES, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) – TESTE GENOTÍPICO:

Foram submetidas a este teste, as cepas que apresentaram positividade no teste fenotípico de determinação presuntiva da produção de metalo- β -lactamase realizado segundo Arawaka e colaboradores (2000).

Para a detecção final dos genes de interesse pela PCR, foram necessárias etapas anteriores de extração e quantificação do DNA total das cepas bacterianas. Após estas etapas, o DNA genômico extraído foi utilizado nas PCR, e posteriormente aplicado em uma corrida eletroforética para a visualização do resultado.

3.6.1 Extração e Quantificação do DNA:

A extração do DNA de todas as cepas testadas, foi realizada através do kit de extração de DNA da BioRad (Quantum Prep^R Aqua Purê Genomic DNA Isolation Kit BioRad). Contudo, na fase inicial do estudo, foram testadas paralelamente outras formas de extração de DNA de *P. aeruginosa*: pelo calor, submetendo o material a fervura (100°C) e através de um outro kit de extração - Kit DNAzol^R (Genomic DNA isolation Reagent Molecular Research Center, Inc.).

Os três métodos foram padronizados utilizando-se uma cepa de *P. aeruginosa* sabidamente positiva para IMP-1 e SPM-1, gentilmente cedidas por pelo Laboratório de Controle de Infecção (Hospital das Clínicas) da USP. Os métodos foram considerados efetivos para a extração, quando bandas de DNA foram visualizadas em gel de agarose submetido à eletroforese, após a execução da PCR. A quantidade de DNA também foi testada nesta etapa de padronização, utilizando em apenas uma reação para cada gene 0.5 μ L de DNA, e nas outras, 1.0 μ L.

A quantificação é automatizada e baseia-se no princípio de um espectrofotômetro. Submete-se 2 μ L do DNA total no NanoDrop, aparelho que fornece a concentração do DNA em ng/mL.

3.6.2 PCR para IMP-1

Reação: As reações de amplificação foram preparadas em gelo, com um volume total de 25µL por tubo, compreendendo: 2.5µL de tampão de enzima da PCR-10X isento de MgCl₂, 1.25µL de MgCl₂, 2.5µL de solução de deoxinucleotídeos a 0.2mM, 1.0 µL de cada primer, 1.0µL do DNA genômico de cada cepa a aproximadamente 25ng/µL, 2.5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), completando-se o volume com água milliQ esterilizada. A mistura foi submetida a um “spin” com o objetivo de promover a mistura dos componentes do “Master Mix”.

Para a amplificação do gene IMP-1, foi utilizado um par de primers (5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3' e 5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3') prescritos por Senda e colaboradores (1996).

Amplificação:

As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer, programado para uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação com a seguinte programação: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1.5 minutos.

Em cada experimento realizado, estavam presentes uma reação utilizando uma cepa padrão contendo o gene pesquisado (controle positivo) e, uma contendo apenas os componentes da mistura, isenta de DNA (controle negativo).

Eletroforese: Os produtos obtidos com as amplificações, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em temperatura ambiente a 90 volts. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 1 X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular de 123pb DNA Ladder (Gibco BRL).

Visualização dos produtos amplificados: Corou-se o gel em brometo de etídio 1% durante 15 minutos, fotografou-se em luz UV no sistema VSD (Pharmacia).

3.6.3 PCR para SPM-1

Reação: As reações de amplificação foram preparadas em gelo, com um volume total de 25µL por tubo, compreendendo: 2.5µL de tampão de enzima da PCR-10X isento de MgCl₂, 1.25µL de MgCl₂, 2.5µL de solução de deoxinucleotídeos a 0.2 mM, 2.0 µL de cada primer na concentração de 20pmol, 1.0µL do DNA genômico de cada cepa a aproximadamente 25ng/µL, 2.5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), completando-se o volume com água milliQ esterilizada. A mistura foi submetida a um “spin” com o objetivo de promover a mistura dos componentes do “Master Mix”.

Para a amplificação do gene SPM-1, foi utilizado um par de primers (5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' e 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3') prescritos por Gales e colaboradores (2003).

Amplificação:

As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer, programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 40°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 1 minuto.

Em cada experimento realizado, estavam presentes uma reação utilizando uma cepa padrão contendo o gene pesquisado (controle positivo) e, uma contendo apenas os componentes da mistura, isenta de DNA (controle negativo).

Eletroforese: Os produtos obtidos com as amplificações, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em temperatura ambiente a 90 volts. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 1 X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular de 123pb DNA Ladder (Gibco BRL).

Visualização dos produtos amplificados: Corou-se o gel em brometo de etídio 1% durante 15 minutos, fotografou-se em luz UV no sistema VSD (Pharmacia).

3.7 ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL APÓS TRATAMENTO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO E SEPARAÇÃO PELA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE):

As cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas à extração de DNA e processadas empregando-se um protocolo adaptado daquele descrito por Sader e colaboradores (1994).

A restrição dos ácidos nucléicos foi feita usando-se a enzima de restrição *SpeI* 10U (GibcoBRL) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7.1 Preparo do material

As cepas bacterianas foram cultivadas em Ágar nutriente em tubo inclinado, incubadas a 37°C por 18 a 24 horas.

3.7.2 Extração do DNA cromossomal

Ressupendeu-se a cultura em 1mL de salina (NaCl 0.85%) esterilizada e posteriormente transferiu-se 200µL desta suspensão para um microtubo de 1.0mL. Este tubo foi centrifugado a 2000xg durante 3 minutos, obtendo-se um sedimento com peso aproximado de 10µg.

O sedimento foi lavado com 500µL de salina (NaCl 0.85%) esterilizada, e após a lavagem o sedimento foi homogenizado com 30µL de EDTA 50mM pH8.0. Adicionou-se 10µL de lisozima, 200µL de solução TEN e 240µL de agarose low melting a 2% previamente estabilizada a 50°C em banho-maria. Promoveu-se a homogeneização deste conjugado.

Rapidamente adicionou-se este conjugado aos plugs-mold (BioRad), cuidadosamente para não haver formação de bolhas. Estes moldadores foram incubados na geladeira por 20 minutos.

Os plugs foram transferidos para tubos contendo 1 mL de solução EC previamente identificados e incubados a 37°C “overnight”.

Após a incubação, os plugs foram lavados com solução de CHEF TE e a seguir acrescentou-se 1 mL de solução ES + proteinase K(40mg/mL), sendo 980 µL de solução ES e 20µL de proteinase K.

Os tubos foram incubados a 50°C por 24 horas. A solução contendo a proteinase K foi retirada completamente e posteriormente foram realizadas 5 lavagens com 10 mL de água milliQ, incubando a 50°C/30 minutos a cada lavagem. Após a última adicionou-se 1 mL de solução de CHEF-TE.

Cortou-se 1 plug em quatro partes iguais e transferiu-se duas dessas partes para um microtubo contendo 500µL de DNS, lavando 3 vezes com incubação por 1 hora a 5°C. Retirou-se o DNS e acrescentou-se 100µL de tampão de enzima 1X incubando a 4°C por 1 hora.

Retirou-se o tampão de enzima e adicionou-se : 0.5µL de *Spe I* (10U), 5µL de tampão 10X e avolumou-se com água milliQ para 50µL. Os tubos foram incubados a 37°C por 20 horas.

A reação foi paralisada com 100µL de TBE 0.75X, e os plugs usados na eletroforese.

3.7.3 Eletroforese em Gel de Agarose

O DNA submetido à restrição foi separado por eletroforese com agarose a 1% em tampão Tris-Borato EDTA, utilizando-se o sistema de eletroforese CHEF DR III (BioRad, Laboratories, Richmond, Calif.) nas seguintes condições:

Tempo de pulso: 0.5-25 segundos/19 horas e 30-60 segundos/3 horas

Tampão: TBE 0.5X (2.500mL) a 13°C

Voltagem: 6 Volts

Angulo de pulso: 120°

Como padrão de peso molecular, utilizou-se o Sigma Pulse Marker™, 50-1,000Kb.

3.7.4 Análise dos Perfis de DNA Cromossomal

Os géis foram corados pelo Brometo de etídio a 1% por 30 minutos e posteriormente observados no transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema Polaroid. As fotografias foram documentadas no sistema fotográfico VDS e posteriormente foi realizada a análise das bandas de cada cepa, permitindo a determinação de diferentes perfis.

Os genótipos foram designados por uma letra (de A a Z).

Os padrões obtidos por PFGE foram interpretados por inspeção visual seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (1995 e 1997), e posteriormente pelo sistema Gel Compar II (Applied Maths, Belgium), resultando em um dendrograma.

IV. RESULTADOS

A determinação do grupo sorológico das cepas bacterianas, mostrou a presença de 11 sorogrupos distintos. A tabela 2 correlaciona o grupo sorológico com a origem das amostras, onde se observa a maior prevalência do sorogrupo B (77/187) entre as cepas analisadas. A predominância deste sorogrupo é constatada em todos os hospitais que participaram do estudo, com exceção do hospital RJ2 onde o sorogrupo L (14/33) foi o mais prevalente. Das 187 cepas, apenas uma apresentou sorogrupo J, proveniente do hospital do Mato Grosso do Sul, duas apresentaram sorogrupo D sendo uma proveniente do hospital do Mato Grosso do Sul e uma do Hospital 1 do Rio de Janeiro. A figura 6 mostra o percentual de cada sorogrupo encontrado.

No cômputo geral 162 (86,6%) das 187 cepas foram resistentes a uma ou mais drogas. Particularizando-se esses resultados observou-se que apenas oito das 187 cepas (tabela 3), particularizando-se esses resultados observou-se que apenas oito das 187 cepas (4,3%) foram resistentes a polimixina B, frente à determinação da CMI pelo E-test e pelo método de diluição em ágar. Em relação aos carbapenemas, 58,3% das cepas foram resistentes para o imipeném e 57,2% para o meropeném. Das 187 cepas, 50,3% foram resistentes ao cefepime e 40,6% resistentes a ceftazidima. A figura 7 mostra comparativamente o comportamento das cepas frente aos antimicrobianos testados, de acordo com a origem das amostras.

Analisando a tabela 4, verificou-se um total de 59 perfis de resistência distintos. Observou-se que o perfil mais freqüente foi o de nº58, encontrado em 46 das 187 cepas (24,5%), onde somente a polimixina B apresentou atividade antimicrobiana. Em contrapartida, o segundo perfil mais freqüente foi o de nº1, encontrado em 25 cepas (13,4%), que se apresentaram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Chama-se a atenção também para a ocorrência de 11 cepas (5,9%), resistentes a 10 antimicrobianos (perfil nº56) e cinco (2,7%) resistentes aos 12 antimicrobianos, assinalando-se que a

resistência a polimixina foi detectada através do CMI e E-test. A tabela 5 faz uma correlação entre os perfis de resistência mais frequentes e os sorogrupos. Observou-se que a maior parte das cepas mais resistentes, pertencentes ao perfil nº58, são do sorogrupo B.

Em relação aos carbapenemas, 3 cepas (7.0%) do hospital RJ1, e 1 cepa (3.5%) do Espírito Santo foram resistentes ao meropeném e não ao imipeném, enquanto que 1 (2.32%) do hospital RJ1, 2 (6.06%) do hospital RJ2 e 1 (1.7%) do Mato Grosso do Sul, foram resistentes ao imipeném, mas não ao meropeném. Para o total de cepas estudadas esses valores correspondem a 2.1% de resistência ao meropeném e não ao imipeném, e de resistência ao imipeném e não ao meropeném (dados não computados em tabela).

A resistência determinada pelo TSA por meio da difusão em disco ao imipeném, foi confirmada pelo E-test, além de informar o valor da CMI para as cepas. Observou-se que as produtoras de metalo- β -lactamase apresentaram valores de CMI superiores ou iguais a 32 μ g/mL, enquanto que para as não produtoras da enzima os valores de CMI foram entre 8 e 16 μ g/mL, havendo apenas uma cepa, proveniente do hospital RJ1, Mbla negativa com resultado igual a 32 μ g/mL (dados não computados em tabela).

As 187 cepas de *P. aeruginosa* que participaram do estudo, mostraram-se sensíveis a polimixina B no método de difusão em ágar, entretanto, deste total, 8 cepas mostraram-se resistentes a este antimicrobiano quando submetidas aos testes de suscetibilidade determinados pela fita de E-teste (Fig.8), e método da diluição em ágar (Tab. 6). Descorrendo-se sobre esses resultados, observou-se que para quatro dessas cepas o valor da CMI foi de 4.0 μ g/mL, sendo duas do hospital RJ3, uma do hospital RJ1 e uma do Espírito Santo; 6.0 μ g/mL para uma cepa do ES; 8.0 μ g/mL para uma cepa do ES e uma do RJ1; e 12.0 μ g/mL detectado em uma cepa do RJ3 (dados não computados em tabela).

Conforme critério estabelecido anteriormente na metodologia, 102 cepas foram selecionadas para a realização do teste fenotípico de detecção da produção de metalo- β -lactamase através do método de difusão em disco.

Entre as cepas selecionadas, 87 apresentaram resultado positivo. Na tabela 7 verifica-se a distribuição das cepas produtoras de metalo- β -lactamase de acordo com a origem de isolamento. A figura 2 ilustra um resultado positivo deste teste, onde se pode verificar claramente uma distorção do halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor do disco de ceftazidima situado próximo ao disco impregnado com a solução de EDTA 100mM, tendo um segundo disco de ceftazidima isolado para a comparação. Este resultado positivo foi determinado entre um grupo de cepas, sem que se houvesse adquirido uma cepa padrão que funcionasse como controle positivo do teste, e para a confirmação do resultado, a cepa positiva foi submetida ao teste de produção de Mbla através do uso de uma fita de E-test contendo imipeném e EDTA. A figura 3 mostra o resultado obtido no E-test confirmando a positividade da cepa.

Em relação à execução da PCR, a figura 9 apresenta o gel de eletroforese onde se aplicou produtos da PCR para IMP-1 e SPM-1 realizados com DNA extraído pelos três métodos mencionados na metodologia, fervura e dois kits comerciais de extração. Verificou-se que os três métodos de extração tiveram o mesmo desempenho apresentando resultado satisfatório, e conseqüentemente, viabilizando o uso de qualquer um dos três.

As 87 cepas positivas ao teste de difusão em duplo disco foram submetidas à PCR, para a detecção de dois genes produtores de Mbla: IMP-1 e SPM-1. Como pode ser observado na tabela 8, 31 (35,6%) das 87 cepas positivas no teste fenotípico para Mbla, apresentaram um ou ambos os genes quando submetidas ao PCR, sendo 6,9% positivas para IMP-1 e 34,5% para SPM-1. Entre as seis cepas produtoras de IMP-1 cinco foram produtoras de SPM-1 concomitantemente sendo, duas do hospital RJ1, duas do hospital RJ2 e uma do Espírito Santo. O gene da SPM-1 foi encontrado em cepas de todas as regiões estudadas, apesar de não ter sido encontrado no hospital RJ3 do Rio de Janeiro.

As figuras 10 e 11 exemplificam resultados positivos para a detecção de IMP-1 e SPM-1, respectivamente. O resultado positivo, para as amostras é determinado comparando-se as bandas obtidas para os produtos da PCR, com o controle positivo que também foi aplicado e com as bandas do padrão de peso molecular, aplicado no mesmo gel.

No caso do IMP-1, observou-se que as bandas dos produtos estão alinhadas com a do controle positivo e com a banda de peso molecular de 587 pb, confirmando a positividade, já que o IMP-1 tem 587 pb. No caso do SPM-1 acontece o mesmo, sendo que neste caso, o peso molecular do produto é de aproximadamente 650 pb.

A análise de DNA pelo método de PFGE detectou 93 genótipos, onde o A apresentou maior prevalência, aparecendo em todas as regiões analisadas, como pode ser observado na tabela 9. A existência de 93 genótipos distintos revela a diversidade genética de *P. aeruginosa*. No hospital RJ1, das 43 cepas analisadas obteve-se 17 perfis, no RJ2 (33 cepas) foram encontrados outros 13 perfis e no RJ3 (17 cepas), determinou-se 3 genótipos. No ES, das 29 cepas analisadas obteve-se 10 genótipos, na BA um único perfil foi encontrado para as 6 cepas e no MS, as 59 cepas reproduziram 54 perfis distintos, verificou-se portanto que a grande contribuição para a variação observada na totalidade das amostras foi do MS.

As figuras 12 e 13 exemplificam géis de PFGE, sendo o primeiro composto por cepas produtoras de metalo- β -lactamase e o segundo por cepas Mbla negativas

O dendrograma (Fig. 14) confeccionado apenas com 6 genótipos obtidos das cepas Mbla positivas mostra o grau de similaridade entre elas e a relação do genótipo A com os restantes.

Para as 87 cepas produtoras de metalo- β -lactamase pelo teste fenotípico, o número de genótipos obtidos foi reduzido, passando de 93 (para o total de cepas) para 10 (somente as Mbla positivas) (Tab.10). Observa-se que o genótipo A, mais prevalente também entre as cepas positivas para Mbla, apresentou-se em 25 casos como produtoras de SPM-1, e entre estas 3 produzindo IMP-1 concomitantemente. Entre estes 10 genótipos, 5 não estão relacionados à produção de nenhum dos dois tipos de enzima.

Em relação ao perfil de resistência das 87 cepas Mbla positivas no teste fenotípico (Fig. 15), observa-se que 72 (82.7%) apresentaram-se resistentes à no mínimo 10

antimicrobianos. Entre as outras, uma cepa (1.1%) foi resistente a apenas 6 antimicrobianos, três (3.4%) resistentes a 7 antimicrobianos, cinco (5.7%) resistentes a 8 antimicrobianos, e uma (1.1%) resistente a 9 antimicrobianos (Fig. 15).

Ainda na tabela 10, verificou-se uma diversidade entres os grupos sorológicos determinados para as cepas produtoras de Mbla, tendo sido observados ao todo 6 sorogrupos distintos, e também cepas classificadas como auto-aglutináveis ou como não aglutináveis. Apesar desta diversidade, o sorogrupo B foi o mais prevalente, encontrado em 51 (58.6%) das 87 cepas Mbla positivas, e em 45 (80.3%) das 56 cepas Mbla positivas pertencentes ao genótipo A. Assim como para o sorogrupo, também foi verificada uma grande diversidade em relação aos espécimes clínicos, destacando-se o genótipo A, por sua freqüência em cepas isoladas de tecido cutâneo (12/54), seguido de urina (11/54) (Tab.10) .

Para analisar exclusivamente as 36 cepas positivas pela PCR, confeccionou-se a tabela 11, onde se observa as cepas que realmente produzem um tipo de metalo- β -lactamase, sendo IMP-1 ou SPM-1. Neste caso, 100% das cepas apresentaram-se resistentes a 10 ou mais antimicrobianos. Observou-se que em todas as regiões de origem de isolamento das cepas, detectou-se a SPM-1, entretanto para a IMP-1 isto não ocorreu, tendo sido encontrada esta enzima apenas nos hospitais RJ1 e RJ2 e no Espírito Santo. Entre estas cepas a diversidade observada anteriormente para os genótipo e grupo sorológico diminuiu. O número de genótipos decaiu de 10 para as cepas positivas ao teste fenotípico para 5, e a diversidade entre os sorogrupos de 8 para 3. Observa-se que se mantiveram as prevalências do genótipo A e do grupo sorológico B, tanto para IMP-1, quanto para SPM-1.

Tabela 1: Espécimes Clínicos analisados de acordo com a origem da amostra

| ESPÉCIME CLÍNICO | ORIGEM (N) | | | | | | TOTAL (187) |
|-----------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------------|
| | RJ1 (43) | RJ2 (33) | RJ3 (17) | ES (29) | BA (6) | MS (59) | |
| FEZES | 5 | 1 | - | - | - | 4 | 10 |
| LIQUIDO CEFALO RAQUIDIANO | - | 2 | - | 1 | - | - | 3 |
| PONTA DE CATETER | 3 | 1 | - | 2 | - | 3 | 9 |
| SANGUE | 8 | 5 | 1 | 2 | 2 | 7 | 25 |
| SECREÇÃO CUTANEA | 3 | 1 | - | 10 | - | - | 14 |
| SECREÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA | 4 | - | 3 | 1 | - | 14 | 22 |
| SECREÇÃO DE ESCARA | - | 4 | - | 1 | - | - | 5 |
| SECREÇÃO PERITONIAL | 2 | - | - | 2 | - | - | 4 |
| OUTRAS SECREÇÕES | - | 1 | - | 2 | - | 5 | 8 |
| TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR (TRI) | 4 | 1 | 8 | - | - | - | 13 |
| TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR (TRS) | 7 | 3 | 1 | 2 | - | 13 | 26 |
| TRATO URINÁRIO | 4 | 10 | 1 | 6 | 3 | 11 | 35 |
| OUTROS | 3 | 4 | 3 | - | 1 | 2 | 13 |
| TOTAL | 43 | 33 | 17 | 29 | 6 | 59 | 187 |

Tabela 2: Distribuição das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com o sorogrupo e origem de isolamento

| ORIGEM | Nº DE AMOSTRAS | SOROGRUPOS | | | | | | | | | | | |
|--------------|----------------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| | | B | E | L | F | G | A | M | H | I | D | J | NA ou AA |
| RJ1 | 43 | 21 | 4 | 4 | 3 | 1 | 4 | - | 1 | - | 1 | - | 4 |
| RJ2 | 33 | 13 | 1 | 14 | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - | - | 2 |
| RJ3 | 17 | 10 | 2 | 3 | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - |
| ES | 29 | 13 | 7 | - | 8 | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| BA | 6 | 5 | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| MS | 59 | 15 | 13 | - | 6 | 5 | - | - | 2 | 2 | 1 | 1 | 14 |
| TOTAL | 187 | 77 | 27 | 21 | 18 | 6 | 5 | 4 | 3 | 3 | 2 | 1 | 20 |

RJ1 – Hospital 1 do Rio de Janeiro, RJ2 – Hospital 2 do Rio de Janeiro, RJ3 – Hospital 3 do Rio de Janeiro, ES – Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Espírito Santo, BA - Laboratório Central de Saúde Pública do estado da Bahia, MS – Hospital do estado do Mato Grosso do Sul.

NA – não aglutinável

AA – auto- aglutinável

Tabela 3: Percentual de resistência das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aos 12 antimicrobianos testados pelo TSA de acordo com a origem de isolamento

| ORIGEM (N) | ANTIMICROBIANOS | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | CAZ | CAR | CPM | IPM | MER | ATM | GEN | AMI | CIP | TIM | TZP | PB* |
| RJ1(43) | 51.2 | 88.4 | 30.2 | 60.5 | 65.1 | 46.5 | 74.4 | 60.5 | 79.1 | 76.7 | 44.2 | 1.1 |
| RJ2 (33) | 54.5 | 75.5 | 33.3 | 72.7 | 66.6 | 45.6 | 69.7 | 51.5 | 66.6 | 66.6 | 42.4 | 0 |
| RJ3(17) | 70.6 | 94.1 | 88.2 | 94.1 | 94.1 | 70.6 | 94.1 | 88.2 | 88.2 | 94.1 | 70.6 | 1.6 |
| ES (29) | 31.0 | 86.2 | 55.2 | 68.9 | 72.4 | 79.3 | 93.1 | 93.1 | 79.3 | 86.2 | 55.1 | 1.6 |
| BA(6) | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 50.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 0 |
| MS (59) | 15.3 | 59.3 | 54.3 | 28.8 | 28.8 | 54.2 | 49.1 | 32.2 | 37.3 | 40.7 | 13.6 | 0 |
| TOTAL (187) | 40.6 | 77.5 | 50.3 | 58.3 | 57.2 | 56.1 | 71.1 | 58.8 | 65.2 | 67.4 | 40.1 | 4.3 |

*Resultado obtido com a execução do MIC pelo E-teste e pelo método de diluição em Agar.

CAZ-CEFTAZIDIMA, CAR-CARBENICILINA, CPM-CEFEPIME, IPM-IMIPENÊM, MER-MEROPENÊM, ATM-AZTREONAM, GEN-GENTAMICINA, AMI-AMICACINA, CIP-CIPROFLOXACINO, TIM-TICARCILINA+ACIDO CLAAVULANICO, TZP-PIPERACILINA+TAZOBACTAM, PB – POLIMIXINA B.

Tabela 4: Perfis de resistência das 187 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

| Perfil de sensibilidade | Perfil de resistência antimicrobiana | Nº de amostras | Perfil de sensibilidade | Perfil de Resistência antimicrobiana | Nº de amostras |
|-------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------------|--|----------------|
| 1 | Sensível | 25 | 31 | CAR/CPM/ATM/CIP/TIM/TZP | 1 |
| 2 | CAR | 3 | 32 | CAZ/CAR/IPM/MER/ATM/TIM/TZP | 1 |
| 3 | GEN | 2 | 33 | CAZ/CAR/CPM/ATM/GEN/AMI/TIM | 1 |
| 4 | ATM | 6 | 34 | CAR/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 2 |
| 5 | ATM/GEN | 1 | 35 | CAR/IPM/MER/GEN/AMI/CIP/TIM | 2 |
| 6 | ATM/CPM | 2 | 36 | CAR/CPM/IPM/MER/GEN/AMI/CIP/TIM | 3 |
| 7 | GEN/AMI | 4 | 37 | CAZ/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 1 |
| 8 | TIM/CAR | 2 | 38 | CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/CIP/TIM | 3 |
| 9 | CPM/CAR | 1 | 39 | CAR/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 4 |
| 10 | CAR/ATM/TIM | 2 | 40 | CAZ/CAR/CPM/MER/ATM/CIP/TIM/TZP | 1 |
| 11 | CAR/ATM/CPM | 2 | 41 | CAZ/CAR//MER/ATM/CIP/GEN/TIM/TZP | 1 |
| 12 | CAR/ATM/GEN | 1 | 42 | CAR/IPM/MER/AMI/GEN/CIP/TIM/TZP | 1 |
| 13 | CAR/ATM/CAZ | 1 | 43 | CAZ/CAR/IPM/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 2 |
| 14 | IPM/MER/ATM | 1 | 44 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/AMI/TIM/TZP | 1 |
| 15 | CAR/CPM/ATM/GEN | 1 | 45 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/CIP/TIM/TZP | 1 |
| 16 | CAR/CPM/ATM/IPM | 1 | 46 | CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 2 |
| 17 | CAR/ATM/IPM/MER | 1 | 47 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/CIP/TIM | 2 |
| 18 | CAR/CAZ/GEN/CIP | 1 | 48 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/GEN/AMI/CIP/TIM | 1 |
| 19 | IPM/ATM/GEN/AMI | 2 | 49 | CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP | 4 |
| 20 | CAR/CPM/IPM/MER/ATM | 1 | 50* | CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP/PB | 1 |
| 21 | CAR/IPM/MER/GEN/CIP | 1 | 51 | CAZ//CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP | 2 |
| 22 | CAR/ATM/GEN/AMI/CIP | 2 | 52 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/CIP/TIM/TZP | 2 |
| 23 | CAR/IPM/MER/ATM/GEN/AMI | 1 | 53 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP | 1 |
| 24 | CAR/CPM/ATM/TGEN/CIP/TIM | 1 | 54 | CAZ/CAR/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP | 5 |
| 25 | CAZ/CAR/CPM/ATM/GEN/TIM | 1 | 55* | CAZ/CAR/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP/PB | 1 |
| 26 | CAZ/CAR/IPM/MER/ATM/TIM | 1 | 56 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 11 |
| 27 | CAZ/CAR/CPM/ATM/TIM/TZP | 1 | 57* | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/PB | 1 |
| 28 | CAR/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM | 8 | 58 | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP | 46 |
| 29 | CAR/CPM/ATM/GEN/CIP/TIM | 1 | 59* | CAZ/CAR/CPM/IPM/MER/ATM/GEN/AMI/CIP/TIM/TZP/PB | 5 |
| 30 | CAZ/CAR/ATM/GEN/CIP/TIM | 1 | | | |
| TOTAL | | 78 | TOTAL | | 109 |

*Resultado da Polimixina B (PB): MIC \geq 4 pelo E-test e pelo método de diluição em ágar.

CAZ-ceftazidima, CAR-carbenicilina, CPM-cefepime, IPM-imipenem, MER-meropenem, ATM-aztreonam, GEN-gentamicina, AMI-amicacina, CIP-ciprofloxacina, TIM-ticarcilina+Acido clavulanico, TZP-Piperacilina+Tazobactam.

Tabela 5: Distribuição dos perfis de resistência mais prevalentes de acordo com os sorogrupos

| Nº DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIA NOS | Nº DE CEPAS | SOROGRUPOS | | | | | | | | | | |
|---|-------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----------------|---|
| | | B | L | F | E | M | J | A | I | G | NA OU AA | |
| 59 | 5 | 4 | | 1 | | | | | | | | |
| 58 | 46 | 32 | 5 | 4 | 1 | 3 | | | | | | 1 |
| 56 | 11 | 5 | 1 | 2 | 1 | 1 | | | | | | 1 |
| 54 | 5 | 1 | 2 | | 1 | | | | | | | 1 |
| 49 | 4 | 3 | | | 1 | | | | | | | |
| 39 | 4 | 4 | | | | | | | | | | |
| 38 | 3 | | | | 2 | | | | | | | 1 |
| 36 | 3 | | | | 1 | | | | 1 | | | 1 |
| 28 | 8 | 1 | 1 | | 5 | | | | | | | 1 |
| 7 | 4 | 1 | | 1 | 1 | | 1 | | | | | |
| 4 | 6 | 1 | | 1 | | | | 1 | 2 | 1 | | |
| 2 | 3 | 1 | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 1 | 25 | 7 | | 2 | 6 | | | 1 | | 4 | | 5 |

NA – não aglutinável
AA – auto- aglutinável

Tabela 6: Percentual de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à polimixina B de acordo com a origem de isolamento

| ORIGEM | RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B | | |
|--------------|---|--|---|
| | MIC – DILUIÇÃO EM ÁGAR E E-TESTE (N) ^a | PERCENTUAL DE RESISTÊNCIA ENTRE AS 187 CEPAS | PERCENTUAL DE RESISTÊNCIA ENTRE AS CEPAS DE MESMA ORIGEM |
| RJ1(43) | 2 | 1.07 | 4.65 |
| RJ2(33) | 0 | - | - |
| RJ3(17) | 3 | 1.60 | 17.6 |
| ES(29) | 3 | 1.60 | 10.34 |
| BA(06) | 0 | - | - |
| MS(59) | 0 | - | - |
| Total | 8 | 4.30 | - |

^a- número absoluto de cepas resistentes encontradas através do método

Tabela 7: Distribuição das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β -lactamase de acordo com a origem de isolamento

| ORIGEM | Nº DE CEPAS TESTADAS | CEPAS POSITIVAS AO TESTE FENOTÍPICO | | |
|--------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| | | N | % entre as testadas | % entre o total de cepas do estudo |
| RJ1 | 26 | 23 | 88.5 | 53.5 |
| RJ2 | 22 | 20 | 90.9 | 60.6 |
| RJ3 | 16 | 15 | 93.7 | 88.2 |
| ES | 20 | 17 | 85.0 | 58.6 |
| BA | 6 | 6 | 100 | 100 |
| MS | 12 | 6 | 50.0 | 10.2 |
| Total | 102 | 87 | 85.3 | 46.0 |

Tabela 8: Frequência e distribuição das cepas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para Mbla pelos testes fenotípico e genotípico

| ORIGEM | MBLA POSITIVAS | | TIPO DE MBLA | |
|--------------|----------------------|-----------|----------------|------------------|
| | TESTE FENOTÍPICO (N) | PCR (N) | IMP-1 N (%)* | SPM-1 N (%)* |
| RJ1 | 23 | 10 | 2 (8.7) | 10 (43.5) |
| RJ2 | 20 | 5 | 3 (15.0) | 4 (20.0) |
| RJ3 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| ES | 17 | 4 | 1 (5.7) | 4 (23.5) |
| BA | 6 | 6 | 0 | 6 (100) |
| MS | 6 | 6 | 0 | 6 (100) |
| Total | 87 | 31 | 6 (6.9) | 30 (34.5) |

* percentuais calculados sobre as 87 cepas Mbla positivas no teste fenotípico

Tabela 9: Distribuição e frequência dos perfis genômicos das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que participaram do estudo de acordo com a origem de isolamento

| ORIGEM (N) | PERFIL GENÔMICO (N) | Nº DE GENÓTIPOS OBTIDOS |
|---------------|---|-------------------------------|
| RJ1(43) | A(12),B(3),C(1),D(1),E(2),F(1),G(2),H(5),I(2),J(2),K(1),L(4),M(2),N(1),O(2), ϕ (2) | 17 |
| RJ2(33) | A(7), P(2),Q(1),R(9), S(1),T(3), U(4), V(1), X(1), ϕ (4) | 13 |
| RJ3(17) | A(13), A1(2), ϕ (2) | 3 |
| ES(29) | A(12),Y(3),Z(2),W(4), W1(2), ϕ (6) | 10 |
| BA(6) | A(6) | 1 |
| MS (59)* | A(6), ϕ (53) | 54 |

* Perfis muito variáveis, mostrando-se mais prevalente e de maior importância para o estudo o perfil A, pois corresponde ao perfil das cepas Mbla+ nesta região.

ϕ Perfis variáveis de cepas Mbla-.

A1 é subtipo de A por isso foram computados como mesmo genótipo.

W1 é subtipo de W por isso foram computados como mesmo genótipo.

Tabela 10: Distribuição dos perfis de PFGE de cepas produtoras de metalo- β -lactamase de acordo com a origem de isolamento, grupo sorológico, perfil de resistência, espécime clínico e tipo de Mbla

| PERFIL GENÔMICO (N) ¹ | ORIGEM DE ISOLAMENTO (N) ¹ | SOROGRUPO (N) ¹ | Nº DO PERFIL DE RESISTENCIA(N) ¹ | ² ESPÉCIME CLÍNICO (N) ¹ | IMP-1 | SPM-1 |
|----------------------------------|--|--------------------------------|--|--|-------|-------|
| A(54) | RJ1(10),RJ2(7),RJ3(13),ES(12),BA(6)MS(6) | B(44),L(3),M(3),E(2)F(1),NA(1) | 59(5),58(36),57(1),56(5),53(1),52(2),51(1),50(1),49(2) | CUT(12),U(10),TRI(8),TRS(6),S(6),FC(5),F(3),CA(2),E(1),SP(1) | 3 | 25 |
| A1(2) | RJ3(2) | B(1),L(1) | 58(2) | U(1),S(1) | - | - |
| D(1) | RJ(1) | B | 55(1) | TRI(1) | - | - |
| H(3) | RJ1(3) | F(2),AA(1) | 37(1),58(2) | TRS(1),S(2) | - | - |
| J(2) | RJ1(2) | B(1),F(1) | 18(1),58(1) | TRS(1),S(1) | - | 1 |
| L(4) | RJ1(4) | B(4) | 35(1),43(2),54(1) | TRS(1)TRS(1),CA(1),FC(1) | - | - |
| M(2) | RJ1(1) | D | 32(1) | S(1) | - | - |
| O(2) | RJ1(2) | E | 35(1),54(1) | TRS(1),TRI(1) | - | - |
| R(8) | RJ2(8) | L(7),NA(1) | 39(2),47(1),54(3),58(2) | U(3),TRI(1)E(1),S(1)OS(1),O(1) | - | 1 |
| U(4) | RJ2(4) | L(4) | 58(1) | U(1) | 2 | 1 |
| W(3) | ES(3) | F | 55(2),58(1) | U(2),CA(1) | 1 | 2 |
| W1(2) | ES(2) | E(1),F(1) | 30(1),50(1) | CUT(2) | - | - |

1 – número de cepas

2 -CUT- secreção cutânea, U-urina, TRI-trato respiratório inferior, TRS-trato respiratório superior, S-sangue, FC-secreção de ferida cirúrgica, F-fezes, CA-ponta de cateter, E-secreção de escara, SP- secreção peritonial, OS-outras seções, O-outras.

Tabela 11: Perfil genômico e sorogrupo das 31 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* positivas ao teste genotípico de detecção de metalo- β -lactamase

| TIPO DE MBLA (N) | PERFIL GENÔMICO (N) | ORIGEM DE ISOLAMENTO | SOROGRUPO (N) | | | PERFIL DE RESISTÊNCIA |
|---------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------|---|---|--------------------------------|
| | | | B | L | F | |
| IMP-1 (6) | A | RJ1(2), RJ2(1) | 3 | | | 59(2),58(1) |
| | R | RJ2(2) | | 2 | | 59(1),52(1) |
| | W | ES(1) | | | 1 | 55(1) |
| SPM (30) | A | RJ1(9),RJ2(2),ES(2),BA(6),MS(6) | 24 | 1 | | 59(1),58(17),56(4),53(1),49(1) |
| | J | RJ1(1) | 1 | | | 58(1) |
| | R | RJ2(1) | | 1 | | 58(1) |
| | U | RJ(1) | | 1 | | 58(1) |
| | W | ES(2) | | | 2 | 58(1),55(1) |

FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES

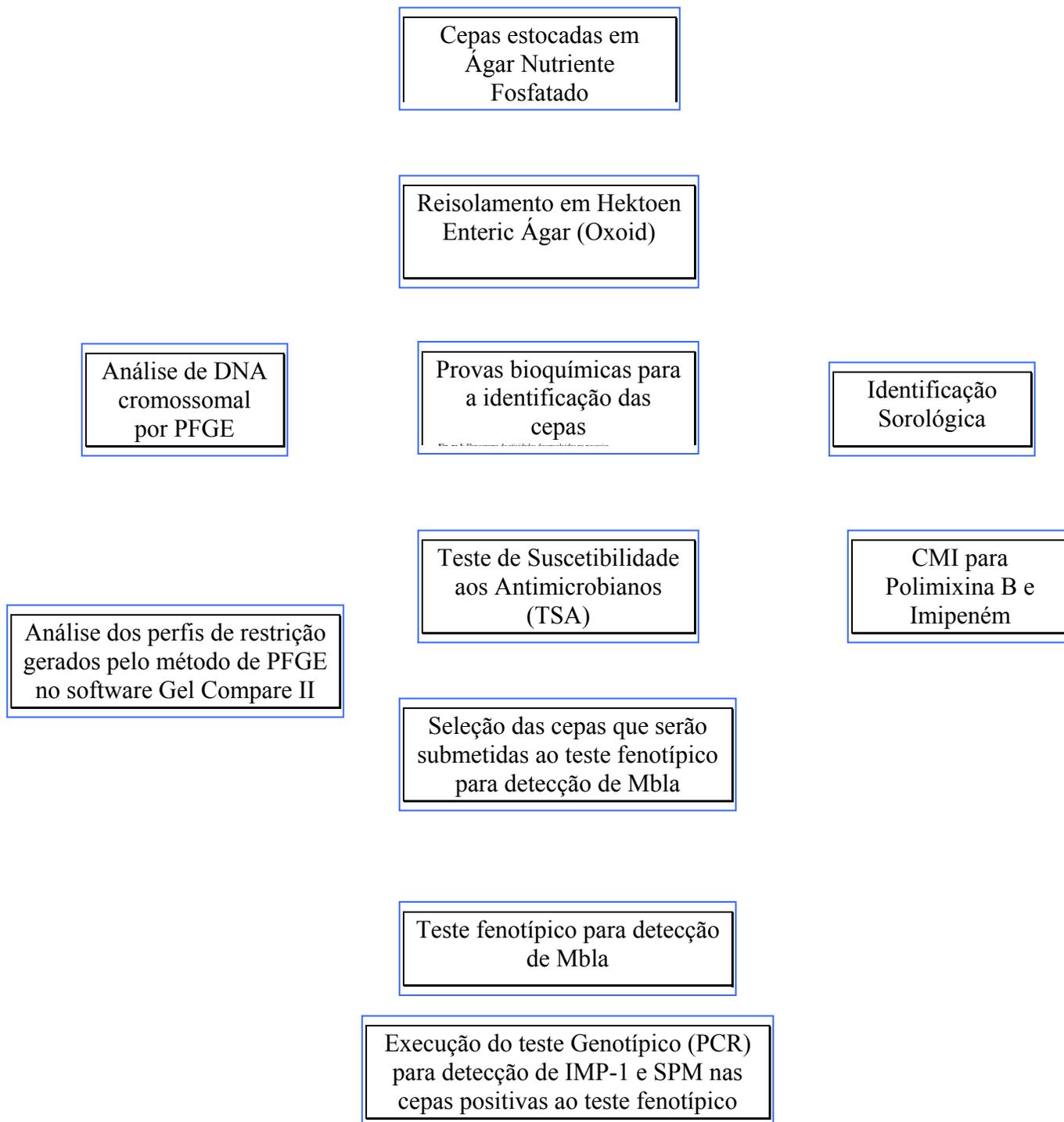


Figura 1: Fluxograma de atividades desenvolvidas na pesquisa.

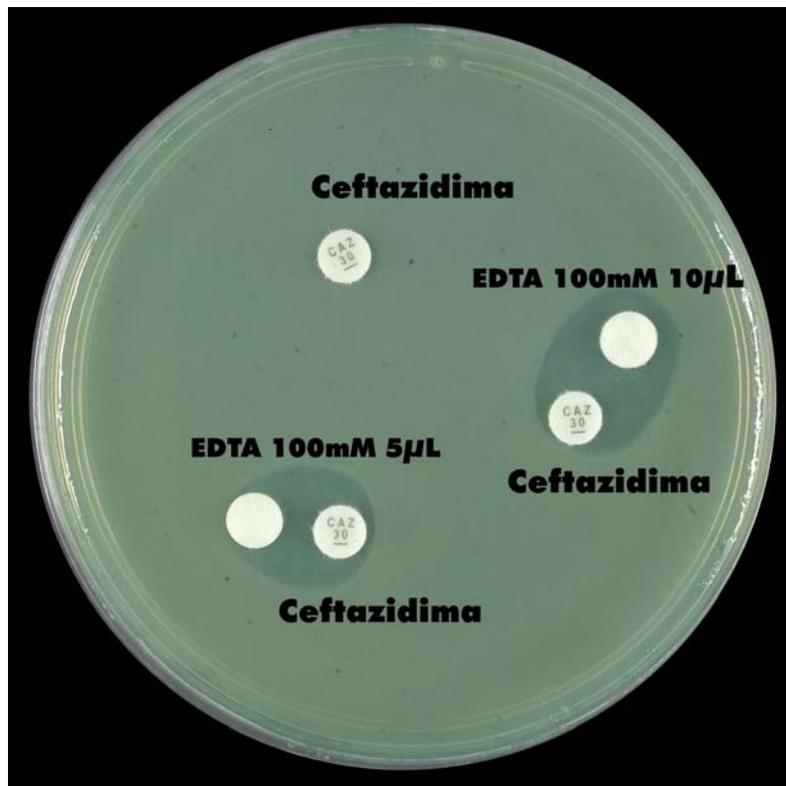


Figura 2: Teste de difusão em duplo disco para detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase em amostra de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando discos de ceftazidima (CAZ) e disco contendo EDTA.

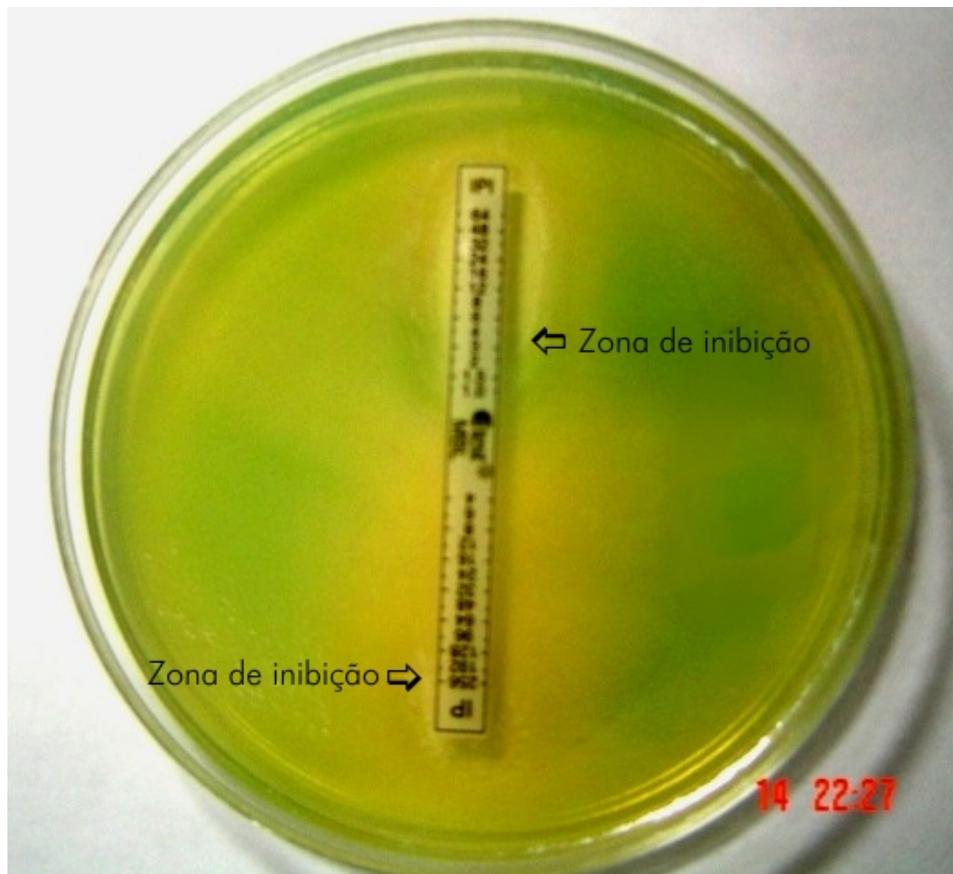


Figura 3: E-teste para detecção de cepa produtora de metalo- β -lactamase utilizando fita contendo EDTA e imipeném.



Figura 4: Controle do teste de difusão em duplo disco para detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase em amostra de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando apenas discos contendo EDTA em diferentes volumes.

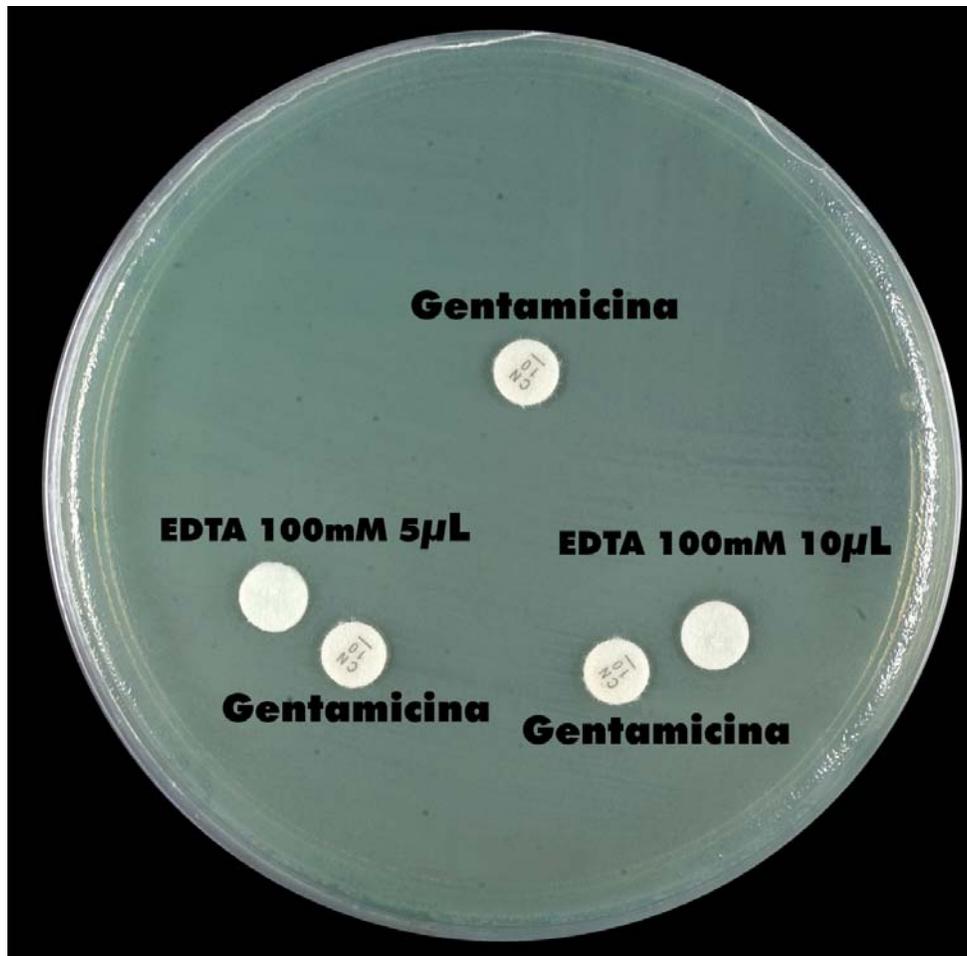


Figura 5: Controle negativo do teste de difusão em duplo disco para detecção fenotípica da produção de metalo- β -lactamase em amostra de *Pseudomonas aeruginosa* com antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos utilizando discos de gentamicina (GEN) e EDTA.



Figura 6: Distribuição dos grupos sorológicos determinados para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

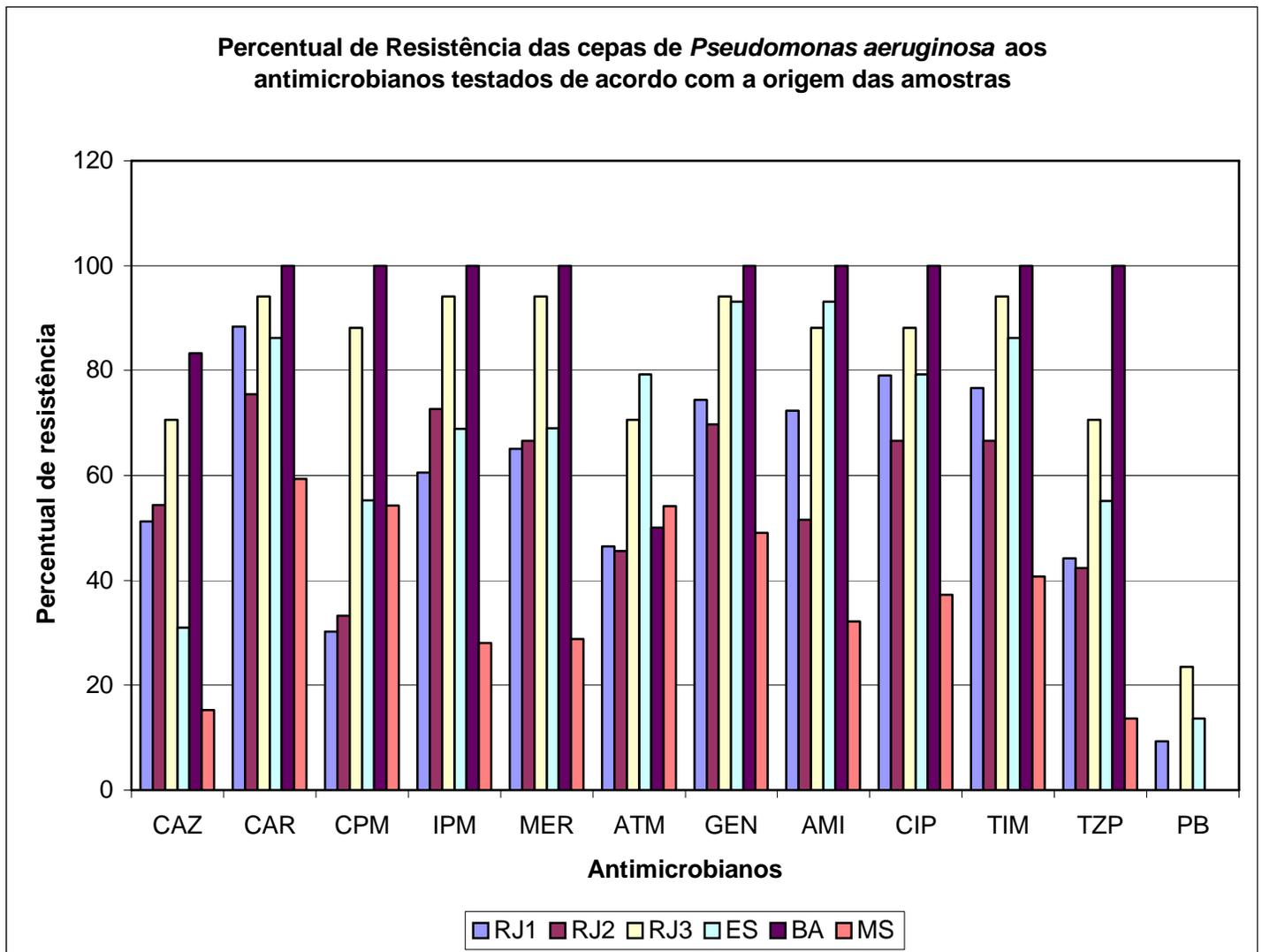


Figura 7: Percentual de resistência das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos testados de acordo com a origem de isolamento.



Figura 8: Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente à Polimixina B pelo E-test.

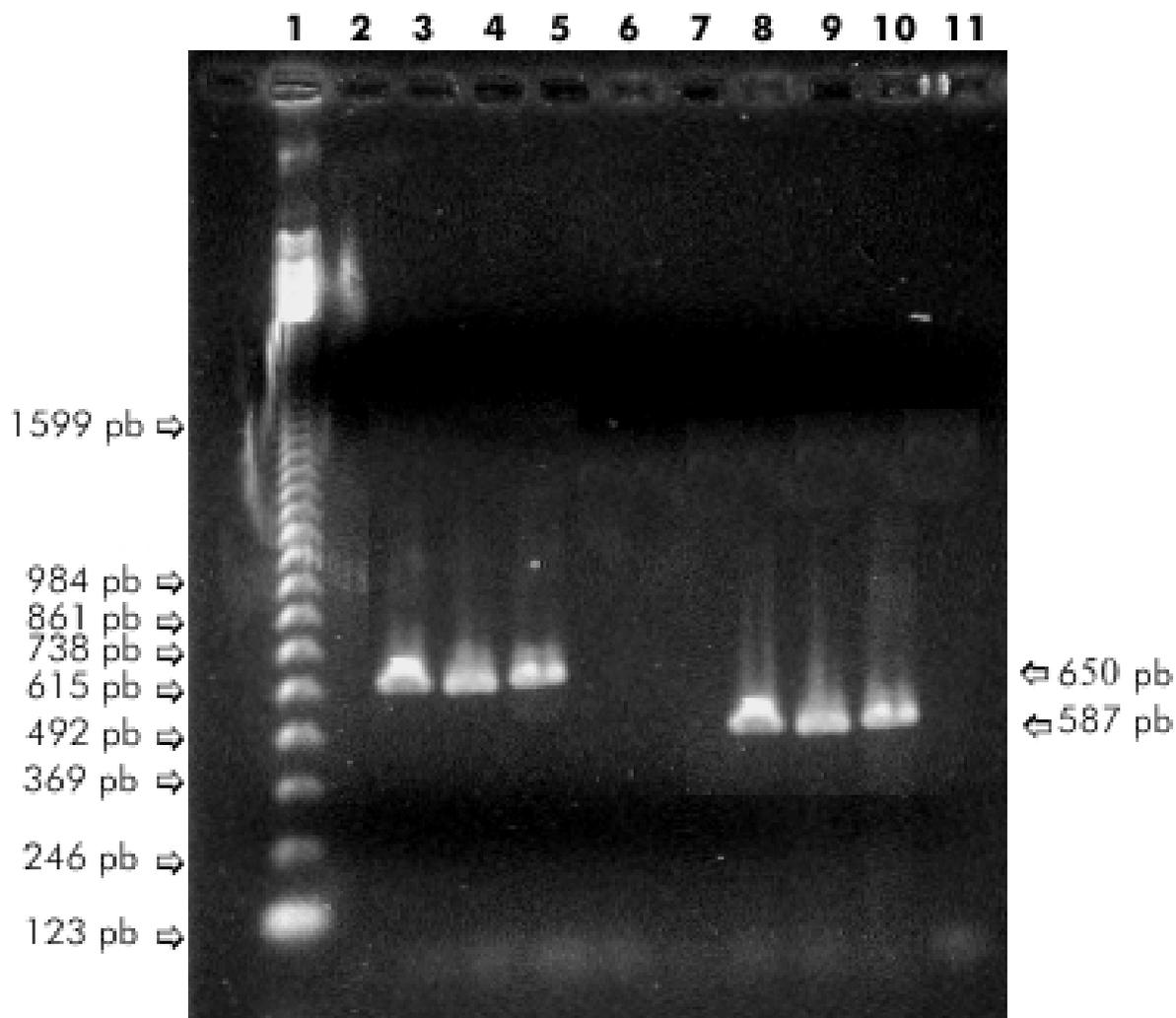


Figura 9: Gel de agarose com os produtos da PCR para cepa padrão de SPM-1 e IMP-1 utilizando-se três diferentes métodos de extração de DNA.

Linha 1 – marcador de peso molecular; linha 2, produto de SPM-1 padrão extraído pelo método da fervura usando 0.5μL de DNA; linha 3, produto de SPM-1 extraído pelo método da fervura usando 1.0μL de DNA; linha 4, produto de SPM-1 extraído pelo kit DNazol usando 1.0μL de DNA; linha 5 produto de SPM-1 extraído pelo kit da BioRad usando 1.0μL de DNA; linha 6, controle negativo do PCR para SPM-1; linha 7, produto de IMP-1 padrão extraído pelo método da fervura usando 0.5μL de DNA; linha 8, produto de IMP-1 extraído pelo método da fervura usando 1.0μL de DNA; linha 9, produto de IMP-1 extraído pelo kit DNazol usando 1.0μL de DNA; linha 10 produto de IMP-1 extraído pelo kit da BioRad usando 1.0μL de DNA; linha 11, controle negativo do PCR para IMP-1.

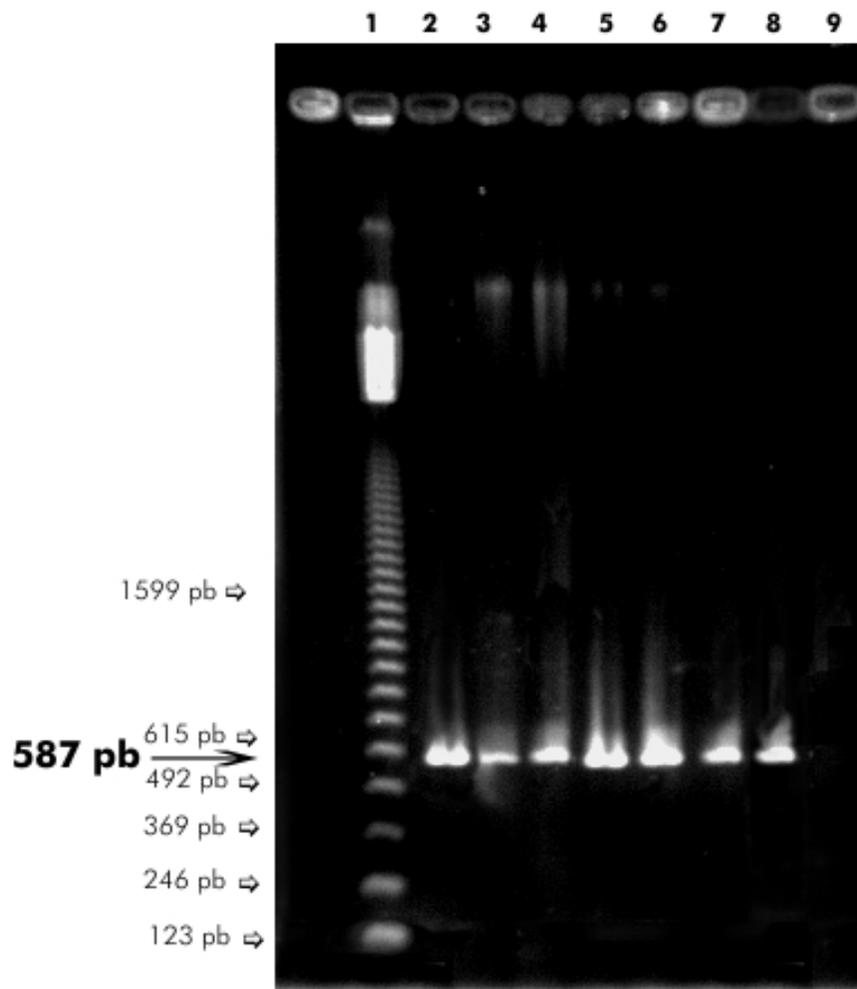


Figura 10: Gel de agarose com produtos da PCR para detecção do gene IMP-1

Linha 1 - padrão de peso molecular; linhas 2 – 8, amostras positivas para IMP-1, linha 2 RJ1/6; linha 3 RJ1/9; linha 4 RJ2/48; linha 5 RJ2/71; linha 6 RJ2/74; linha 7 ES/07; linha 8 controle positivo; linha 9 controle negativo.

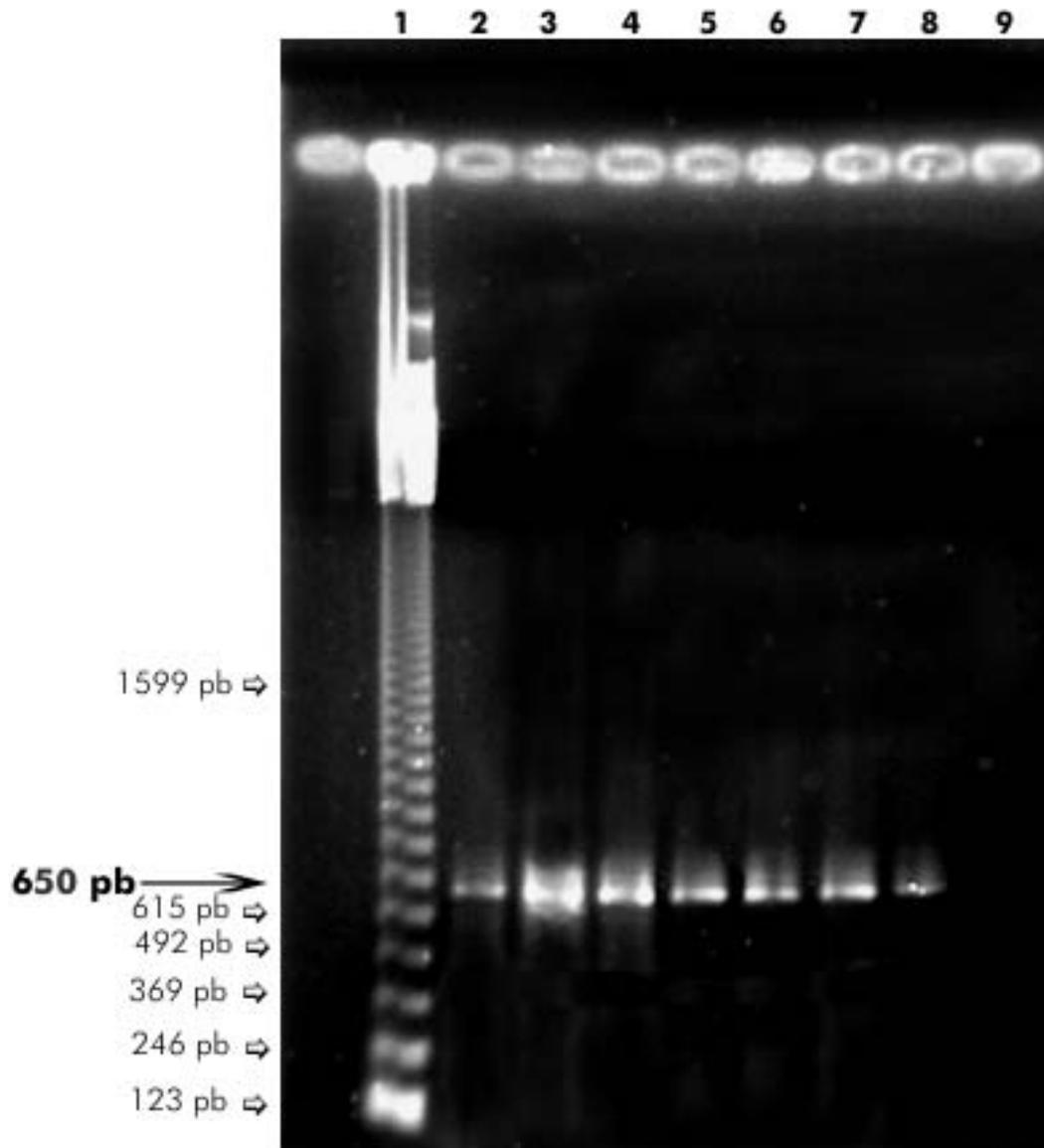


Figura 11: Gel de agarose com produtos da PCR para detecção do gene SPM-1.

Linha 1 - padrão de peso molecular; linhas 2 – 8, amostras do Mato Grosso do Sul positivas para SPM-1, linha 2 MS/8; linha 3 MS/38; linha 4 MS/39; linha 5 MS/40; linha 6 MS/43; linha 7 MS/57; linha 8 controle positivo; linha 9 controle negativo.

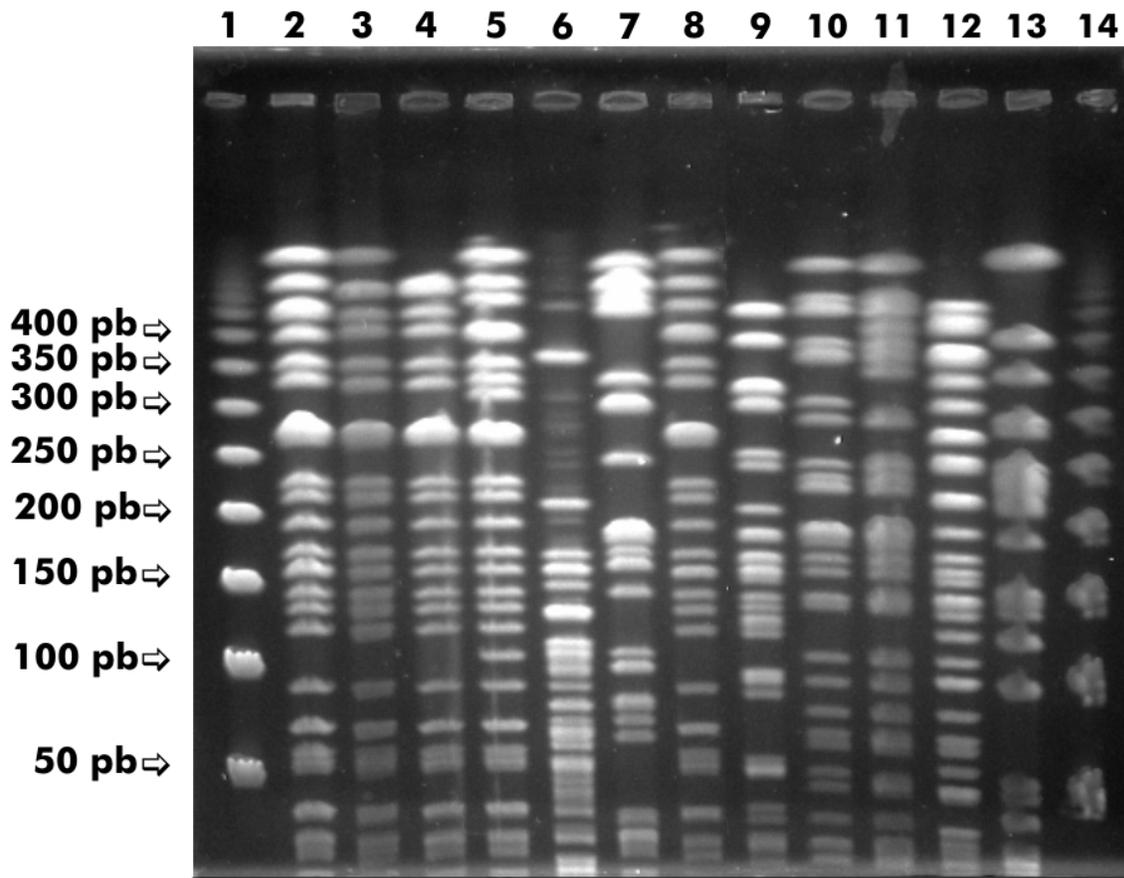


Figura 12: Gel de PFGE exemplificando alguns perfis de cepas produtoras de Mba.

Linhas 1 e 14 – λ marcador de peso molecular. Perfil A: linha 2 – RJ1/3; linha 3 – RJ1/13, linha 8 - RJ1/116. Perfil A1 – linha 4 RJ3/14.1, linha 5 RJ3/16. Perfil D: linha 6 – RJ1/22. Perfil H: linha 7 – RJ1/155. Perfil R: linha 9 – RJ2/48. Perfil W: linha 10 – ES/02. Perfil W1: linha 11 – ES/117. Perfil L: linha 12 - RJ1/ 121. Perfil M: linha13 – RJ1/166.

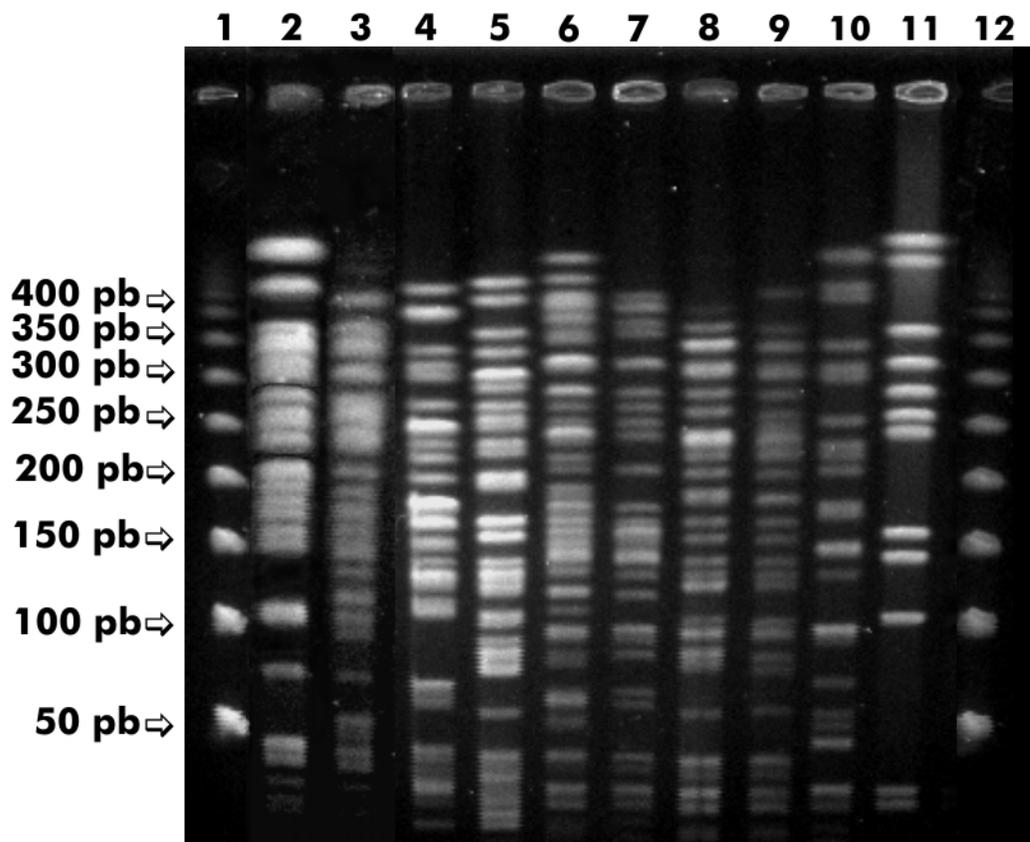


Figura 13: Gel de PFGE exemplificando alguns perfis de cepas não produtoras de MblA provenientes do Mato Grosso do Sul.

Linhas 1 e 12 – λ marcador de peso molecular. Linhas 2 a 12 – perfis variáveis de cepas do MS. Linha 2 – MS/29; linha 3 – MS/30; linha 4 – MS/71; linha 5 – MS/73; linha 6 – MS/75; linha 7 – MS/76; linha 8 – MS/78; linha 9 – MS/80; linha 10 – MS/81; linha 11 – MS/82.

Pearson correlation (Opt:5.00%) [0.0%-100.0%]
PFGE **PFGE**

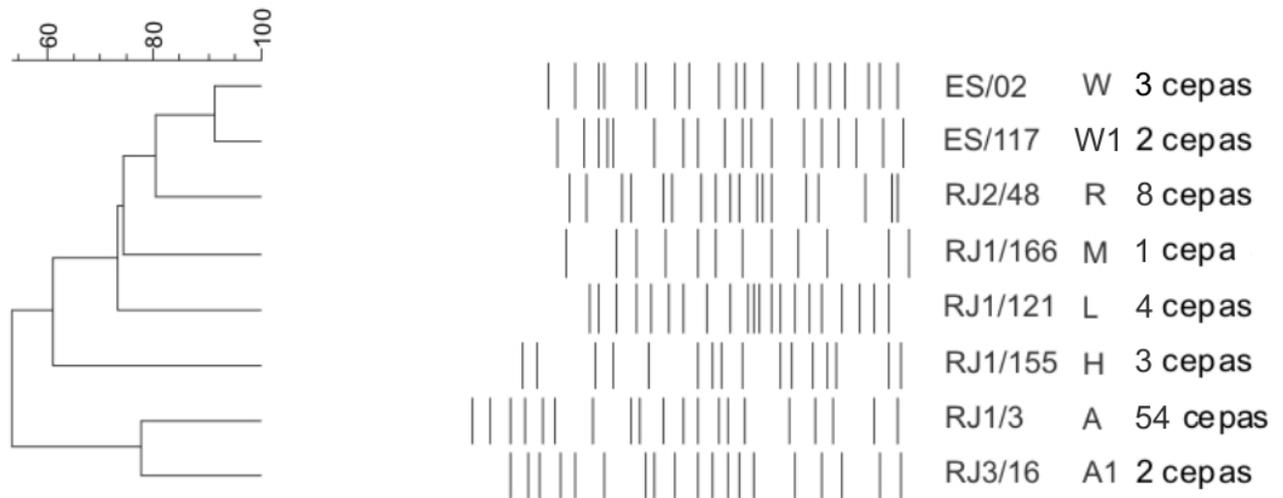


Figura 14: Dendrograma confeccionado com 6 genótipos distintos com cepas produtoras de Mbla.

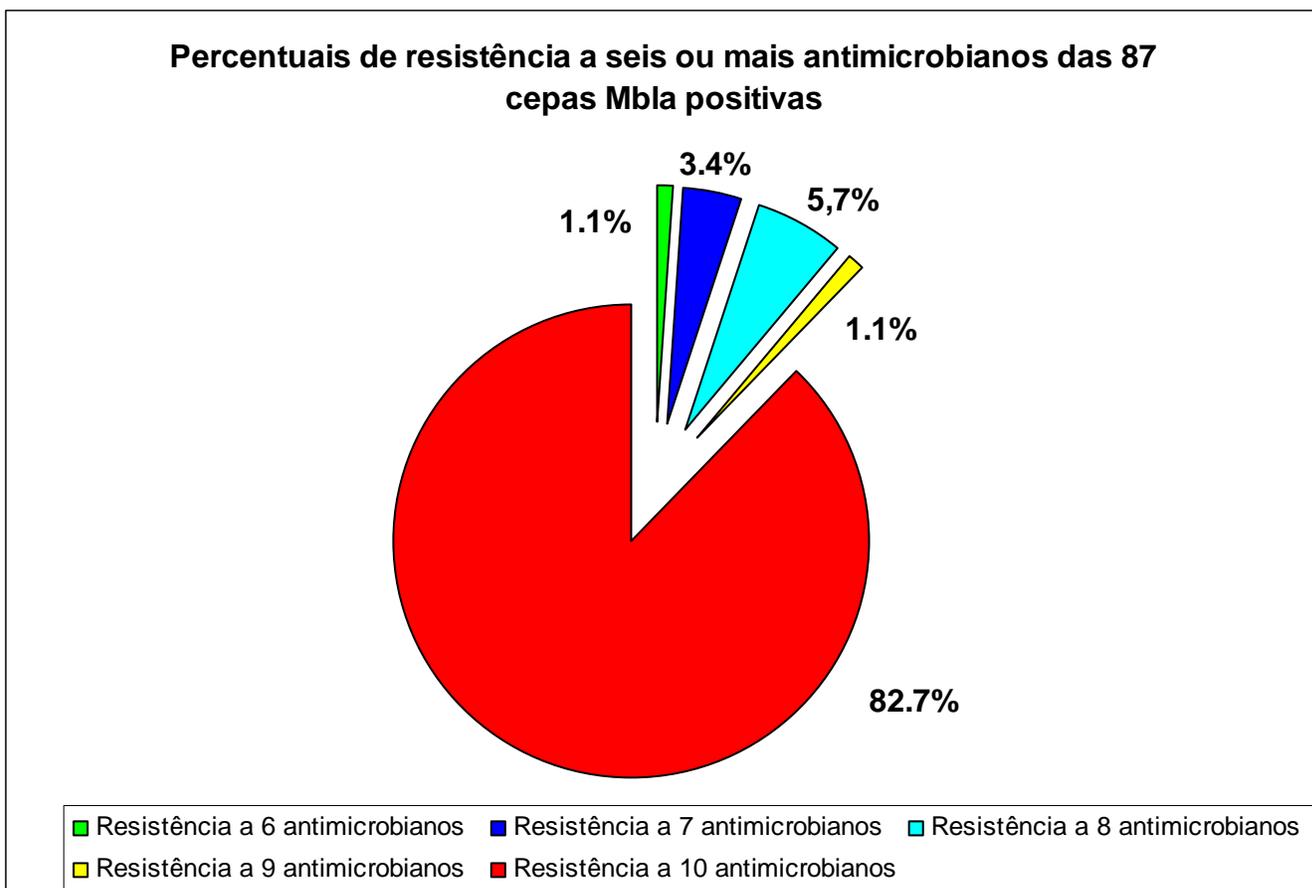


Figura 15: Percentuais de resistência das cepas Mbla positivas a 6 ou mais antimicrobianos.

V. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente vem se acentuando no ambiente hospitalar e configura um sério problema de saúde pública (ARRUDA et al, 1999; SADER et al, 2001).

Estudos têm documentado o isolamento de *P. aeruginosa* do ambiente hospitalar colonizando reservatórios úmidos favorecendo o desenvolvimento de infecção (BUTTERY et al., 1998).

Muitos pesquisadores revelam que surtos em hospitais pediátricos decorrentes de infecções por *P. aeruginosa* ocorrem principalmente em UTI neonatal, Unidade de queimados e oncologia, causando significante mortalidade e morbidade (BUTTERY et al., 1998; MOOLENAR et al., 2000).

Com base na literatura, observou-se que apesar do desenvolvimento de diferentes classes de antimicrobianos, as bactérias estão constantemente criando mecanismos que lhes permitam sobreviver inclusive quando expostas a essas drogas. O que se tem evidenciado, é que a velocidade das bactérias em adquirir resistência aos novos fármacos é maior que a capacidade de se desenvolver novos medicamentos.

Sabe-se atualmente que a detecção crescente de cepas resistentes aos antimicrobianos é fator crucial na epidemiologia de cepas hospitalares. Agentes de infecção hospitalar resistentes a múltiplos antimicrobianos são responsáveis por muitos surtos (MOOLENAAR et al., 2000).

Vários estudos realizados em hospitais brasileiros (SADER & PIGNATARI, 1997; MANRIQUE & GALVÃO, 1997; SADER et al., 1999; MENDES et al., 2000) e do exterior (WOLFF 1993; PATZER & DZIERZANOWSKA, 1994; HANBERGER et al., 1999) têm dado ênfase à resistência antimicrobiana, incluindo o uso indiscriminado e

abusivo de antimicrobianos, quer com indicação terapêutica ou profilática, sendo ressaltada a frequência com que critérios científicos não são respeitados para a prescrição desses medicamentos.

O presente estudo confirmou as elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos usados para tratar infecções causadas por *P. aeruginosa*. Os resultados apresentados na tabela 3, mostram que as cepas existentes em diferentes regiões do Brasil se comportam como as analisadas em outros trabalhos científicos, apresentando alta capacidade de resistência.

Verificou-se neste estudo, que o percentual de cepas pertencentes a 1 perfil que foi suscetível apenas à polimixina B foi muito elevado, tendo sido este o perfil de resistência o predominante entre os obtidos para as 187 cepas analisadas, superando em dobro o percentual de amostras susceptíveis, o que demonstra a frequência elevada de multirresistência destas amostras. Fato mais importante e preocupante foi a identificação de 8 cepas (entre as 187 cepas) resistentes também à polimixina B quando analisadas pelo método de diluição em ágar.

Hogardt e colaboradores (2004), analisando a suscetibilidade da *P. aeruginosa* a polimixina B em pacientes com fibrose cística obtiveram 13.5% de cepas resistentes não tendo observado resistência a este fármaco nas cepas isoladas de pacientes sem esta patologia. No presente estudo, a resistência à polimixina B foi determinada utilizando-se o método considerado padrão ouro, que é o de diluição em ágar, e também o E-test, pelo fato de que a acurácia do método de disco difusão para a polimixina B é insatisfatória. Não há informações de que as cepas resistentes tenham sido isoladas de pacientes com fibrose cística, nem que tenham sido submetidos à inalação de polimixina B, entretanto verificou-se que entre as 8 cepas resistentes, 5 foram isoladas de trato respiratório. Todas são consideradas multirresistentes pois apresentam resistência a 10 ou mais antimicrobianos, sem considerar a própria polimixina B, quando então este número passou para 11 antimicrobianos.

Para os 12 antimicrobianos testados, obteve-se altos percentuais de resistência (Tab. 3). Entre as 187 cepas analisadas, a droga que se mostrou mais eficiente depois da polimixina B foi a piperacilina com tazobactam, apresentando 41.1% das cepas resistentes, seguida da ceftazidima (40.6% resistentes), do cefepime (50.3% resistentes) e do aztreonam (56.1% resistentes).

Em relação aos carbapenemas, verificou-se altos níveis de resistência, tanto para imipeném (58.3% de resistência), quanto para meropeném (57.2%). Este fato demonstra o quanto elevado se encontra o percentual de cepas resistentes aos carbapenemas.

Altos percentuais de resistência aos carbapenemas também foram determinados por Pellegrino e colaboradores (2002) e Kokis e colaboradores (2005), ambos com amostras provenientes de hospitais do Rio de Janeiro. Pellegrino com 42.3% a ambos os carbapenemas e Kokis 61.2% ao imipeném e 51.2% ao meropeném. Tais taxas de resistência são maiores do que as publicadas pelo SENTRY (1997-2000) em hemoculturas como pode ser verificado a seguir.

No estudo realizado pelo SENTRY (1997-2000) Antimicrobial Surveillance Program, para uma avaliação da sensibilidade a antimicrobianos em cepas isoladas em hemoculturas, onde participaram dez laboratórios Latino Americanos, oriundas de seis diferentes países no período de 1997 a 2000, a *P. aeruginosa* se mostrou altamente resistente à maioria dos agentes antimicrobianos testados, destacando-se o meropeném como o composto mais ativo contra esse patógeno na América Latina. A ciprofloxacina também mostrou baixo valor para a concentração mínima inibitória (MIC₅₀ 0,25µg/ml), entretanto o percentual de isolados suscetíveis a esse composto foi baixo (67,7%). Esse estudo mostrou que *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente representa um sério problema na região e que o percentual de resistência continua crescendo para muitos agentes antimicrobianos, tendo inclusive aumentado marcadamente para β – lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Resistência à ciprofloxacina evoluiu de 23,9% em

1997 para 34,3% em 2000, enquanto que para amicacina aumentou de 16,3% em 1997 para 26,7% em 2000. A resistência ao mais ativo composto, meropeném (suscetibilidade de 85,5% no período), aumentou de 5,4% em 1997 para 16,8% em 1999, mas declinou em 2000 para 12,4%. Embora o maior percentual de suscetibilidade tenha sido demonstrado para o meropeném, a mais baixa resistência foi detectada para o cefepime (11,4% em 2000, 9% em 4 anos de estudo) (SADER, GALES & JONES, 2003).

Uma comparação das taxas de resistência obtidas individualmente para cada hospital, no presente estudo, ficou comprometida devido ao fato de não terem sido recebidas a totalidade das cepas de *P. aeruginosa* isoladas em cada hospital de origem. Além disso, o número de amostras analisadas, que foram encaminhadas ao laboratório, variou muito, o que inviabilizou uma tentativa de se determinar qual destes hospitais apresentou melhor controle da resistência antimicrobiana.

Analisando a resistência aos dois carbapenemas testados, imipeném e meropeném, observou-se na maioria das cepas, resistência concomitante aos dois antimicrobianos em todos os hospitais estudados. No hospital RJ1, o percentual de cepas resistentes ao meropeném e suscetíveis ao imipeném foi maior que o de resistentes ao imipeném e suscetíveis ao meropeném; observou-se este perfil também no hospital do Espírito Santo. Por outro lado, a resistência ao imipeném e suscetibilidade ao meropeném foi constatada no hospital RJ2 e no hospital do Mato Grosso do Sul (não computados em tabela). A resistência de cepas a ambos, imipeném e meropeném, pode ocorrer como resultado da perda da proteína OprD, presente na membrana externa da *P. aeruginosa*. Essa porina facilita a passagem de aminoácidos básicos, pequenos peptídeos e antimicrobianos carbapenemas como imipeném e meropeném. Além disso, a perda da porina OprD com o aumento da expressão da β -lactamase AmpC pode levar à resistência (LIVERMORE, 1992). O aumento da expressão do sistema de efluxo MexAB-OprM confere resistência ao meropeném, mas não ao imipeném por este não ser substrato da bomba de efluxo (KOHLE, 1999). A resistência ao imipeném em amostras sensíveis ao meropeném, pode ser justificada pelo aumento no canal OprD por modificação de uma das alças de ligação do

antimicrobiano, L7, conferindo vantagem seletiva para estas amostras favorecendo a passagem de certos nutrientes e do meropeném (EPP et al., 2001).

A alta prevalência de cepas multirresistentes mostrou a necessidade de se determinar um dos possíveis mecanismos de resistência desenvolvidos por aquelas cepas, e pesquisando dados na literatura nacional e internacional, o presente estudo avaliou a produção de melato- β -lactamase (Mbla) por estas cepas de *P. aeruginosa*.

Lagatolla (2004) evidenciou em seu estudo que as cepas Mbla positivas podem rapidamente emergir e tornar-se a maior causa de resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro entre os patógenos nosocomiais. Nas cepas isoladas em 1999, o gene *bla*_{IMP-1} foi raramente detectado, entretanto em 2000 foi detectado em 20% das cepas analisadas e em 70% dessas cepas que foram resistentes ao imipeném.

Arawaka e colaboradores (2000) estabeleceram um método fenotípico para detecção de cepas produtoras de melato- β -lactamase, onde utilizou como substrato para a enzima a ceftazidima, determinando que esta substância se comportava como substrato ótimo para enzima IMP-1, um tipo de Mbla identificado em *P. aeruginosa*. No presente estudo este teste foi reproduzido pela primeira vez no laboratório, e portanto passou por uma etapa de padronização, para aumentar a confiabilidade do método. Para comprovar que a inibição do crescimento não acontecia pela ação única do EDTA, semeou-se a cepa positiva e adicionou-se o volume de EDTA ao disco de papel de filtro puro, e como resultado observou-se o crescimento em toda a placa, sem nenhum tipo de inibição, garantindo que não era uma ação tóxica do EDTA contra as bactérias. A substituição do antimicrobiano β -lactâmico, por um aminoglicosídeo, a gentamicina, confirmou que se tratava de uma resistência promovida por uma β -lactamase. Quando o teste foi realizado substituindo EDTA por água, não foi observada alteração no halo, indicando a ação sinérgica do EDTA com a enzima.

O EDTA é uma substância química que funciona como quelante de íons metais, ou seja, ele estabelece ligação com íons metálicos. Este fato explica a ação inibitória desta substância às cepas produtoras de Mbla, pois estas β -lactamases possuem o íon metálico Zn^{2+} em seu sítio ativo, quando há um quelante como o EDTA no meio, ele se liga ao Zn^{2+} inibindo desta forma a atividade enzimática desta proteína, e tornando a bactéria sensível ao antimicrobiano β -lactâmico, caso aquele fosse o único mecanismo de resistência da bactéria aos β -lactâmicos.

Entre as 87 cepas positivas ao teste de difusão em duplo disco, observou-se resistência a no mínimo 6 antimicrobianos, com perfis bastante variados (Tab. 10), e entre as 36 positivas ao PCR essa resistência aumentou para no mínimo 10 antimicrobianos, com uma diversidade um pouco menor entre os perfis de resistência (Tab 11). Esses resultados estão de acordo com a bibliografia, que cita que amostras produtoras de Mbla, não apresentam um perfil de sensibilidade característico ao antibiograma, mas sim uma ampla resistência aos antimicrobianos, e em muitos casos se observa sensibilidade apenas à polimixina B (GALES et al., 2003). As cepas Mbla positivas, mostram amplo espectro de resistência aos β -lactâmicos incluindo as cefalosporinas de 3ª geração e os carbapenemas, justificando o critério de escolha das cepas para a pesquisa de Mbla (PELLEGRINO, 2004).

Das 87 cepas positivas para o teste de detecção de Mbla, apenas cinco (5,74%) mostraram-se sensíveis ao aztreonam, sendo quatro provenientes do hospital RJI e uma do hospital RJ2. Analisadas através do PCR, 3 (3,45%) mostraram-se positivas para SPM-1, sendo que duas tiveram origem no hospital RJI enquanto apenas uma no hospital RJ2 (dados não computados em tabela).

Em relação à suscetibilidade ao aztreonam, Bush e colaboradores (1995), estudaram a função e a estrutura molecular das β -lactamases, e verificaram que as Mbla, no caso a IMP-1, não era capaz de hidrolisar este monobactâmico. Toleman e colaboradores em 2002, quando caracterizaram a SPM-1, verificaram que o aztreonam não era um bom substrato para esta enzima. Apesar destes relatos, no presente estudo a maioria (96,8%) das

cepas Mbla positivas foram resistentes ao aztreonam, inclusive as positivas ao PCR para SPM-1, indicando que provavelmente há outro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. Outro indício da existência de outro mecanismo de resistência foi o fato de as cepas não produtoras de Mbla também se apresentarem altamente resistentes ao aztreonam. Este resultado também foi encontrado para as cepas analisadas por Gales e colaboradores (2003), onde tanto as cepas produtoras de SPM-1, quanto as não produtoras, foram altamente resistentes a este fármaco.

Altos níveis de resistência ao imipeném, com CMI > 32 μ g/mL, foram identificados no presente estudo para as cepas positivas ao teste de difusão em duplo disco, onde apenas uma proveniente do Espírito Santo apresentou valor de CMI igual a 32 μ g/mL. Em outros estudos referentes à resistência pelo mecanismo de produção de Mbla, Bush em 1998, e Nordmann e Guibert (1998), relataram ser esta uma característica das cepas produtoras de Mbla e mostraram também que as cepas apresentando baixos níveis de resistência ao imipeném com valores de CMI menores que 32 μ g/mL, possuíam como mecanismo de resistência a baixa expressão de porinas OprD, sendo este mecanismo dependente da expressão continuada da β -lactamase AmpC cromossomal.

Muitos estudos científicos demonstraram a importância de se determinar também qual o tipo de Mbla, o que é realizado através da técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As mais observadas são a IMP, a VIM, ambas com suas variações e mais recentemente, aqui no Brasil, a SPM e na Alemanha a GIM. Este teste, apesar de apresentar maior custo para execução e também mão-de-obra mais qualificada, quando comparado ao teste fenotípico, apresenta alta sensibilidade, pois está amplificando uma seqüência gênica do DNA que é responsável pela codificação da enzima que vai atuar contra os β -lactâmicos.

Sader e colaboradores (2004), através de um estudo que utilizou 183 cepas isoladas de hemocultura, entre os anos de 2000 e 2001, em um hospital localizado em São Paulo identificou 19.7% positivas para Mbla e detectou o gene para SPM-1 em 55.6%

dessas cepas. Em 30.6% encontrou o gene para VIM e em 8.3% para IMP-1. Este estudo mostrou resultados similares à presente investigação no que se refere à resistência ao imipeném, revelando 44.8% de cepas resistentes. Este mesmo estudo mostrou que a produção de Mbla representa um importante mecanismo de resistência aos carbapenemas e outros β -lactâmicos, em isolados de *P. aeruginosa*. Uma em cinco *P. aeruginosa* isoladas de sangue produziram Mbla, e como pode ser observado, foram identificados os três tipos de genes. A observação da diversidade genética entre os isolados produtores de Mbla indicou que ambas as disseminações horizontal e clonal desses genes, ocorreram no hospital.

Sader e colaboradores (2005), através do programa SENTRY, detectaram e caracterizaram várias Mbla em um período de 3 anos entre os bastonetes Gram - negativos multirresistentes (TOLEMAN et al., 2002; TOLEMAN et al., 2004; CASTANHEIRA et al., 2004). Este programa de vigilância mostrou claramente que os genes das Mbla, são rapidamente emergidos e disseminados entre as espécies de acordo com a região geográfica avaliada. A emergência e disseminação de genes móveis de Mbla pode representar o fator mais importante acerca do aumento da resistência aos carbapenemas.

Entre as cepas analisadas neste estudo, 87 foram positivas ao teste de difusão em duplo disco para detecção de Mbla, entre essas, em 6 encontrou-se o gene *bla*_{IMP-1} e em 30 o gene *bla*_{SPM-1}, como descrito na tabela 8. Observou-se que há uma variação entre os resultados obtidos para os dois métodos, o que pode ser justificado pela existência de outros tipos de enzimas Mbla circulantes nas cepas de *P. aeruginosa* no Brasil e no mundo, como a VIM e suas variações, as outras 16 variações da IMP e mais recentemente a GIM.

A determinação de 93 genótipos distintos, obtidos a partir do PFGE para a totalidade das cepas demonstra outra característica – a variabilidade genética - com alta diversidade entre as cepas de *P. aeruginosa*. Neste caso também se observou variação de acordo com a origem de isolamento, pois com exceção do genótipo A, os outros foram específicos para cada hospital de onde foram isolados. O hospital do Mato Grosso do Sul contribuiu com esta variação observada, pois além de ter um grande nº de cepas, estas se

mostraram diferentes ao PFGE, cada uma com um perfil particular, com exceção do genótipo A que apareceu em 6 cepas. A tabela 9 mostra claramente a diversidade dos perfis genotípicos e suas particularidades de acordo com o hospital de onde foram isoladas. Por exemplo o genótipo R aparece em 9 cepas, sendo todas do hospital RJ2, e o genótipo W (W e W1) que aparece em 6 cepas sendo todas do hospital do Espírito Santo.

Em relação às características fenotípicas determinadas neste estudo, como grupos sorológicos, espécimes clínicos de onde se isolaram as cepas, e perfis de resistência, verifica-se uma grande diversidade devido ao grande nº de cepas que participaram do estudo. A associação entre essas características fenotípicas, com os genótipos obtidos pela análise de PFGE não foi possível, assim como a associação destas características com a capacidade de produzir ou não Mbla. No que diz respeito à determinação do grupo sorológico, pode-se fazer uma associação com o hospital de isolamento da amostra. Por exemplo no hospital RJ1, observou-se maior prevalência do sorogrupo B, enquanto que no hospital RJ2 o sorogrupo L foi o mais determinado. Em relação à produção de Mbla, a associação das cepas Mbla positivas com um grupo sorológico, não pode ser feita. Há muitas cepas positivas para Mbla do sorogrupo B, assim como há também cepas Mbla negativas pertencentes a este grupo sorológico. O mesmo pode ser estabelecido para os perfis de resistência, pois há cepas do sorogrupo B com alta resistência e com baixa também. Os espécimes clínicos também seguem esta constatação, pois se observou uma maior prevalência de um ou de outro espécime clínico de acordo com a origem de isolamento e não com a capacidade de produzir ou não Mbla. Por exemplo, há uma grande diversidade de sorogrupos, perfil de resistência, e capacidade ou não de produzir Mbla entre as cepas do Espírito Santo, entretanto há uma grande prevalência de secreção cutânea entre os isolados, mostrando que esta pode ser uma característica inerente à origem de isolamento. Inicialmente se cogitou a hipótese de cepas produtoras de Mbla terem sido isoladas de espécimes clínicos mais “nobres”, como sangue e LCR, o que não foi observado no estudo. Observou-se que a *P. aeruginosa*, com seus mecanismos de virulência é capaz de colonizar e infectar vários tecidos e órgãos. Entretanto, segundo o CDC (EMORI & GAYNES, 1993) *P. aeruginosa* resistentes ao imipeném, são mais frequentemente isoladas do trato respiratório, do que da corrente sanguínea, trato urinário ou ferida cirúrgica.

Entre os 93 genótipos identificados para as 187 cepas em estudo, o genótipo A e seu subtipo A1 foi o mais freqüente, sendo observado em 58 cepas (A em 56 e A1 em 2). Em aproximadamente 83% dos casos o genótipo A apresentou-se associado ao grupo sorológico B e em 97% ao perfil de suscetibilidade, com resistência a 10 ou mais antimicrobianos. Este fato não é exclusivo do genótipo A, já que outros genótipos também apresentaram sorogrupo B e resistência a mais de 10 drogas.

A associação do genótipo A com a produção de Mbla poderia ser feita, pois as cepas do perfil A, quase em sua totalidade produziram a enzima. Uma outra correlação envolvendo o genótipo A poderia ser acerca do sorogrupo associado ao genótipo A e seu subtipo A1, onde 90.4% das cepas positivas ao teste fenotípico, possuíam como grupo sorológico o B. Um percentual bastante inferior foi encontrado para os outros grupos sorológicos. Casos como este também foram observados em outros perfis. Por exemplo, o genótipo R, com 8 cepas Mbla positivas e 1 Mbla negativa, e ainda o genótipo W com 3 cepas Mbla positivas e 1 cepa Mbla negativa. Nos dois primeiros casos, para os genótipos A e R, as cepas consideradas não produtoras de Mbla, apresentaram-se sensíveis a grande parte dos antimicrobianos testados, inclusive aos carbapenemas e cefalosporinas. Este fato já foi relatado anteriormente por outros pesquisadores (BINGEN et al., 1996 & PUJANA et al., 1999), e pode ser explicado pelo fato de genes de resistência a muitos antimicrobianos como aminoglicosídeos e carbapenemas estarem localizados em elementos móveis, como transposons e plasmídeos, sendo desta forma, a aquisição ou a perda de tais elementos não significa necessariamente modificações que possam ser detectadas nos perfis de fragmentação do DNA. Outra possibilidade de modificação do perfil de resistência sem alteração do genótipo, poderia ser a ocorrência de uma mutação pontual que não fosse suficiente para alterar o perfil genômico, mas para causar inativação de um mecanismo de resistência.

Outro fato similar a este foi evidenciado no presente estudo, onde 67.4% das cepas positivas para Mbla eram cepas do genótipo A. Observou-se que em apenas 43.1% das cepas do genótipo A foi encontrado o gene para SPM-1. Este fato pode ser explicado

devido aos genes das Mbla poderem estar na forma de integrons em transposons e em plasmídeos, e no momento da análise, as outras 33 cepas poderiam não ter adquirido especificamente o gene para SPM-1. O fato de este gene não ter sido detectado em nenhuma das 15 cepas analisadas provenientes do hospital RJ3 (13 genótipo A e 2 genótipo A1), corrobora com a hipótese anterior. Resultado semelhante foi encontrado por Gales e colaboradores (2003), quando entre 16 cepas com o mesmo genótipo “SP”, em 15 detectou-se o gene para SPM-1 enquanto que em 1 este gene não foi detectado.

A produção de Mlba em isolados de *P. aeruginosa* está se tornando alarmante no Brasil e em outros países da América Latina. Depois da primeira identificação de uma cepa produzindo SPM-1, em *P. aeruginosa* no estado de São Paulo, verificou-se que esta enzima tem emergido no Brasil como um importante mecanismo de resistência aos carbapenemas entre os isolados de bactérias Gram negativas não fermentadoras de glicose (GALES et al., 2003).

Importante fato observado para o genótipo A foi que 97% das cepas pertencentes a este genótipo foram Mbla positivas entre as quais em 45% foi detectado o gene para SPM-1. Fato de maior importância, foi verificar que em todos os hospitais analisados este genótipo “A” estava presente, apresentando positividade para Mbla, e com o gene para SPM-1, com exceção do hospital RJ3, no qual identificou-se produção de Mbla, porém não foi detectado o gene para SPM.

Resultados semelhantes a este foram obtidos primeiramente no Brasil por Gales e colaboradores (2003), quando identificaram ou a disseminação de uma cepa epidêmica (um clone denominado “SP”) resistente aos carbapenemas em hospitais localizados em diferentes regiões do Brasil. Posteriormente, Kokis e colaboradores (2005) estudando cepas de *P. aeruginosa*, identificaram alto percentual de cepas resistentes ao imipeném e através do PFGE detectou que em 73% dos casos tratava-se de um mesmo clone, enfatizando a necessidade de controle da transmissão de microrganismos entre pacientes.

A existência de um perfil de PFGE comum entre os isolados resistentes aos carbapenemas em diferentes regiões geográficas configura um problema. A disseminação intra-hospitalar e entre hospitais situados próximos pode ser explicada pela transferência de pacientes infectados e/ou compartilhando da mesma equipe médica. Entretanto, esta explicação é pouco provável para hospitais distantes um do outro. Para se ter um melhor entendimento sobre a disseminação entre este clone com a disseminação de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemas no Brasil, é importante avaliar o vasto número de cepas isoladas em outros hospitais localizados em outras regiões do país. Esses resultados indicam que a resistência aos carbapenemas entre os isolados de *P. aeruginosa* tenha sido causada por ambos os fatores, tanto pela aquisição de resistência devido à pressão seletiva de antimicrobianos, quanto pela disseminação de um clone epidêmico (GALES et al., 2003).

Essas amostras, produtoras de Metallo- β -lactamases, representam uma grande preocupação no sentido da disseminação de genes de resistência, pois quando isoladas no ambiente hospitalar, podem ocasionar surtos e impedir o tratamento de primeira linha, principalmente porque para as quatro subclasses de metalo- β -lactamases, os genes de resistência são localizados em elementos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, destacando-se o papel dos plasmídeos que podem conter genes de resistência próprios ou atuar como vetor para transposons e integrons (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). O uso elevado de antimicrobianos em hospitais, propicia a seleção e disseminação de “clones” resistentes e por isso, recomenda-se a restrição no uso de cefamicinas e de carbapenemas como medida de prevenção da disseminação de *P. aeruginosa* metalo- β –lactamase positivas (SENDA et al. 1996).

Através da observação do dendrograma confeccionado com os perfis obtidos para as cepas Mbla positivas, pode-se supor que a produção de metalo- β -lactamase não está relacionada a determinado genótipo, visto que o dendrograma construído demonstrou baixo percentual de similaridade, sendo de aproximadamente 55%. A observação da diversidade genética entre os isolados produzindo os tipos de Mbla indica que ambos os tipos de disseminação, clonal e horizontal ocorreram nos hospitais. Medidas estritas de controle devem ser implementadas para prevenir a disseminação dessas potentes Mblas.

De acordo com alguns pesquisadores, o desenvolvimento de métodos de tipagem baseados na análise de DNA, foi provavelmente o acontecimento mais importante na evolução da análise epidemiológica de patógenos hospitalares (SADER & PIGNATARI, 1997; VILLARI et al., 1998).

A investigação molecular de *P. aeruginosa* multirresistente, é um importante parâmetro para o controle de infecções. A associação de altas taxas de resistência ao imipeném com um único genótipo de *P. aeruginosa*, encontrado em diferentes unidades de um hospital, enfatiza a necessidade de controlar o uso de agentes antimicrobianos e prevenir a transmissão deste microrganismo entre os pacientes (KOKIS et al., 2005).

Deshpande, Frische e Jones (2004) estudando a epidemiologia molecular de bactérias multirresistentes, em uma análise global representado por SENTRY, verificaram que a epidemiologia de fenótipos resistentes é altamente variável, dependendo da espécie envolvida e do mecanismo de resistência, e pode variar localmente, regionalmente e internacionalmente. Verificou que a emergência de um clone resistente depende muito do tipo e da quantidade de antimicrobiano usado em uma área geográfica específica, a população de pacientes atendida, o contexto social em que vivem os pacientes e a qualidade do controle de infecção pela infraestrutura da saúde pública.

As taxas observadas revelaram a importância do uso adequado destes antimicrobianos no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* principalmente em relação aos carbapenemas, antimicrobianos de amplo espectro que devem ter o seu uso restrito devido à pressão seletiva na microbiota normal e a forte indução da produção de β -lactamases (LIVERMORE, 1992).

Segundo Gaynes e Horan (1995) dados de vigilância são importantes porque permitem que se institua no hospital, medidas apropriadas de intervenção, como pesquisa de portadores de microrganismos resistentes e o controle da disseminação desses agentes.

A disseminação de cepas multirresistentes em um mesmo hospital e entre diferentes hospitais sugere que a portaria 2616 de 1998 não está sendo obedecida, e

programas de Controle de Infecção Hospitalar não estão sendo instituídos eficientemente. Assim ações de vigilância sanitária visando inicialmente a conscientização da importância deste procedimentos para a promoção e prevenção da saúde, com a diminuição do risco devem ser realizadas.

VI. CONCLUSÃO

- O elevado percentual de cepas resistentes ao imipeném e meropeném reflete o uso indiscriminado e abusivo destes antimicrobianos, promovendo a aquisição de mecanismos de resistência contra estes antimicrobianos.
- Apesar da grande diversidade fenotípica e genotípica (93 genótipos) das cepas, foi observada maior disseminação e prevalência do genótipo A e sua relação com o sorogrupo B e padrões de resistência.
- A detecção destas cepas produtoras de Mbla configura um problema emergente, podendo servir de valiosa referência para ajudar a tomada de decisões racionais quanto ao uso de antimicrobianos na prática clínica.
- Verificou-se uma grande diversidade genética com 93 genótipos para as 187 cepas, apesar da predominância de um genótipo, identificado em todas as regiões de origem de isolamento.
- Este genótipo mais prevalente apresenta-se com elevado nível de resistência aos antimicrobianos, positivo para o teste fenotípico de produção de Mbla, e em menor proporção positivo para SPM-1.
- A predominância de um genótipo entre as cepas estudadas sugeriu a disseminação de cepas multirresistentes intra-hospitalar e entre os hospitais em diferentes regiões do Brasil.
- A disseminação deste genótipo apresentando elevado nível de resistência e produção de metalo- β -lactamase, sugere a não conformidade com as práticas para o controle da infecção hospitalar e a capacidade destas cepas de adquirir resistência quando submetidas à pressão seletiva de antimicrobianos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAWAKA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; MASAFUMI, G. Convenient test for screening metallo- β -lactamase: producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 40-3, 2000.

ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 6th ed ASM Press, p. 190-208, 1995.

ARNOW, P. M.; FLAHERTY, J. P. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: C. Glenn Mayhall (ed). **Hospital Epidemiology and Infection Control**, 1st ed. Williams & Wilkins. Galvestone, p. 366-387, 1996.

ARRUDA E.A.G.; MARINHO, I. S.; BOULOS, M.; SUMIKO, I. S.; CAIAFFA, H. H. F.; MENDES, C. M.; OPLUSTIL, C. P.; SADER, H.; LEVY, C. E.; LEVIN, A. S. Nosocomial infection caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 20, p. 620-623, 1999.

ASENSI, M. D.; MORAES, DE B. A.; CRAVO, C. A. N.; LOUREIRO, M. M. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 42, p. 201-207, 2000.

BARG, N. An Introduction to molecular hospital epidemiology. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 14, p. 395-996, 1993.

BARTH, A. L.; PITT, T. L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infect Dis**, v. 2, p. 43-61, 1998.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C., TUEEK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **Am J Cli Path**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BELLIDO, F.; HANCOCK, R. E. W. Susceptibility and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial agents. In : ***Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen***, Mario Campa (ed) Plenum press, 1993.

BINGEN, E.; BONACORSI, S.; ROHRLICH, P.; DUVAL, M.; LHOPITAL, S.; BRAHIMI, N.; VILMER, E.; GOERING, R. V. Molecular epidemiology provides evidences of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 3226-3229, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº8080 de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº9451, de 06 de Janeiro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 1997. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº2616, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de maio de 1998. Seção I.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K. Metallo β -lactamases: a class apart. **Clin Infect Dis**, v. 27, p. S48-S53, 1998.

BUTTERY, J. P.; ALABASTER, S. J.; HEINE, R. G.; SCOTT, S. M.; CRUTCHFIELD, R. A.; GARLAND, S. M. Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology ward related to bath toys. **Pediatr Infect Dis**, v. 17, p. 509-513, 1998.

CARFI, A.; DUEE, E.; GALLEEN, M.; FRERE, J. M.; DIDEBERG, O. 1.85 A resolution structure of the Zinc II β -lactamases from *B.cereus*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 1, p. 313-323, 1998

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, R. N.; SCHMIDT, F. J.; WALSH, T. R. Molecular Characterization of a β -Lactamase GENE, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 48, p. 4654-4661, 2004.

CHU, Y.; MARIYA, A.; HOUANG, E. T. S.; PALEPOU, M. I.; LYON, D. J.; WOODFORD, N.; DAVID, L. M. IMP-4 a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 710-714, 2001.

CONCHA, N.; RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K.; HERZBERG, O. Crystal structure of the wide – spectrum binuclear zinc β -lactamase from *Bacterioides fragilis*. **Structure**, v. 4, p. 823-836, 1996.

CORNAGLIA, G.; RUSSEL, K.; SATTA, G.; FONTANA, R. Relative importances of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobio Agents Chemother**, v.39, p. 350-355, 1995.

CORNAGLIA, G.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; LAURETTI, L.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. **Lancet**, v. 13, p. 899-900, 1999.

COSTA, G. A.; HOFER, E. Isolamento e identificação de Enterobactérias. **Instituto Oswaldo Cruz**, 1972.

CRISTINA, A.G.; COSTERTON, J. W. Bacteria –laden biofilms – a hazard to orthopedic prostheses. **Infect Surg**, v.3, p. 655-662, 1984.

DASGUPTA, M.K; COSTERTON, J.W. Significance of biofilm adherent bacterial microcolonies on Tenckhoff catheters in CAPD patients, **Blood Purif**, v. 7, p. 144-155, 1989.

DERETIC, V.; SCHURR, M. J.; BOUCHER, J. C.; MARTIN, D. W. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoid in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. **J Bacteriol**, v. 176, p. 2273-2780, 1994.

DESHPANDE, L. M.; FRISCHE, T. R.; JONES, R. N. Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: A global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diag Microbio Infect Dis**, v. 49, p. 231-236, 2004.

DORING, G.; DALHOFF, A.; VOGEL, O.; BRUNNER, H.; DROGE, V. E.; BOTZENHART, K. In vivo activity of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model. **J Infect Dis**, v. 149, p. 532-537, 1984.

EMORI, T. G.; GAYNES, R. P.; An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, p. 428-442, 1993.

EPP, S. F.; KOHLER, T.; PLESIAT, P.; MICHEA-HAMZEAHPOUR, M.; FREY, J.; PECHERE, J. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porine OprD modulates susceptibility to meropenem. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 45, p. 1780-1787, 2001.

FAVERO, M.S.; CARSON,L.A.; BOND, W.W. *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals. **Science**, v. 173, p. 836-838, 1971.

FICK, R. B.; BALTIMORE, R. S.; SQUIRE, S. V.; REYNOLDS, H. Y. IgG proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v. 151, p. 589-598, 1985.

FLICK, M. R.; CLUFF, L. E. *Pseudomonas* bacteremia. **Am J Med**, v. 60, p. 501-508, 1976.

FREITAS, M.R. Análise de custos das infecções hospitalares. In: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.B.A.; FILHO, M.B.A.F.; GINBAUMR,S.; RICHTMANN R. **Infecções hospitalares Prevenção e Controle**. Sarvier, p.42-45, 1997.

FRIEDRICH, L. V.; WHITE, R. I. : BOSSO, J. A. Impact of use of multiple antimicrobials on changes in susceptibility of Gram-negative aerobes. **Clin Infect Dis**, v. 28, p. 1017-1024, 1999.

GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **J Antimicrobio Chemother**, v. 52, p. 699-702, 2003.

GAYNES, R. P.; HORAN, C. Surveillance of nosocomial infections. In: Mayhall C. G. (ed) **Hosp Epidemiol Infect Control**. Williams and Wilkins, p. 1017-1031, 1995.

GOERING, R.V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analyses of chromosomal restriction fragments patterns by pulsed-field gel eletrophoresis. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 14, p. 595-600, 1993.

GOLDMANN, D. A.; HUSKINS, W. C. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacterial: a strategic priority for hospitals worldwide. **Clin Infect Dis**, v. 24, p. S139-S145, 1997.

GRUNDMANN, H; SHNEIDER, C.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F. D.; PITT, T. L. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa* **J Clin Microbio**, v. 33, p. 528-34,1995

HANBERGER H. et al. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 european countries, French and Portuguese ICU Study Groups. **JAMA**, v. 281, p. 67-71, 1999.

HANCOCK, R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v. 27, p. S93-99, 1998.

HANCOCK, R. E. W.; BELL, A. Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 7, p. 713-720, 1988.

HARRIS, A.; VIEIRA, T. C.; VENKATARAMAN, L.; DeGIROLAMI, P.; SAMORE, M.; CARMELI, Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, v. 28, p. 1128-1133, 1999.

HECK, L. W.; MORIHARA, K.; McRAE, W. B.; MILLER, E. J. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infect Immun**, v. 51, p. 115-118, 1986.

HOGARDT, M.; SCHMOLDT, S.; GOTTFRIED, M.; ADLER, K.; HEESEMANN, J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. **J Antimicrobio Chemother**, v. 54, p. 1057-1061, 2004.

HOIBY, N. Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases. **APMIS**, v. 83, p. 549-552, 1975.

HOMMA, J. Y. Designation of the thirteen O-group antigens of *Pseudomonas aeruginosa*; an amendment for tentative proposal in 1976 Japan. **J Exp Med**, v. 52, p. 317-322, 1982.

IRVIN, R. T.; DORIN, P.; LEE, K. K.; SASTRY, P. A.; PRANCHYCH, W.; TODD, T.; HODGES, R.S. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesion: confirmation that the pili structural proteins subunit contains a human epithelial cell-binding domain. **Infect Immun**, v. 57, p. 3720-3766, 1989.

ISHIMOTO, K. S.; LORY, S. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative δ -factor (RpoN) of RNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 86, p. 1954-1957, 1989.

IYOBE, S.; YAMADA, H.; MINAMI, S. Cloning and expression in Enterobacteriaceae of the extended-spectrum β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. **FEMS Microbiol Lett**, v. 121, p. 175-180, 1996.

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. More extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, p. 1697-1704, 1991.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 924-929, 1995.

JARVIS, W.R. – Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, p. 344-351, 1987.

JONES, R. N.; PFALLER M. A.; MARSHALL S. A.; HOLLIS, R. J.; WILKE, W. W. Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative bacilli: occurrence of

resistance, molecular epidemiology, and screening for metallo-enzymes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 29, p. 187-92,1997.

KELLY, N. M.; KLUFTINGER, J. L.; PALOSKE, B. L.; PARANCHYCH, W.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa* pili as ligands for nonopsonic phagocytosis by fibronectin-stimulated macrophages. **Infect Immun**, v. 57, p. 3841-3845, 1989.

KNOWLES, M. R.; GILLIGAN, P. H.; BOUCHER, R. C. Cystic fibrosis. In: MANDELL, D.; BENETHS, J; DOLIN, R. (eds) **Principles and practice of infections diseases**. Churchill, 1995.

KOHLER, T. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa* respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 424-427,1999.

KOKIS, V. M.; MOREIRA, B. M.; PELLEGRINO, F. L. P. C.; SILVA, M. G.; LONG, J. B.; BASTOS, C. C. R. Identification of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro. **J Hosp Infect**, v. 60, p. 19-26, 2005.

KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERG, P. C. The nonfermentative Gram-negative bacilli. In: WINN Jr. W. C.(ed) **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, p. 253-309, 1997.

KOWALESWSKA-GROCHOWSKA, K. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. **Chest**, v.100, p. 1090-1095, 1991.

LAGATOLLA, C.; TONIN, E. A.; MONTI-BRAGADIN, C.; DOLZANI, L.; GOMBAC, F.; BEARZI, C.; EDALUCCI, E.; GIONECHETTI, F.; ROSSOLINI, G. M. Endemic carbapenem – resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- β -lactamase determinants in European. **Hospital Emerg Infect Dis**, v. 10, p. 535-538, 2004.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of *bla_{vim}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.

LEROYER, A.; BEDU, A.; LOMBRAIL, P.; DESPLANQUES, L.; DIAKITE, B.; BINGEN, E.; AUJARD, Y.; BRODIN, M. Prolongation of hospital stay and extra costs due to hospital-acquired infection in a neonatal unit. **J Hosp Infect**, v. 35, p. 37-45, 1997.

LEVIN, A. S.; BARONE, A. A.; PENCO, J.; SANTOS, M. V.; MARINHO, I. S.; ARRUDA, E. A. G.; MANRIQUE, E. I.; COSTA, S. F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 28, p. 1008-1111, 1999.

LIPUMA, J. J. Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. **Pediatr Infect Dis J**, v. 17, p. 667-675, 1998.

LI, X.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1948-1953, 1995.

LIVERMORE, D. M. Role of beta-lactamases and impermeability in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Chemother**, v. 42, p. 257-263, 1989.

LIVERMORE, M. D. Carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 29, p. 609-613, 1992.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LOUREIRO, M. M.; MORAES, B. A. de; MENDONCA, V. L. F.; QUADRA, M. R. R.; PINHEIRO, G. S.; ASENSI, M. D. *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**, v. 97, p. 387-394, 2002.

MAI, G. T.; SCOW, W. K.; PIER, G. B.; McCORMACK, J. G.; THONG, Y. H. Suppression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. **Infect Immun**, v. 61, p. 559-564, 1993.

MANRIQUE, E. I.; GALVÃO, L. L. Racionalização e controle de antimicrobianos. In: Rodrigues, E. A. C.; Mendonça, J. M. B. A.; Filho, M. B. A. F., Grinbaum R. S., RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares Prevenção e Controle**, v. 6, p. 117-130, 1997.

MARRIE, T. J.; SUNG, J. Y.; COSTERTON, J. W. Bacterial biofilm formation on nasogastric tubes. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 503-506, 1990.

MARUMO, K.; TAKEDA, A.; NAKAMURA, Y.; NAKAYA, K. Purification and characterization of metallo-beta-lactamase from *Serratia marcescens* **Microbiol Immunol**, v. 39, p. 27-33, 1995.

MENDES, C.; HSIUNG, A.; KIFFER, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S., MIMICA, I.; ZOCCOLI, C.; MYSTIC STUDY GROUP. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC antimicrobial surveillance program. **Braz J Infect Dis**, v. 4, p. 236-244, 2000.

MOOLENAR, R. L.; CRUTCHER, J. M.; SAN JOAQUIN, V. H.; SEWEL, S. V.; HUTWAGNER, L. C.; CARSON, L. A.; ROBISON, D. A.; SMITHEE, L. M.; JARVIS, W. R. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 80-85, 2000.

MURRAY, P.R. Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis. In: **Manual of Clinical Microbiology** 6th ed., 1995.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. **Twelfth informational supplement**. NCCLS. USA. Publication M100-S12; 2003.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) REPORT. Data summary from October 1986/April, Issued May 1996. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, EUA. 1996.

NICKEL, J.C.; DOWNEY, J. A.; COSTERTON, J. W. Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. **Urology**, 34(5):284-291, 1989.

NORDMANN, P.; GUIBERT, M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v. 42, p. 128-131, 1998.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

PALLERONI, N.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PALLERONI, N. J. Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier, L; Balows, A.; Sussman, M. (eds). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections – Systematic bacteriology**. v. 2 , p. 1091-1108, 1998.

PARMELY, M.; GALE, A.; CLABAUGH, M.; HORVAT, R.; ZHON, W. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun**, v. 58, p. 3009-3014, 1990.

PATZER, J.; DZIERZANOWSKA, D. The incidence of serotype O12 and multiresistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 34, p. 165-170, 1994.

PELLEGRINO, F. L. P., MOREIRA, M. B.; NOUER, S. A. Antimicrobial resistance and genotype characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a university affiliated hospital in Rio de Janeiro, Abstract L-14. In: **101th ASM General Meeting**, 2001.

PELLEGRINO, F. L. P. C.; TEIXEIRA, L. T.; CARVALHO, M. G. S.; NOUER, S. A.; OLIVEIRA, M. P.; SAMPAIO, J. L. M.; FREITAS, A. A.; FERREIRA, A. L. P.; AMORIM, E. L. T.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. Occurrence of a Multidrug – Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in Different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbio**, v. 40, p. 2420-2424, 2002.

PELLEGRINO, C.P.L.F. Integrons e cassetes de genes: elementos genéticos envolvidos com a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos carbapenemas. **Rev Biomédico**, v. 11, p. 32-34, 2004.

PITT, T. L. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Eur J Clin Microbio Infect Dis**, v. 7, p. 238-247, 1988.

PITT, T. L. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. P1115-1138. In: Collier, L.; Balows, A., Sussman, M. (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. **Systematic bacteriology**. v. 2, 1998.

POH, C. L.; YEO, C. C.; TAY, L. Genome fingerprint by pulsed field gel eletrophoresis and ribotyping to differentiate *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 strains. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 11, p. 817-822, 1992.

POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerg Inf Dis**, v. 6, p. 84-85, 2000.

POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J. D.; NORDMANN, P. 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. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 44, p.891-897, 2000.

POLLACK, M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease on immunity. **Rev Infect Dis**, v. 5, p. 979-984, 1983.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infections diseases**, 1995.

POOLE, K.; KREBES, K.; McNALLY C.; NESHAT, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. **J Bacterio**, v. 175, p. 7363-7372, 1993.

PUJANA, I.; GALLEGRO, L.; MARTÍN, G.; LOPEZ, F.; CANDUELA, J.; CISTERNA, R. Epidemiological analisis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic bronchiectasis patients without cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 2071-2073, 1999.

RICCIO, M. L.; FRANCESCHINI, N.; BOSCHI, L.; CARAVELLI, B.; CORNAGLIA, G.; FONTANA, R.; AMICOSANTE, G.; RASSOLINI, G. M. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 1229-1235, 2000.

RICHARDS, M.J.; EDWARDS J.R.; CULVER D.H.; GAYNES R.P. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the Unites States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Pediatric**, v. 103, p. 39- 43, 1999.

ROMLING, U.; TUMMLER, B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed – field gel eletrophoresis. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 464-465, 2000.

SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase form *Bacillus cereus* 569. **Biochem J**, v. 98, p. 11c-13c, 1966.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; LEME, I. L.; BURATINI, M. N.; TANCRESI, R.; ROLLIS, R. J.; JONES, R.N. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 17, p. 13-18, 1993.

SADER, H. S.; PINATARI, A. C.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 15, p. 320-323, 1994.

SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C. Epidemiologia Molecular no âmbito Hospitalar. In: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.B.A.; FILHO, M.B.A.F.; GINBAUMR,S.; RICHTMANN R. Infecções hospitalares Prevenção e Controle. **Sarvier**, Parte VI-A2, p. 549-560,1997.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A.C.; WINOKUR, P.; KUGHER, K.C.; PFALLER, M.A.; DOERN, G.V.; SENTRY LATIN AMERICA STUDY GROUP. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin America medical centers with a diagnostic of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 32, p. 289-301, 1998.

SADER, H. S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZOCOLLI, C.; JONES, R. N. Results of 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three brazilian medical centers. **Bras J Infect Dis**, v. 3, p. 63-79, 1999.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Bras J Infect Dis**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; JONES, R. N. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diag Microbio and Infect Dis**, v. 44, p. 289-299, 2002.

SADER, H. S., GALES, A. C.; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results of SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diag Microbio and Infect Dis**, v. 44, p. 301-311, 2003.

SADER, H. S.; REIS, A. O.; SILBERT, S.; GALES, A. C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbio Infect**, v. 11, p. 73-76, 2004.

SADER, H. S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R. E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T. R.; JONES, R. N. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamase in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Antimic Agents**, v. 25, p. 57-61, 2005.

SANTOS, F. L.; SANTOS, I. B.; ASSIS, A. L. M.; MENEZES, L. C. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, PB. **J Bras Patol e Med Laborat**, v. 38, p. 79-84, 2002.

SCHWARZ, S; CHASLUS-DANCLA, E. Use of Antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Vet Res**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SENDA, K.; ARAWAKA, Y.; ICHIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; OHSUKA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. PCR detection of metallo- β -lactamase gene *bla_{imp}* in gram-negative rods resistant to broad – spectrum β -lactams. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 2909-2913, 1996.

STULL, T. L.; LIPUMA, J. J.; EDLIND, T. D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. **J Infect Dis**, v. 157, p. 280-286, 1988.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 18, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; GALES, A. C.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, p. 673-679, 2002.

TOLEMAN, M. A.; ROLSTON, K.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. *bla_{vim-7}* an evolutionary distinct metallo-β-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the United States. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 48, p. 329-332, 2004.

TSARKIS, A.; POURNARAS, S.; WOODFORD, N.; PAPELOU, M. F.; BABINI, G. S.; DOUBOYAS, J.; LIVERMORE, D. M. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **J Clin Microbio**, v. 38, p. 1290-1292, 2000.

ULLAH, J. H.; WALSH, T. R.; TAYLOR, I. A.; EMERY, D. C.; VERMA, C. S.; GABLIN, S. J.; SPENCER, J. The crystal structure of the L1 metallo-β-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. **A resolution J Mol. Biol**, v. 20, p. 125-136, 1998.

VILLARI, P.; LACUZI, L.; TORRE, L.; SCARCELLA, A. Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. **J Infect**, v. 37, p. 274-281, 1998.

WACHSMUTH, K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and investigation of outbreaks. **Rev Infect Dis**, v. 8, p. 682-691, 1986.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferible imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, p. 147-151, 1991.

WOLFF, M.J. Use and misuse of antibiotics in Latin America. **Clin Infect Dis**, v. 17, p. 346-351; 1993.

WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F. I.; BANBINI, G. S.; LIVERMORE, M. D. Carbapenemase – producing *Pseudomonas aeruginosa* in UK. **Lancet**, v. 352, p. 546-547, 1998.

YAN, J. J.; HSUEH, P. R.; KO, W. C.; LUH, K. T.; TSAI, S. H.; WU, H. M.; WU, J. J. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-2 enzyme. **Antimicrobio Agents Chemother**, v. 45, p. 2224-2228, 2001.

YOUNG, M. L.; BAINS, M.; BELL, A.; HANCOCK, R. W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 2566-2568, 1992.

APÊNDICE

I. Soluções para execução do PFGE

1. Tampão Tris-Borato – EDTA 10X (TBE 10X)

| | |
|---------------------------------------|--------|
| TRIS base _____ | 121.1g |
| Acido Bórico _____ | 61.8g |
| NA ₂ EDTA _____ | 3.7g |
| Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ | 1000mL |

2. Tampão TBE 0.75X (para a ação da enzima de restrição)

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Tampão TBE 10X _____ | 750µL |
| Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ | 1000µL |

3. Tampão TBE 0.5X

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Tampão TBE 10X _____ | 125µL |
| Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ | 2500mL |

4. Tampão EC

| | |
|------------------------|------------------------------|
| Tris 6mM _____ | 3mL de Tris 1M, pH7.5 |
| NaCl 1M _____ | 29.22g |
| EDTA 0.1M _____ | 10mL de EDTA 0.5M pH7.5 |
| 0.5% Brij 58 _____ | 2.5g de Brij 58 |
| 0.2% Deoxicolato _____ | 1.0g de Deoxicolato de sódio |
| 0.5% Sarcosil _____ | 2.5g de sarcosil |

Ajustar para o pH 7.5 e completar o volume de 500mL com água MilliQ. Autoclavar a 121°C, por 15'.

5. Tampão ES

EDTA 0.4M pH 9.3 _____ 40mL
Sarcosyl a 1% _____ 10mL de Sarcosyl a 5%

6. Tampão CHEF-TE

Tris 0.1M pH 7.5 _____ 50mL de Tris 1M pH7.5
EDTA 0.1MpH 7.5 _____ 100mL
Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ 500mL

7. Solução DNS

Tris 0.1M pH8.0 _____ 5mL de Tris 1M pH8.0
MgCl₂ 5mM _____ 250μL de MgCl₂ 1M
Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____ 50mL

8. Agarose 1% (para selar o gel)

Agarose de baixo ponto de fusão _____ 100mg
Água MilliQ esterilizada _____ 10mL

II. Meios de cultura

Os meios de cultura, não discriminados abaixo foram preparados segundo as especificações ditadas pelos fabricantes. Por isso, no presente tópico, serão descritas apenas as fórmulas dos meios não industrializados.

1. Meio de Costa & Vernin (CV)

A - Base Semi-Sólido

| | |
|--------------------------------|---------|
| Peptona..... | 20,0 g |
| Cloreto de Sódio..... | 5g |
| Solução de Azul de Timol | 3 mL |
| Indicador de Andrade | 10 mL |
| Agar | 5g |
| Água destilada | 1000 mL |

Adicionar todos os elementos à água e aquecer até dissolver completamente o Agar. Ajustar o pH a 7,3 ou 7,4. Distribuir quantidades exatas do meio em balões e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

B - Base Sólida

| | |
|--------------------------------|---------|
| Peptona (Bacto) | 1g |
| Triptona ou tripticase | 5 g |
| Tiosulfato de Sódio | 0,2 g |
| Sulfato ferroso Amoniacal..... | 0,2 g |
| Solução de Azul de Timol | 3 mL |
| Indicador de Andrade | 10 mL |
| Agar | 20 g |
| Água destilada | 1000 mL |

Adicionar os componentes em água destilada e aquecer em banho maria fervente até completa dissolução. Ajustar o pH a 7,3 ou 7,4. Distribuir quantidades exatas do meio em balões e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Preparo e distribuição final do meio:

Fundir as bases e resfriar entre 50 a 60°C, aproximadamente. Adicionar a cada um deles, na proporção de 5mL por cada 100 mL de meio, a solução de uréia e açúcares. Distribuir inicialmente o ágar semi-sólido em volume de 2,5mL em tubos esterilizados de 13mm de diâmetro com altura variável. Deixar solidificar à temperatura ambiente cerca de 30 minutos, e acrescentar em seguida, volume idêntico por tubo, da base sólida. Inclinare os tubos de modo a deixar uma base de 2 a 3cm de altura, aproximadamente.

Solução de Azul de Timol

| | |
|----------------------|---------|
| Azul de Timol | 1,6 g |
| NaOH 0,1N | 34,4 mL |
| Água destilada | 65,6 mL |

Indicador de Andrade

| | |
|----------------------------|--------|
| Fucsina ácida | 0,5 g |
| Hidróxido de Sódio N | 16 mL |
| Água destilada | 100 mL |

Dissolver a fucsina em água destilada e adicionar o hidróxido.

Solução de Uréia e Açúcares

| | |
|----------------------|--------|
| Uréia | 20 g |
| Lactose | 30 g |
| Sacarose | 30 g |
| Água destilada | 100 mL |

Dissolver a mistura por aquecimento brando em banho maria e esterilizar por filtração. Conservar em geladeira.

2. Meio para Fermentação de Carboidratos – Utilização da Glicose

| | |
|----------------------------|--------|
| Peptona | 10 g |
| Extrato de Carne | 3 g |
| Cloreto de Sódio | 5 g |
| Indicador de Andrade | 10mL |
| Água destilada | 1000mL |

Ajustar pH a 7,1 – 7,2. Distribuir em volumes de 3 a 5mL esterilizar a 121°C por 15 minutos.

O carboidrato glicose é incorporados ao meio, na concentração final de 1,0%.

3. Agar Simples Fosfatado

| | |
|---|---------|
| Extrato de Carne (Merck) | 3,0g |
| Bacto-Peptona (Difco) | 10,0g |
| Cloreto de Sódio (Merck) | 3,0g |
| Fosfato dibásico de sódio 12 H ₂ O (Reagen) | 2,0g |
| Agar (Difco) | 10,0g |
| Água destilada q.s.p..... | 1000 mL |

pH 7.3 ± 0,1

Distribuir em tubos com volumes de 5mL e esterilizar a 121°C por 15 minutos.