

**MARCOS COELHO SIMÕES TRAVASSOS SOARES**

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS  
EM AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
ISOLADAS EM HOSPITAIS DA CIDADE DE  
NITERÓI-RJ.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Silvia Susana Bona de Mondino  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Lúcia Martins Teixeira**

**Universidade Federal Fluminense  
Niterói  
2005**

**MARCOS COELHO SIMÕES TRAVASSOS SOARES**

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS  
EM AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
ISOLADAS EM HOSPITAIS DA CIDADE DE  
NITERÓI-RJ.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Patologia Experimental

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Silvia Susana Bona de Mondino  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Lúcia Martins Teixeira**

**Niterói  
2005**

Soares, Marcos Coelho Simões Travassos

Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ / Marcos Coelho Simões Travassos Soares. Niterói, 2005.

77 folhas.

Dissertação de Mestrado (Mestrado em Patologia Experimental – Curso de Pós-graduação em Patologia – Universidade Federal Fluminense)

I. *Pseudomonas aeruginosa* II. Resistência III. Carbapenase  
1. Universidade Federal Fluminense. 2. Título

CDD:

# MARCOS COELHO SIMÕES TRAVASSOS SOARES

ESTUDO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE  
*Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM HOSPITAIS DA CIDADE DE  
NITERÓI-RJ.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Silvia Susana Bona de Mondino  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Lúcia Martins Teixeira

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração : Patologia Experimental

Aprovada em \_\_\_\_\_ de 2005.

## BANCA EXAMINADORA

### Titulares

**Prof. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira (examinador prévio)**  
Universidade Federal Fluminense

**Prof<sup>a</sup>. Beatriz Meurer Moreira**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Prof. Geraldo Renato de Paula**  
Universidade Federal Fluminense

### Suplentes

**Prof<sup>a</sup>. Rosana Rocha Barros**  
Universidade Federal Fluminense

**Prof<sup>a</sup>. Claudia Rezende Vieira de Mendonça Souza**  
Universidade Salgado de Oliveira

Niterói  
2005

Este trabalho é dedicado ao meu melhor amigo,  
José Marcos Soares.

“Que o mel é doce é coisa que me nego a afirmar,  
mas que parece doce eu afirmo plenamente”.

(Raul Seixas)

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela possibilidade de continuar fazendo simplesmente tudo que quero, pedindo a Ele a força e sabedoria para espalhar como é bom ser fiel à sua palavra.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Silvia Susana Bona de Mondino, minha orientadora, que nunca poupou esforços para concluir da melhor forma possível este trabalho, mostrando o verdadeiro sentido de ser professor.

Agradeço a todos que ajudaram na parte do trabalho realizada na UFRJ com sua atenção e companheirismo, Flavia Pellegrino, Ana Paula Carvalho, Felipe Piedade e todos os funcionários e estudantes do laboratório da Prof<sup>a</sup> Lúcia Martins Teixeira, minha co-orientadora, que foi fundamental para que este trabalho tivesse a proporção desejada.

Agradeço ao Prof. Pedro Juan Jose Mondino que ajudou de forma imprescindível neste trabalho.

Agradeço a todos do laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Antônio Pedro que foram extremamente solidários e nunca pouparam esforços: Sílvio Mello Júnior, Prof<sup>a</sup>. Benedita, Prof. Alciones, Prof<sup>a</sup>. Jupira, André e todos os estagiários.

Agradeço aos colaboradores nos hospitais de onde recebi as amostras: Adriana, no Hospital Santa Cruz; Deuzeli, no Hospital Azevedo Lima e Reginaldo, na Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha, que entenderam a importância deste trabalho.

Agradeço aos professores, secretárias e todos aqueles do Departamento de Patologia que ajudaram a construir este sonho.

Agradeço aos meus colegas de turma que sempre me ajudaram muito, em especial ao grupo de estudo Plaqnec e Irina Lermontov Borger, que sempre

acreditou em mim e me ensinou que os desafios são apenas oportunidades a serem aproveitadas.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho que compreenderam meus horários.

Agradeço à Mariana pela dedicação e, principalmente, por ter mostrado o que é ser uma pessoa boa.

Agradeço a Denise, Heitor, Leonardo e Roberta, pela amizade e a força que sempre me deram.

Agradeço a toda minha família por entender e gostar do meu jeito de ser, principalmente minha mãe, que sempre faz de tudo para eu ser feliz.

Agradeço a Neusa e Gabriel por fazerem parte da minha vida.

Agradeço à Aline por ser a melhor irmã do mundo.



# Sumário

## Resumo

Foram estudadas 162 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes atendidos em quatro hospitais localizados na cidade de Niterói, Rio de Janeiro; dois públicos: o Hospital Azevedo Lima e o Hospital Universitário Antônio Pedro, e dois privados, o Hospital Santa Cruz e a Casa de Saúde e Maternidade Santa Marta, no período de julho de 2002 até dezembro de 2003. As amostras foram isoladas a partir de diferentes espécimens clínicos: secreções (52,5%), urina (22,8%), sangue (8,6), ponta de cateter (6,2%), líquidos de punção (1,9%) e outras fontes (8%). Todas as amostras foram sensíveis a polimixina e mais da metade resistentes a cefotaxima (69,1%), ceftriaxona (65,5%), ciprofloxacina (54,9%), gentamicina (51,9%) e ticarcilina-ácido clavulânico (50,6%) e em menor proporção a imipenem (35,8%), cefepima (33%), amicacina (32,1%), ceftazidima (30,9%), aztreonam (27,8%) e piperacilina-tazobactam (27,8%). A produção de metalo  $\beta$ -lactamase (M- $\beta$ la) foi detectada em 9 (5,6%) amostras isoladas em três dos quatro hospitais avaliados. O estudo da diversidade genética foi efetuado analisando os perfis de fragmentação do DNA cromossômico, após tratamento com a enzima *SpeI* e eletroforese em campo pulsado (PFGE). De 19 amostras selecionadas, as 10 não produtoras de M- $\beta$ la que apresentaram diferentes graus de multirresistência aos antimicrobianos, revelaram grande diversidade genética. Entretanto, as 9 amostras produtoras de M- $\beta$ la, mostraram pertencer a um único clone, o mesmo detectado em amostras de *P. aeruginosa* com a mesma característica de resistência, isoladas nas cidades de Rio de Janeiro e São Paulo, sugerindo a disseminação interhospitalar do microorganismo, tanto no âmbito local como regional.

**PALAVRAS CHAVE:** *Pseudomonas aeruginosa* – Resistência antimicrobiana – Carbapenases.

## Abstract

A total of 162 *P. aeruginosa* strains was studied. They were isolated from patients attended in four hospitals located in Niterói city, Rio de Janeiro state, two of them supported by public health system: Hospital Azevedo Lima and Hospital Universitário Antônio Pedro, and the others from private service: Hospital Santa Cruz and Casa de Saúde Santa Marta, between July 2002 and December 2003. The isolates were recovered from different clinical sources, including: urine (22.8%); secretions (52.5%); catheter tips (6.2%); blood specimens (8.6%); fluids (1.9%) and others (8%). All strains were susceptible to polymyxin B. More than half of them showed resistance to cefotaxime (69.1%); ceftriaxone (65.5%); ciprofloxacin (54.9%); gentamicin (51.9%) and ticarcillin-clavulanic acid (50.6%), and in lower percentages to imipenem (35.8%); cefepime (33%); amikacin (32.1%); ceftazidime (30.9%); aztreonam (27.8%) and piperacillin-tazobactam (27.8%). Metallo- $\beta$ -lactamase (M- $\beta$ la) production was detected in 9 (5.6%) strains recovered from three of the four hospitals evaluated. The genetic diversity study was performed by chromosomal DNA fragmentation, after *SpeI* enzymatic treatment using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Among 19 strains selected from the study, 10 non M- $\beta$ la producer multidrug-resistant strains showed a large variety of genetic profiles. However, the 9 M- $\beta$ la producers were allocated in a single clonal group, the same genetic profile detected among *P. aeruginosa* M- $\beta$ la producing strains, recovered in São Paulo city and Rio de Janeiro city, suggesting interhospital spread of strains at a local and regional level.

**KEY WORDS:** *Pseudomonas aeruginosa* – Antimicrobial resistance – Carbapenases

# Sumário

<b>1 – Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2- Revisão bibliográfica.....</b>	<b>13</b>
2.1 - Taxonomia e características gerais .....	13
2.2 - Infecções clínicas.....	15
2.3 - Fatores de virulência.....	16
2.4 - Resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos agentes antimicrobianos .....	18
2.4.1- Permeabilidade da membrana e sistemas de efluxo .....	18
2.4.1.1- Porinas expressas por <i>P. aeruginosa</i> .....	19
2.4.1.2- Sistemas de efluxo em <i>P. aeruginosa</i> .....	20
2.4.2- Produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos .....	23
2.4.3- Produção de $\beta$ -lactamases .....	23
2.4.4- Resistência às quinolonas .....	26
2.4.5- Resistência à polimixina.....	26
2.5- Métodos de tipagem.....	27
<b>3 – Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>4 – Materiais e Métodos.....</b>	<b>30</b>
4.1 - Amostras bacterianas .....	30
4.2 - Caracterização fenotípica das amostras .....	30
4.2.1 - Teste da Oxidase .....	31
4.2.2 - Teste da oxidação-fermentação da glicose (OF glicose) em meio de OF segundo Hugh Leifson .....	31
4.2.3 - Teste da descarboxilação da arginina .....	32
4.2.4 - Teste de crescimento a 42°C .....	33
4.2.5 - Observação da produção de pigmentos.....	33
4.3 - Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	33
4.3.1 - Teste de difusão em ágar .....	33
4.3.2 - Detecção da produção de Carbapenemases ou metalo- $\beta$ -lactamases (M- $\beta$ la) ..	34
4.4 - Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	35
4.5 – Testes estatísticos.....	38
<b>5- Resultados.....</b>	<b>39</b>
5.1 - Amostras bacterianas: fonte de isolamento e identificação fenotípica .....	39
5.2 - Identificação da espécie <i>P. aeruginosa</i> .....	39
5.3 - Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	40
5.4 – Detecção da produção de metalo- $\beta$ -lactamases.....	41
5.5 – Perfis de resistência aos antimicrobianos das amostras de <i>P. aeruginosa</i> , de acordo com os resultados dos testes de difusão. ....	41
5.6 - Comparação da susceptibilidade frente ao imipenem e meropenem .....	42
5.7- Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	43
<b>6 – Discussão .....</b>	<b>59</b>
<b>7 – Conclusões .....</b>	<b>68</b>
<b>8 - Bibliografia.....</b>	<b>70</b>

## 1 – Introdução

Além de provocar diversas infecções comunitárias, *Pseudomonas aeruginosa* é o bacilo gram negativo não fermentador mais frequentemente associado a infecções de origem hospitalar, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou portadores de doenças de base.

A crescente detecção de infecções hospitalares causadas por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* tem sido motivo de grande preocupação. Diversos mecanismos estão envolvidos na resistência aos antimicrobianos expressa por esse microorganismo, destacando-se: baixa permeabilidade da membrana externa; sistemas de efluxo; produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e produção de  $\beta$ -lactamases. Este último inclui a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases da classe C (AmpC), que confere resistência a todas as cefalosporinas (exceto as de 4<sup>a</sup> geração) e ao aztreonam, assim como as  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado da Classe A (ESBL, do inglês Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase), que conferem resistência às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração e ao aztreonam e, mais recentemente, a produção de carbapenases ou metalo- $\beta$ -lactamases (M- $\beta$ la) que destroem os carbapenems.

A utilização de técnicas moleculares é de relevante importância nos estudos de amostras de *P. aeruginosa* envolvidas em infecções hospitalares desde que permitem estabelecer o grau de similaridade entre as mesmas,

possibilitando a caracterização de surtos de infecção, a detecção de possíveis fontes de transmissão e os aspectos epidemiológicos de disseminação.

Considerando a escassez de dados em relação à resistência de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos na cidade de Niterói, nosso estudo pode colaborar para suprir essa deficiência, ao mesmo tempo que permite uma análise comparativa entre as amostras isoladas de diferentes hospitais locais.

## 2- Revisão bibliográfica

### 2.1 - Taxonomia e características gerais

A classificação taxonômica do gênero *Pseudomonas*, descrito há mais de 100 anos, tem sofrido várias revisões. Stanier, Palleroni & Doudoroff em 1966 foram uns dos primeiros a classificar as espécies de acordo com certas propriedades fenotípicas em quatro grupos: fluorescente, pseudomallei, acidovorans e alcaligenes.

Em 1973, num trabalho realizado por Palleroni e colaboradores, foi verificada, através de estudos de homologia DNA  $\pm$  rRNA uma grande heterogeneidade, o que levou os autores a classificar o gênero em cinco grupos geneticamente diferentes.

Em 1996, Kersters e colaboradores re-classificaram quatro desses cinco grupos de homologia em novos gêneros: *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* e *Brevundimonas*. O gênero *Pseudomonas* ficou, assim, alocado no Grupo I incluindo as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas monteillii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas luteola* e *Pseudomonas oryzihabitans*.

As espécies do gênero *Pseudomonas* apresentam-se como bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos e aeróbios estritos. A maioria apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, utiliza a glicose e outros carboidratos oxidativamente e possuem a enzima citocromo-oxidase (Kiska & Gillian, 2003).

*P. aeruginosa* é a espécie mais freqüentemente isolada de amostras clínicas; produz os pigmentos pioverdina (pigmento fluorescente) e piocianina (pigmento de cor azul) responsáveis pela cor verde brilhante característica das colônias de *P. aeruginosa*. Algumas amostras produzem também outros pigmentos hidrossolúveis como piorrubina (avermelhado) ou piomelanina (marron a preto) (Vasil, 1986; Pollack, 1995).

É uma bactéria ubíqua, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo, água e plantas. É pouco freqüente como constituinte da microbiota de indivíduos saudáveis. Entretanto, os pacientes hospitalizados, principalmente aqueles internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), se colonizam facilmente devido à freqüente exposição a instrumentos e aparelhos auxiliares, mãos dos profissionais de saúde e uso de antimicrobianos de amplo espectro. O trato gastrintestinal é o principal sítio de colonização e reservatório de *P. aeruginosa* podendo ser encontrada também em outros locais úmidos do corpo, como orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo. Além disso, este microrganismo é constantemente re-introduzido no ambiente hospitalar através de alimentos, especialmente frutas e vegetais, propiciando,



em indivíduos imunodebilitado, a colonização e aparecimento de quadros clínicos graves, inclusive bacteremia (Kiska & Gillian, 2003).

## **2.2 - Infecções clínicas**

As infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem desde infecções superficiais da pele até septicemias fulminantes (Kiska & Gillian, 2003).

As infecções adquiridas na comunidade por pacientes imunocompetentes, muitas vezes associadas ao contato com água contaminada, tendem a ser localizadas, como nos casos de foliculite e de otite externa dos nadadores. Após um pequeno trauma na córnea, infecções oculares por *P. aeruginosa*, decorrentes do uso de lentes de contato contaminadas com a solução utilizada para sua estocagem, podem evoluir para úlcera e até perda da visão (Kiska & Gillian, 2003).

*P. aeruginosa* é agente etiológico pouco freqüente de pneumonia adquirida na comunidade. Entretanto, em pacientes com fibrose cística é o patógeno mais prevalente, expressando um fenótipo tipicamente mucóide, difícil de ser erradicado (Kiska & Gillian, 2003). Num estudo realizado com crianças que padeciam da doença e estavam infectadas, foi verificada uma função pulmonar muito comprometida e uma redução na expectativa de vida de aproximadamente 10 anos, quando comparadas com aquelas não infectadas por *P. aeruginosa* (Saiman & Siegel, 2004).

*P. aeruginosa* é um importante agente etiológico de infecções hospitalares, sendo que, como demonstrado por Mayhall (1997), os pacientes submetidos à respiração assistida têm muito maior chance de desenvolver pneumonia hospitalar, atingindo taxas de mortalidade de até 50%. Outras infecções hospitalares freqüentes são as do trato urinário, as peritonites em pacientes submetidos a diálise peritoneal, as bacteremias e as infecções de feridas (Szeto *et al.*, 2001; Kiska & Gillian, 2003).

A bacteremia e o choque séptico são os quadros clínicos mais graves, principalmente em pacientes com distúrbios cardio-pulmonares, renais crônicos, diabéticos e com câncer, apresentando altas taxas de mortalidade. (Kiska & Gillian, 2003). Collin e colaboradores (2001), avaliando pacientes que receberam transplantes de medula, verificaram que apenas 3% dos episódios de bacteremia foram por *P. aeruginosa*, porém, com uma taxa de mortalidade de até 40%. Em usuários de drogas ilícitas, a bacteremia está freqüentemente associada a endocardite aguda (Kiska & Gillian, 2003).

### **2.3 - Fatores de virulência**

*P. aeruginosa* é considerada a espécie mais virulenta dentre os bacilos Gram negativos não fermentadores, como resultado da produção de uma grande variedade de fatores de virulência celulares e extracelulares. Dentre os fatores celulares se destacam os pilli, apêndices superficiais que promovem a aderência do microrganismo a receptores de gangliosídeo GM-1 presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro, os flagelos, que também

participam da aderência, e a endotoxina (lipopolissacarídeo da parede celular; LPS) responsável pela síndrome séptica através da ativação e liberação de mediadores de vasodilatação, como interleucina 1 e fator de necrose tumoral, da ativação do complemento e da deflagração de coagulação intravascular disseminada, entre outros mecanismos (Bone, 1993)

Dentre os fatores extracelulares, se destacam: a) produção de alginato, um polissacarídeo capsular que permite a aderência às superfícies epiteliais pulmonares com a formação de grandes conglomerados bacterianos, biofilme, que protege a bactéria da ação dos antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro; este fator de virulência é hiperproduzido pelas cepas de *P. aeruginosa* responsáveis por infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística (Head *et al.*, 2004); b) produção de enzimas como a elastase, que degrada as imunoglobulinas e os componentes do complemento e a exoenzima S que, além de inibir a síntese protéica, tem função de adesina, como comprovado em estudos com modelos animais que evidenciaram a inibição da aderência de *P. aeruginosa* a células após tratamento com anticorpos contra esta enzima; c) leucocidina, substância que inibe a função de neutrófilos e linfócitos; d) piocianina, que impede o crescimento de outras bactérias e inibe a atividade ciliar da mucosa respiratória; e) toxinas como a exotoxina A, que promove destruição tecidual inibindo a síntese protéica; (Sawa *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2000).

## **2.4 - Resistência de *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos**

*P. aeruginosa* apresenta resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos, como a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, as tetraciclinas, ao cloranfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Dentre os mecanismos responsáveis destacam-se: a baixa permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção de  $\beta$ -lactamases (Li *et al.*, 1994; 1995).

### **2.4.1- Permeabilidade da membrana e sistemas de efluxo**

A membrana externa de bactérias Gram negativas, assim como outras membranas biológicas, é constituída principalmente por uma bicamada lipídica pouco permeável a solutos hidrofílicos, tais como a maioria dos nutrientes e alguns antimicrobianos. A penetração destes compostos, assim como a excreção de metabólitos, ocorre através de canais protéicos de difusão inespecíficos, denominados porinas, os quais foram detectados em todas as espécies de bactérias Gram negativas e em algumas Gram positivas como as do complexo *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium* (Nikaido, 2003).

Alem das porinas, outros canais são componentes constitutivos da membrana celular, como os formados por proteínas triméricas, conhecidas como bombas de efluxo, que atuam expulsando de forma ativa compostos tóxicos à célula, incluindo antimicrobianos. Ambos sistemas atuam de forma

sinérgica: as porinas, quando expressas em pequeno número ou ausentes, diminuem drasticamente a concentração do antimicrobiano no meio intracelular, efeito este potencializado pela ação das bombas de efluxo (Livermore, 2001; Chuanchuen, 2002).

#### **2.4.1.1- Porinas expressas por *P. aeruginosa***

A principal porina expressa por *P. aeruginosa* é a OprF, a qual é uma porina inespecífica, já que é utilizada por vários tipos de substratos para penetrar na bactéria, incluindo-se, entre eles, os antibióticos. Uma característica marcante desta porina é a lenta difusão dos substratos através dela, o que explica a resistência intrínseca da bactéria a vários antimicrobianos.

Dentre as porinas específicas expressas por *P. aeruginosa*, se encontram aquelas utilizadas exclusivamente por determinados antibióticos. A mais relevante é a OprD, utilizada pelo imipenem para atravessar a membrana externa. Durante o tratamento com este antimicrobiano podem surgir mutantes deficitárias da mesma, com o conseqüente aparecimento de resistência. Esta mutação não compromete a viabilidade bacteriana, uma vez que OprD não é essencial para promover a entrada da maioria dos nutrientes (Trias & Nikaido, 1990).

A porina OprE (inicialmente denominada proteína E1) apresenta alto grau de homologia com a OprD, sendo específica para a entrada de cefalosporinas. A proteína E2 (inicialmente denominada proteína E) é utilizada

para a penetração de cefalosporinas e quinolonas. As mutantes deficientes destas porinas tornam-se resistentes aos antimicrobianos correspondentes (Yamano *et al.*, 1990).

#### **2.4.1.2- Sistemas de efluxo em *P. aeruginosa***

A retirada ativa de compostos tóxicos é parte de um mecanismo geral que as bactérias têm desenvolvido para se proteger contra produtos adversos do ambiente em que vivem. Os antimicrobianos utilizados na clínica estão entre esses compostos tóxicos e a sua exclusão compromete a terapêutica. Muitos genes que codificam bombas de efluxo para múltiplos antimicrobianos são expressos constitutivamente, conferindo resistência intrínseca aos mesmos (Lomovskaya *et al.*, 2001).

O genoma de *P. aeruginosa* contém genes que codificam, no mínimo, 12 sistemas de efluxo, dos quais seis já foram caracterizados: MexA-MexB-OprM (Poole *et al.*, 1993); MexC-MexD-OprJ (Poole *et al.*, 1996); MexE-MexF-OprN (Köhler *et al.*, 1997); MeX-MexY (Mine *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2002); MexJ-MexK (Chuanchuen *et al.*, 2002) e MexG-MexHI-OpmD (Aendekerk, *et al.*, 2002). Estes sistemas são designados como sistemas de efluxo MDR (do inglês, multiple drug resistance), pois conferem resistência a múltiplos antimicrobianos (Okamoto, Gotho & Nishino 2001).

Os sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* pertencem à classe RND (resistance-nodulation-division) (Kievit *et al.*, 2001; Llanes *et al.*, 2004); seu

funcionamento é baseado na abertura de um canal que atravessa as membranas externa e interna, permitindo com que o substrato seja eliminado para o meio extracelular. Este canal é composto por três proteínas: uma, que é a bomba propriamente dita, dependente de energia, localizada na membrana citoplasmática e que funciona como transportadora (MexB, MexD, MexF e MexY); outra, que facilita a passagem do substrato pela membrana externa (OprM, OprJ, OprN, OpmB, OmpG e OmpI) e uma terceira, periplasmática, que faz a ligação entre as outras duas (MexA, MexC, MexE, MexX, MexJ e MexGH). Os genes que codificam estes sistemas são organizados em operons, nos quais o primeiro gene codifica a proteína periplasmática, o segundo a proteína transportadora e o terceiro a proteína da membrana externa (Livermore, 2002; Jo *et al.*, 2003).

Dentre os 6 sistemas de efluxo descritos, o MexA-MexB-OprM, é o único expresso constitutivamente, removendo  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprim. A superexpressão deste sistema, decorrente de mutações no gene repressor provocadas pela exposição aos substratos específicos, compromete a sensibilidade às fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas, dos inibidores de  $\beta$ -lactamase e ao meropenem, mas não ao imipenem (Li *et al.*, 1998; Chuanehuen *et al.*, 2001; Livermore, 2001;).

O sistema MexC-MexD-OprJ funciona como bomba de efluxo para quinolonas, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, ceftazidima e cefoperazona (Masuda *et al.*, 2000).

O sistema MexE-MexF-OprN, quando expresso de forma exacerbada, é responsável pelo aumento da resistência a quinolonas e carbapenems (Maseda *et al.*, 2000).

A co-expressão dos sistemas MexC-MexD-OprJ e MexE-MexF-OprN, tem sido descrita como responsável pela resistência a fluoroquinolonas em amostras isoladas de pacientes com fibrose cística. A co-expressão de três sistemas de efluxo: MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ e MexE-MexF-OprN, resulta num aumento das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos antimicrobianos sobre os quais atuam; estas CIMs são significativamente menores em amostras que expressam um único sistema de efluxo (Llanes *et al.*, 2004).

O sistema de efluxo MexX-MexY, que só é expresso como resposta a alguns antimicrobianos, permite a *P. aeruginosa* tornar-se resistente a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e macrolídeos (Masuda *et al.*, 2000; Llanes *et al.* 2004 ; Poole, 2005). O sistema MexJ-MexK atua expulsando tetraciclina e eritromicina, mas apenas na presença de OprM, (Chuanchuen *et al.*, 2002). O sistema MexG-MexHI-OpmD confere resistência ao vanádio,



substância com efeito bacteriostático sobre *P. aeruginosa* (Aendekerk *et al.*, 2002).

#### **2.4.2- Produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos**

Este mecanismo de resistência está freqüentemente relacionado com a produção de enzimas que provocam modificações em diferentes sítios das moléculas de aminoglicosídeos, seja através de acetilação, fosforilação e/ou adenilação. (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Poole, 2005). Quase todas as cepas de *P. aeruginosa* expressam estas enzimas. Por exemplo, a 6-fosfotransferase e a 3'-fosfotransferase que modificam neomicina e kanamicina, tornam *P. aeruginosa* naturalmente resistente a esses aminoglicosídeos (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). Algumas amostras produzem uma 3-acetiltransferase e 2-adeniltransferase que modificam a gentamicina e a tobramicina. A produção de  $\Psi$ -acetiltransferase confere resistência também à amicacina (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). É interessante destacar que o gene *aac(6')*, que codifica a enzima acetil transferase 6', está freqüentemente associado com genes que codificam  $\beta$ -lactamases de amplo espectro e M- $\beta$ la (Poole, 2005).

#### **2.4.3- Produção de $\beta$ -lactamases**

Todas as amostras de *P. aeruginosa* são produtoras constitutivas, em níveis baixos, de  $\beta$ -lactamase induzível da classe C de Ambler (AmpC). A indução desta enzima é efetuada por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como ampicilina e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, que são considerados fortes indutores, e

subseqüentemente são hidrolisados por ela. A seleção de mutantes parcial ou induzidos por indutores fracos, como ureidopenicilinas e cefalosporinas de espectro ampliado; estes antimicrobianos, embora lábeis à ação da AmpC, quando entretanto destruídos por amostras que sintetizam grande quantidade de enzima. Os carbapenems são fortes indutores, sendo o meropenem mais estável que o imipenem à ação dessa enzima. A CIM deste último antibiótico aumenta de 0,12 a 0,5 µg/mL para 1 a 2 µg/mL nas amostras intensamente produtoras (Livermore, 1992; 1995).

As β-lactamases de espectro ampliado sintetizadas por *P. aeruginosa* pertencem às classes A, B e D de Ambler. As enzimas da classe A descritas são PER-1, TEM-42 e SHV2A. A enzima PER-1 foi primeiramente descrita em uma amostra isolada do trato urinário de um paciente turco hospitalizado em Paris em 1992 (Nordmann *et al.*, 1993). Está amplamente difundida entre amostras de *P. aeruginosa* isoladas na Turquia, sendo detectada em 11% das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas no estudo de Vahaboglu e colaboradores (1997). Em 2001, PER-1 foi detectada em amostras de *P. aeruginosa* isoladas num surto de infecção hospitalar na Itália (Luzzaro *et al.*, 2001). A β-lactamase TEM-42 foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada da pele de um paciente queimado VERIFICAR PAÍS (Mugnier *et al.*, 1996). A β-lactamase SHV-2a foi detectada em Paris em duas amostras de *P. aeruginosa*, isoladas em 1995 e 1996 (Nordmann & Guibert, 1998).

As  $\beta$ -lactamases do tipo OXA, pertencentes à classe D de Ambler, conferem resistência a ampicilina, cefalotina, oxacilina e cloxacilina; são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, razão pela qual sua detecção é difícil em laboratórios de rotina. Da mesma forma que as enzimas derivadas de TEM e SHV, as oxacilinases sofreram mutações pontuais nos seus genes, o que explica o grande número de variações existentes e os diferentes efeitos hidrolíticos sobre ceftazidima. Muitas das enzimas do tipo OXA derivam da OXA-10 (OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19, -28 e 35) e da OXA-2 (OXA-15); a OXA-18 não é diretamente derivada de nenhuma outra variante OXA. Enquanto a maioria das ESBLs (do inglês, extended spectrum  $\beta$ -lactamase) foram encontradas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae*, as do tipo OXA foram encontradas principalmente em *P. aeruginosa* (Nordmann & Guibert 1998; Aubert *et al.*, 2001).

Durante a última década foram identificadas enzimas que promovem a hidrólise das cefalosporinas e dos carbapenems mas não do aztreonam; elas pertencem à classe B de Ambler e, por destruírem os carbapenems, são denominadas de carbapenases. Existem quatro tipos de carbapenases: IMP-1, VIM-1, VIM-2 e SPM-1. Inicialmente, foram identificadas amostras produtoras de IMP-1, freqüentemente detectadas no Japão, na China, na Europa e no Canadá. Posteriormente, VIM-1 e VIM-2, caracterizadas inicialmente na Itália e na França respectivamente, foram também detectadas na Coreia e na Grécia. Recentemente, um quarto membro das  $\beta$ -lactamases adquiridas da classe B de

Ambler, denominada SPM-1, foi identificada em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em São Paulo (Gales *et al.*, 2003). No Brasil, além da enzima SPM-1, foi relatada a presença das enzimas IMP-1 e VIM-2 em amostras isoladas em São Paulo (Sader *et al.*, 2005).

#### **2.4.4- Resistência às quinolonas**

As fluoroquinolonas são utilizadas com sucesso em clínica médica para o tratamento de infecções respiratórias e urinárias. O alvo das quinolonas são as topoisomerases tipo II (DNA-girase em bactérias Gram negativas), enzimas que separam as fitas de DNA em duas fitas simples. Mutações nos genes que codificam a DNA-girase são o principal mecanismo de resistência de *P. aeruginosa* as fluoroquinolonas. Essas mutações, normalmente ocorrem no gene *gyrA* que codifica a subunidade A da DNA-girase, alterando os aminoácidos situados na região NH<sub>2</sub> terminal da proteína. Esta região é muito conservada e contém uma tirosina, na posição 122, que promove a união da DNA-girase ao DNA. As alterações nesta região reduzem a afinidade das quinolonas pela DNA-girase (Hancock, 1998; Mansilla & Garrote, 1998).

#### **2.4.5- Resistência à polimixina**

Os peptídeos catiônicos antimicrobianos (CAPs) são os responsáveis pela defesa mais primitiva das células de animais e de plantas. Seu efeito antimicrobiano é atribuído ao caráter anfipático semelhante ao dos detergentes naturais, que lhes permite interagir tanto com componentes hidrofílicos quanto hidrofóbicos do envelope bacteriano. Os CAPs se ligam ao LPS, principal

componente da membrana externa das bactérias Gram negativas, através de interações com fosfatos e ácidos graxos do corpo do LPS e lipídeo A. Estes antimicrobianos desestabilizam a membrana externa por deslocamento de cátions divalentes, com o conseqüente aumento da passagem do antimicrobiano e morte bacteriana (Moskowits *et al.*, 2004).

Os CAPs sintetizados por *Bacillus polymyxa* são utilizados como antibióticos. Desde a descoberta inicial do uso clínico das polimixinas, há mais de 50 anos, foram detectadas amostras de *P. aeruginosa* de origem clínica e experimental resistentes a essas drogas. *P. aeruginosa* possui proteases que podem degradar alguns CAPs; em adição a esse fato pode haver resistência fisiológica ou adaptativa à polimixina como resposta ao estresse da membrana, o que provoca diminuição da concentração de cátions divalentes e subseqüente alteração na composição do lipídeo A, alvo do antimicrobiano (Moskowits *et al.*, 2004).

## **2.5- Métodos de tipagem**

Os estudos epidemiológicos que permitem estabelecer o grau de similaridade entre as amostras de *P. aeruginosa* envolvidas em infecções hospitalares são de extrema importância, já que contribuem para a caracterização de surtos de infecção e a avaliação de possíveis fontes de transmissão e modos de aquisição desse patógeno (Olive & Bean, 1999).

Em geral, os métodos fenotípicos possuem baixo poder discriminatório e baixa reprodutibilidade quando comparados aos métodos genotípicos. As características fenotípicas, que diferenciam os microrganismos através da detecção de produtos da expressão de determinados genes, podem variar de acordo com mudanças nas condições e fase de crescimento do microrganismo assim como pela ocorrência de mutações espontâneas (Tenover, Arbeit & Goering, 1997).

Métodos genotípicos, tais como a determinação do perfil plasmidial, a ribotipagem, a avaliação do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), a amplificação de segmentos do DNA empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e, principalmente, a análise de fragmentação do DNA, após digestão com enzimas de restrição, através de eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE), são recomendados para a tipagem de microrganismos com propósitos epidemiológicos. Estes métodos são menos sujeitos a variações e apresentam maior poder discriminatório, maior reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de bancos de dados para caracterização dos microrganismos (Tenover, Arbeit & Goering, 1997; Olive & Bean, 1999; Belkum *et al.*, 2001).

### 3 – Objetivos

Devido à importância crescente de *P. aeruginosa* como agente de infecções hospitalares e ao surgimento constante de amostras multirresistentes que tornam, às vezes, inviável qualquer esquema terapêutico antimicrobiano, é de grande relevância a vigilância constante para detectar precocemente o aparecimento destas cepas. A carência de pesquisas realizadas neste sentido em nosso meio nos estimulou a analisar um número representativo de amostras isoladas em hospitais da cidade de Niterói, tendo como principais objetivos:

- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos através do teste de difusão em ágar.
- Detectar a produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M- $\beta$ la) em amostras resistentes à ceftazidima, através do método de disco aproximação.
- Interrelacionar genotipicamente as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M- $\beta$ la.

## **4 – Materiais e Métodos**

### **4.1 - Amostras bacterianas**

Foram estudadas 162 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes atendidos em 4 hospitais do município de Niterói: Hospital Azevedo Lima (HAL), Hospital Santa Cruz (HSC), Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha (CSMSM) e Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). O HAL e o HUAP são hospitais de atendimento terciário com 250 e 290 leitos respectivamente; o HSC e a CSMSM são hospitais privados com 100 e 130 leitos, respectivamente. Os quatro hospitais possuem áreas de alto risco como Unidades de Terapia Intensiva, e áreas de menor risco, como enfermarias gerais.

Foram avaliadas as amostras de *P. aeruginosa* isoladas a partir de espécimens clínicos diversos, processados nos respectivos laboratórios de bacteriologia de cada hospital, no período de julho de 2002 até dezembro de 2003. Foram avaliadas apenas uma amostra por paciente. As amostras foram mantidas congeladas entre -18°C a -20°C, sob forma de suspensões densas em leite desnatado Molico® (Nestlé, Araçatuba, São Paulo) a 10% (p/v) acrescido de glicerol (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) a 10% (v/v).

### **4.2 - Caracterização fenotípica das amostras**

As amostras de *P. aeruginosa* avaliadas neste estudo, foram inicialmente identificadas nos laboratórios de origem através da utilização da



metodologia particular de cada um. A partir da verificação da pureza das culturas foram feitas, em todas as amostras, testes confirmatórios de sua identificação. Os testes executados foram: observação das características morfo-tintoriais após coloração pelo método de Gram, teste da oxidase, teste de oxidação-fermentação da glicose (OF Glicose) em meio de OF segundo Hugh-Leifson, teste de descarboxilação da arginina, teste de crescimento em caldo a 42°C e observação da produção de pigmentos. Estes testes foram executados conforme descrito a seguir, seguindo as recomendações de Koneman *et al.*, (1997). Em todos os testes foram utilizadas amostras para controle positivo e negativo, conforme indicado.

#### **4.2.1 - Teste da Oxidase**

A determinação da produção da enzima citocromo-oxidase foi realizada a partir da remoção de uma colônia bacteriana utilizando material não metálico (palito), o qual foi depositado sobre tiras de papel de filtro impregnadas com o reativo p-fenilenodiamina (Laborclin, Pinhais, PR). O teste positivo foi indicado pelo aparecimento de coloração arroxeadada em até 10 segundos. Como controle negativo foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 e como controle positivo a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

#### **4.2.2 - Teste da oxidação-fermentação da glicose (OF glicose) em meio de OF segundo Hugh Leifson**

A detecção da produção de ácidos como produtos do metabolismo oxidativo da glicose foi realizada utilizando, para cada amostra, dois tubos contendo o meio OF segundo Hugh Leifson (Merck, Darmstand, Alemanha)

acrescido de solução de glicose 1% (p/v). A amostra foi inoculada com o auxílio de agulha bacteriológica e um dos tubos foi coberto com óleo mineral esterilizado até cerca de 1 a 2cm da superfície. Os tubos foram incubados a 35°C - 37°C durante 24h-48h em atmosfera convencional. O teste foi considerado positivo se ocorresse mudança de coloração do meio verde para o amarelo somente no tubo exposto ao oxigênio atmosférico. Como controle negativo foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 e como controle positivo a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

#### **4.2.3 - Teste da descarboxilação da arginina**

O teste foi realizado a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em um tubo contendo meio base para descarboxilação de aminoácidos segundo Moeller (Becton Dickinson, Sparks, EUA) acrescido de arginina (Merck). Um outro tubo não acrescido de aminoácido foi usado como controle negativo. Os tubos foram cobertos com óleo mineral esterilizado até cerca de 1cm da superfície e incubados a 35°C ± 37°C por 24h ± 48h em atmosfera convencional. O teste foi considerado positivo onde ocorreu o desenvolvimento de uma coloração púrpura como indicativo da produção de aminas decorrente da descarboxilação do aminoácido. Como controle negativo foi utilizada uma amostra de *Burkholderia cepacia* Bc1 da coleção de culturas do Laboratório de Infecções (IMPPG-UFRJ), e como controle positivo a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

#### **4.2.4 - Teste de crescimento a 42°C**

Para a observação do crescimento visível a 42°C a amostra bacteriana em teste foi inoculada em meio Trypcase Soy (Merck, Darmstand, Alemanha) e incubada em banho-maria a 42°C por 18h-24h. Como controle negativo foi utilizada a cepa de *P. fluorescens* Pf1 da coleção de culturas do Laboratório de Infecções (IMPPG-UFRJ) e como controle positivo a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

#### **4.2.5 - Observação da produção de pigmentos**

Foi observada a produção de pigmentos após semeadura da amostra em meio de agar Mueller-Hinton (Merck) e incubação a 35°C - 37°C durante 16h ± 18h sob atmosfera convencional.

### **4.3 - Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

#### **4.3.1 - Teste de difusão em ágar**

A avaliação da susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos foi realizada através da utilização do teste de difusão em ágar conforme as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000), e como sugerido por Gales *et al* (2001) para a polimixina B. Todas as amostras foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos (CECON, São Paulo- SP): amicacina (30µg); aztreonam (30µg); cefepima (30µg); ceftazidima (30µg); ciprofloxacina (5µg); gentamicina (10µg); imipenem (10µg); piperacilina-tazobactam (75/10µg); polimixina B (300U); ticarcilina-acido

clavulânico (75/10µg); cefotaxima (30µg) e ceftriaxona (30µg). Em 89 amostras foi avaliada também a susceptibilidade frente ao meropenem (10µg).

#### **4.3.2 - Detecção da produção de Carbapenemases ou metalo-β-lactamases (M-βla)**

As 50 amostras de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima, foram submetidas à avaliação da produção de M-βla através do método do disco aproximação, de acordo com a metodologia proposta por Arakawa e colaboradores (2000). Foi utilizado, como inibidor de M-βla, o ácido 2-mercaptotropiônico (MP) (Merck), que possui a propriedade de bloquear a ação da M-βla da mesma forma que o EDTA, a partir do seqüestro dos metais do meio. A ceftazidima foi escolhida para a realização deste teste uma vez que o uso deste antimicrobiano foi o que proporcionou resultados mais nítidos nos experimentos de Arakawa e colaboradores (2000).

Cerca de três colônias de cada amostra bacteriana foram utilizadas para o preparo de suspensões em soro fisiológico esterilizado, com turvação semelhante a da escala 0,5 de McFarland. Estas suspensões foram semeadas FRPDX[tOLRGHvZDEV´HVWHULOL]DGRVHPSODFDVFRQWHQGRPHLRGHijDU0XHOOHU Hinton (Merck). Foram aplicados sobre a superfície do ágar dois discos de ceftazidima (30 µg) a uma distância de cerca de 5 cm. Um disco de papel de filtro em branco foi aplicado a uma distância de cerca de 2cm de um dos discos de ceftazidima. Uma alíquota de 3 µL de uma solução contendo 1,2g/mL de MP foi adicionada ao disco em branco após sua aplicação sobre o ágar. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 16h ± 18h. A observação do surgimento

de um halo ou do aumento do tamanho do halo ao redor do disco de ceftazidima localizado próximo ao disco com MP indicou a produção de M-βla pela amostras bacterianas.

#### **4.4 - Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

Para o estudo da diversidade genética foram selecionadas 19 amostras incluindo as 9 amostras produtoras de M-OD H RXWUDV SHUWHQFHQWHV DRV diferentes perfis de resistência a antimicrobianos, sendo 5 pertencentes ao Perfil I, 3 ao Perfil II, 2 ao Perfil III para fins comparativos, conforme categorização apresentada no item 5.5 de resultados; foi também analisada uma amostra isolada em São Paulo produtora de M-βla.

Foi utilizada a técnica descrita por Teixeira e colaboradores (1997), com modificações. As amostras foram cultivadas em meio de TSA (Trypticase Soy Agar, Becton Dickinson), e incubadas a 35°C-37°C, durante 18h-24h. A partir desse crescimento foram feitas suspensões em 500μL de tampão PIV (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM [pH 7,6] ), de modo a obter uma turvação semelhante à da escala 5 de McFarland. Esse volume de suspensão bacteriana foi misturado com um volume igual de agarose de baixa temperatura de fusão a 2% (NuSieve GTG; FMC BioProducts, Rockland, Maine, EUA) e, após homogeneização, distribuído em moldes, para a formação de blocos. Após solidificação, os blocos de agarose foram colocados em 3,5 mL de solução de lise (Tris-HCl 6mM [pH 7,6], NaCl 1M, EDTA 100mM [pH 7,5], 0,5% de Brij 58,

0,5% de lauril sarcosinato de sódio, 1 mg/mL de lisozima e incubados por 15h-18h a 35°C-37°C, sob agitação suave. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução de lise foi substituída por 3,5 mL de solução ESP (EDTA 0,5 M [pH 9 a 9,5]), 1% de lauril sarcosinato de sódio, 0,1 mg de proteinase K/ml) e incubada em banho-maria a 50°C por 18h-24h.

Após essa incubação a solução ESP foi substituída por 3,5 ml de tampão TE (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5] e EDTA 0,1 mM) para iniciar a lavagem dos blocos sob agitação suave a 37°C. O procedimento de lavagem com TE foi realizado por seis vezes; as três primeiras lavagens foram feitas em um intervalo de 20 a 30 minutos cada; a quarta e a quinta com intervalos de 2 h cada e a última de 18-24 h. Após a última incubação, os blocos foram estocados em solução TE a 4°C, ou preparados para digestão enzimática, onde foi utilizada a enzima de restrição *Spe*, ~~RI4500~~ 0 Biochemicals; Indianapolis, Indiana, EUA).

A seguir, os blocos foram incubados durante 2 horas a 37°C numa solução contendo 200µL de tampão para a enzima de restrição (20µL de tampão + 180µl de água Milli Q estéril). A solução de tampão foi removida e substituída por nova solução ainda sem a enzima e novamente os blocos foram incubados sob as mesmas condições. Após esse período, estes foram submetidos ao tratamento com solução contendo a enzima (15U) por 16h-18h a 37°C.

Após esse período, os blocos foram fundidos a 72°C e aplicados nos reservatórios do gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, EDTA 0,025 M e ácido bórico 0,89M). Foram incluídos padrões de pesos moleculares (Pulse Marker, 50-1000 Kb; Sigma).

Os fragmentos foram separados através de eletroforese realizada no sistema de eletroforese em campo pulsado CHEF DR III SYSTEM (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA), utilizando tempo de pulsos crescentes de 5 a 35 segundos, por 24h, a 6V/cm, num ângulo de 120° e na temperatura de 11°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 30 minutos e descorados com água destilada, durante 2 h, observados sob luz U.V e finalmente fotografados.

Foi efetuada a inspeção visual dos perfis de fragmentação obtidos. O critério utilizado para a interpretação foi o proposto por Tenover e colaboradores (1995), de forma que as amostras cujos perfis de restrição diferiram entre si em até 6 bandas foram consideradas geneticamente relacionadas ficando assim incluídas no mesmo clone.

A análise computadorizada dos padrões foi executada com o auxílio do SURJUDPD 01ROHFXODU \$DOVW )LQJHUSULQWLQJ3OXV´9HUVRADYLOs percentuais de similaridade dos perfis foram estimados pelo coeficiente de Dice (Dice, 1945). Foram gerados dendrogramas utilizando o método UPGMA 8QZHLWJKWHG3DLUURXS0HWKRGXVLQJ\$ILWKPHWLF\$HUDJHV´

#### **4.5 – Testes estatísticos**

Foi utilizado o teste de Qui-Quadrado com auxílio do programa Epi Info (versão 3.3, outubro 2004) para comparar a frequência de resistência aos antimicrobianos em amostras isoladas nos diferentes hospitais. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



## 5- Resultados

### 5.1 - Amostras bacterianas: fonte de isolamento e identificação fenotípica

A Tabela 1 mostra a distribuição das 162 amostras de *P. aeruginosa* avaliadas. Mais da metade das amostras foi isolada de secreções (52,5%) [a maioria proveniente do trato respiratório inferior (n=53)] e de urina (22,8%) e, em menor proporção de sangue (8,6%), ponta cateter (6,2%), líquidos de punção (1,9%) e de outros espécimens variados (8,0%). A maior parte das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de secreções foram provenientes do HSC e do HUAP.

A Tabela 2 mostra a distribuição das 162 amostras de *P. aeruginosa* isoladas, de acordo com os setores de atendimento dos pacientes nos diferentes hospitais avaliados. Como pode ser observado, a maioria das amostras foi proveniente de pacientes internados nas enfermarias (51,2%) com uma taxa de distribuição semelhante entre os hospitais HSC, CSMSM e HUAP. As amostras isoladas de pacientes atendidos nos setores de risco ocuparam o segundo lugar em ordem de freqüente (28,4%); o hospital HAL foi o que contribui para o maior número dessas amostras (22/46; 47,8%).

### 5.2 - Identificação da espécie *P. aeruginosa*

Os resultados dos laboratórios de origem foram confirmados pelos testes de identificação fenotípica de *P. aeruginosa*. Todas as amostras analisadas

foram oxidase positivas, oxidaram mais não fermentaram a glicose, descarboxilaram a arginina, cresceram a 42°C, a maioria das amostras produziu colônias com pigmento verde-azulado metálico, enquanto que um número pequeno produziu pigmento marrom.

### **5.3 - Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

A Tabela 3 mostra a frequência de resistência aos 11 antimicrobianos testados. As maiores taxas de resistência foram verificadas frente a cefotaxima (69,1%), ceftriaxona (65,4%), ciprofloxacina (54,9%), ticarcilina-ácido clavulânico (50,6%) e gentamicina (51,9%). A frequência de resistência foi menor frente a imipenem (35,8%), amicacina (32,1%), cefepima (33,3%) e ceftazidima (30,9%). É importante destacar a relativamente baixa resistência apresentada pelas amostras testadas frente ao aztreonam (27,8%) e a piperacilina-tazobactam (27,8%).

De um modo geral, não foram detectadas diferenças significativas entre os hospitais, quando comparadas as frequências de resistência dos diferentes antimicrobianos testados, exceto para imipenem e amicacina em relação ao HUAP onde as taxas de resistência foram significativamente menores quando comparadas com as detectadas nos outros hospitais.

Todas as amostras avaliadas foram sensíveis a Polimixina B.

#### **5.4 – Detecção da produção de metalo- $\beta$ -lactamases**

Das 162 amostras avaliadas neste estudo, 9 (5,5%) foram produtoras de M- $\beta$ la. A Tabela 4 mostra as características dessas amostras. A Figura 1 ilustra um resultado positivo conforme observado no teste empregado para detecção de M- $\beta$ la. Das nove amostras produtoras de M- $\beta$ la, oito foram isoladas durante os meses de novembro e dezembro de 2002 nos hospitais HAL (n=4) e HSC (n=4); a última amostra detectada foi isolada na CSMSM em fevereiro de 2003. Todas as amostras foram provenientes de pacientes internados e as fontes de isolamento principais foram urina e trato respiratório inferior.

#### **5.5 – Perfis de resistência aos antimicrobianos das amostras de *P. aeruginosa*, de acordo com os resultados dos testes de difusão.**

As amostras analisadas foram agrupadas de acordo com os diferentes graus de multirresistência apresentados, em quatro perfis (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

Perfil I  $\pm$  Neste grupo foram alocadas as amostras com maior sensibilidade (47/162, 29,0%) apresentando resistência principalmente a cefotaxima (13 amostras) e ceftriaxona (12 amostras).

Perfil II  $\pm$  Neste grupo foram incluídas 49 amostras (30,2%) que, além de apresentarem um aumento da resistência aos antimicrobianos em geral, se caracterizaram, em sua maioria, pela resistência a ceftazidima, imipenem, piperacilina-tazobactam e, principalmente, a ticarcilina-ácido clavulânico.

Perfil III ± Neste grupo foram incluídas 57 amostras (35,2%), que apresentaram resistência praticamente a todos os antimicrobianos, exceto à polimixina; neste perfil é notável a detecção de elevada frequência de sensibilidade intermediária ao aztreonam.

Perfil IV ± Neste grupo foram incluídas as 9 amostras produtoras de carbapenase (9/162; 5,6%). Todas as amostras apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, exceto frente a polimixina B; duas amostras foram sensíveis à associação piperacilina-tazobactam e oito amostras apresentaram sensibilidade intermediária ao aztreonam.

As amostras se distribuíram em números semelhantes nos perfis I, II e III (47,49 e 57 amostras, respectivamente). Não se verificaram diferenças significativas na distribuição dos três perfis entre os quatro hospitais avaliados (Tabela 5), nem quando foram considerados os diferentes setores de atendimento dos pacientes (Gráfico 5).

## **5.6 - Comparação da susceptibilidade frente ao imipenem e meropenem**

Foi analisada a susceptibilidade de 89 amostras, escolhidas aleatoriamente, frente ao meropenem. A Tabela 6 mostra comparativamente os resultados dos testes de susceptibilidade frente ao imipenem e ao meropenem. Na maioria das amostras (73/89; 82%), os resultados foram concordantes, sendo 23 amostras resistentes a ambos carbapenems e 50 amostras

apresentando sensibilidade ou sensibilidade intermediária a ambos. Das 16 amostras (18%) que apresentaram resultados discrepantes, 14 foram resistentes ao imipenem e sensíveis ao meropenem e as outras duas foram sensíveis ao imipenem e resistentes ao meropenem.

### **5.7- Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

Foi avaliada a diversidade genética de 19 amostras de *P. aeruginosa* sendo 5 do Perfil I, 3 do Perfil II, 2 do Perfil III e as 9 amostras produtoras de M-ODGR3HUILO,9SDUDILQVFRPSDUDWLYRVIRLWDPEpPDQDOLVDGDXPDDPRVWUD isolada em São Paulo produtora de M-βla.

Os perfis de PFGE das amostras produtoras de M-βla assim como o da amostra de São Paulo são apresentados na Figura 2. Os perfis de PFGE encontrados entre amostras dos Perfis de resistência I, II e III são apresentados na Figura 3.

Os perfis de PFGE das amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M-βla foram incluídos em um único grupo clonal denominado de grupo clonal A. Este grupo incluiu 3 variantes. A variante A<sub>1</sub>, composta por 4 amostras com perfis eletroforéticos indistingüíveis entre si, foi utilizada como padrão para comparar os outros perfis; esta variante foi composta por 3 amostras isoladas no HAL e 1 amostra isolada no HSC. As 5 amostras (4 do HSC e 1 da CSMSM) distribuídas entre as variantes A<sub>2</sub> (3 amostras) e A<sub>3</sub> (2 amostras) apresentaram

perfis estreitamente relacionados com A<sub>1</sub> (diferenças de até 3 bandas). A amostra proveniente de São Paulo ficou incluída na variante A<sub>3</sub>. No dendrograma correspondente pode ser evidenciada a similaridade genética entre essas amostras.

As amostras de *P. aeruginosa*, pertencentes aos perfis de resistência I, II e III, não produtoras de M-βla mostraram perfis de restrição com grande variabilidade genética (Figura 3). No dendrograma correspondente pode ser evidenciada a diversidade genética entre essas amostras.

































## 6 – Discussão

*P. aeruginosa* é a bactéria gram-negativa mais relevante como causa de infecções hospitalares, apresentando, freqüentemente multirresistência a uma grande variedade de agentes antimicrobianos (Kiska & Gillian, 2003). Os carbapenems são muito utilizados para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, já que resistem à ação da maioria das  $\beta$ -lactamases. Entretanto, o surgimento de amostras de *P. aeruginosa* resistentes em decorrência da produção de carbapenemases, é causa de grande preocupação, sendo que tais amostras têm sido detectadas em várias localizações geográficas, inclusive no Brasil (Pelegriño *et al.*, 2001; Gales *et al.*, 2003). Desta forma torna-se de fundamental importância o conhecimento e aplicação de metodologias que possam auxiliar no diagnóstico e monitoramento deste perfil de resistência.

A maioria das amostras de *P. aeruginosa* estudadas foi recuperada de espécimes do trato respiratório inferior (32,7%) e de urina (22,8%). De um modo geral, estas são as fontes de isolamento mais freqüentes, como verificado pelos estudos de Freitas e Barth (2005), analisando amostras isoladas de pacientes atendidos em hospitais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e por Santos Filho e colaboradores (2002), com amostras de origem comunitária e hospitalar isoladas em laboratórios clínicos da cidade de João Pessoa, na Paraíba.

Todas as amostras isoladas foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos utilizando o teste de difusão em agar. Entre os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o aztreonam e a piperacilina associada ao tazobactam foram os que apresentaram as menores taxas de resistência (27,8% para ambos), significativamente inferiores às encontradas por Pellegrino (2001) entre amostras isoladas na cidade de Rio de Janeiro (49,5% e 43,0%, respectivamente). As taxas de resistência a ceftazidima e cefepima foram semelhantes (31,9% e 33,3%, respectivamente), sendo inferiores às encontradas por Pellegrino (2001) (40,0% e 50,0%, respectivamente) e aos dados do SENTRY para o Brasil (50,0% para ambos); entretanto, foram superiores às encontradas por Santos e colaboradores (2002) na Paraíba (15,0% e 20,0%, respectivamente) e Freitas e Barth (2005) em Porto Alegre (12,5% e 20%, respectivamente). Em relação ao imipenem, a taxa de resistência encontrada neste estudo (35,8%) foi semelhante à detectada por Pellegrino (2001) (40,0%) e pelo SENTRY para o Brasil (49,0%), porém superior às encontradas por Santos e colaboradores (2002) (19,7%) e Freitas e Barth (2005) (16%). Para ticarcilina-ácido clavulânico, a taxa de resistência detectada neste trabalho (50,6%) foi semelhante à detectada por Pellegrino (2001) (61,0%) e pelo SENTRY para o Brasil (57,0%), mas superior à encontrada entre as amostras de João Pessoa (28,0%) por Santos e colaboradores (2002).

Das 162 amostras avaliadas neste trabalho, apenas uma foi resistente a todos os antimicrobianos testados, com exceção da polimixina B; esta amostra, isolada a partir da urina de um paciente internado no HSC, demonstrou ser produtora de M-OD (VWHUHVXOWDGR p GLIHUHQWH GR YHULILFDGR SRU 3HOOHJULQ) colaboradores (2002) em amostras isoladas de hospitais da cidade do Rio de Janeiro, onde registrou sensibilidade, apenas à polimixina B, em mais da metade das amostras avaliadas.

Como já foi comentado, ceftazidima e cefepima apresentaram taxas de resistência semelhantes, com concomitância em 40 das amostras; este fato pode ser justificado, entre outros mecanismos, pela produção de ESBL da classe A de Ambler (Aubert *et al.*, 2001). Em 14 amostras foi verificada sensibilidade à ceftazidima e resistência à cefepima, fato talvez explicado pela produção de enzimas do grupo OXA que hidrolisam mais efetivamente cefepima que ceftazidima (Aubert *et al.*, 2001). A resistência à ceftazidima com sensibilidade à cefepima foi observada em 10 amostras; ao menos em parte, isto pode ser atribuído à produção de AmpC cuja ação é mais efetiva sobre a ceftazidima (Livermore, 1995). Estas discrepâncias mostram que os resultados de resistência ou sensibilidade eQFRQWUDGRV 1Q YLWUR´ SDUD XPD GHVWDV cefalosporinas não podem ser extrapolados para a outra, sendo, portanto, necessário avaliar a susceptibilidade de ambos antimicrobianos.

A resistência concomitante a imipenem e meropenem foi detectada em 23% da 89 amostras testadas, provavelmente em decorrência de três

mecanismos: a perda da porina OprD associada à superexpressão de MexA-MexB-OprM; superexpressão de MexE-MexF-OprN e à produção de M-βla (Köhler *et al.*, 1999; Maseda *et al.*, 2000 ; Livermore 2001). Em relação aos resultados discrepantes, 14 amostras foram resistentes ao imipenem, porém sensíveis ao meropenem. Isto pode ser o resultado de uma modificação no canal da porina OprD que favorece a passagem do meropenem mas não do imipenem (Epp *et al.*, 2001); outro mecanismo poderia ser a diminuição da expressão da OprD somada a uma produção exacerbada de AmpC; neste caso, é sabido que ambos carbapenems penetram em quantidade insuficiente, mas que, como o imipenem é mais efetivamente hidrolizado por AmpC do que o meropenem, sua menor concentração permite uma ação mais efetiva da enzima (Sader *et al.*, 2005). Já a divergência oposta (sensibilidade ao imipenem com resistência ao meropenem), foi constatada em 2 amostras e pode ser justificada pelo aumento na expressão do sistema de efluxo MexA-MexB-OprM que confere resistência ao meropenem mas que não tem efeito sobre o imipenem, (Köhler *et al.*, 1999). Estes resultados enfatizam a necessidade de se testar ambos antibióticos, como apontado por Gales e colaboradores (2002).

(PUHODomRjVDVVRFLDojHVGHDDFWkPLFRVFRPLQLELGRUjHVGHase, nossos resultados foram semelhantes aos relatados por outros autores (Fass & Prior, 1989; Kuck *et al.*, 1989; Sader *et al.*, 2000), mostrando taxas de sensibilidade significativamente mais elevadas para piperacilina-tazobactam quando comparadas com as obtidas para ticarcilina-ácido clavulânico. Estas



diferenças podem ser explicadas pela maior eficácia do tazobactam para inibir as  $\beta$ -lactamases de gram-negativos em relação ao ácido clavulânico.

De um modo geral, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem e piperacilina-tazobactam, bastante utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, continuam sendo boas opções terapêuticas

A enzima mais comumente associada à resistência aos aminoglicosídeos é a acetil transferase 6' [AAC(6')], que confere resistência a tobramicina, netilmicina, kanamicina e amicacina (se é expressa a subfamília I) ou gentamicina (em caso de expressão da subfamília II) (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). No nosso estudo, a resistência concomitante a amicacina e gentamicina foi verificada em 50 amostras. Este resultado pode ser devido, entre outros fatores, a uma produção das duas subfamílias I e II das AAC(6'), assim como à impermeabilidade da membrana. As 34 amostras sensíveis à amicacina e resistentes à gentamicina, são provavelmente produtoras de AAC(6') subfamília II, ao passo que as 2 amostras resistentes à amicacina e sensíveis à gentamicina, provavelmente produzem AAC(6') subfamília I (Poole 2005).

O agrupamento das amostras de *P. aeruginosa* de acordo com diferentes graus de multirresistência, facilitou a comparação dos resultados dos hospitais avaliados, assim como a associação de determinados perfis de resistência com certos setores de atendimento aos pacientes; por outro lado,

nos permitiu especular sobre a presença, associada ou não, de diferentes mecanismos de resistência expressos fenotipicamente.

No Perfil I incluímos as amostras mais sensíveis, que não produziram exacerbadamente  $\beta$ -lactamase AmpC. Excetuando as amostras resistentes a cefotaxima e ceftriaxona, é provável que estas amostras apresentem um número suficiente de porinas além de não expressarem sistemas de efluxo ou enzimas capazes de hidrolisar antimicrobianos. Este perfil foi claramente representado por amostras comunitárias ou hospitalares não submetidas à pressão seletiva de antimicrobianos.

O Perfil II, embora composto por amostras mais resistentes que o anterior, incluiu um número significativo de amostras ainda sensíveis a cefepima e ceftazidima, evidenciando, como característica, a não produção ESBL da classe A; por outro lado, o aumento da taxa de resistência a cefotaxima, ceftriaxona, aztreonam e imipenem, assim como à ciprofloxacina, poderia ser explicado pela combinação de pelo menos dois mecanismos: a alteração da permeabilidade da membrana e o aumento da ação de sistemas de efluxo. De um modo geral poderia-se cogitar que este grupo foi selecionado pela utilização indiscriminada de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração não anti-pseudomônicas e pelo início da utilização mais intensa de carbapenems e monobactâmicos.

Diferentemente, no Perfil III, as altas taxas de resistência, sobretudo a ceftazidima e cefepima, sugerem tratar-se de amostras caracterizadas pela produção das ESBLs da classe A de Ambler. As altas taxas de resistência à associação de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores, comparativamente com o Perfil II, poderiam ser explicadas pela superexpressão de AmpC em conjunto com a produção de ESBLs. A resistência a imipenem e ciprofloxacina pode estar associada à presença do sistema de efluxo MexE-MexF-OprN. Já a resistência ao aztreonam, além da hidrólise promovida pelas enzimas anteriormente citadas, pode ser atribuída a uma superexpressão do sistema de efluxo MexA-MexB-OprM, que também contribuiria para a expulsão de cefalosporinas e inibidores de  $\beta$ -lactamase.

As amostras incluídas no Perfil IV foram as produtoras de M- $\beta$ la, resistentes portanto, a imipenem e meropenem. Considerando que as carbapenases não hidrolizam o aztreonam, a sensibilidade intermediária apresentada pelas amostras pode ser justificada pela ação de outros mecanismos de resistência associados.

A frequência de 5,6% na produção de M- $\beta$ la detectada neste estudo é inferior às encontradas por Torres e colaboradores em Fortaleza (2003) de 9,4%, e Pellegrino e colaboradores (2002) em amostras isoladas em hospitais do Rio de Janeiro (18,5%), por Lee e colaboradores. (2003) na Coreia (11,4%) e por Lagatolla e colaboradores (2004) na Itália (20%); entretanto, é superior à frequência encontrada por Santos Filho e colaboradores (2002) em João

Pessoa (2%). É importante destacar que todas as amostras produtoras de M-βla foram isoladas em um período curto, de novembro de 2002 a fevereiro de 2003, em três dos quatro hospitais avaliados, indicando provavelmente um evento de caráter pontual, sendo necessário prosseguir com novas avaliações para confirmar ou não uma tendência à disseminação de amostras com tal característica.

A análise de perfis do DNA cromossômico através de PFGE, de comprovada eficácia na genotipagem de vários microrganismos, inclusive *P. aeruginosa*, vem sendo muito utilizada para estudos epidemiológicos e caracterização de surtos infecciosos hospitalares (Tenover *et al.*, 1995; Bergmans *et al.*, 1997).

No presente trabalho foi analisado, através desta metodologia, um total de 19 amostras. As 9 amostras produtoras de M-βla revelaram pertencer a um único grupo clonal, denominado de A. Este grupo clonal foi o mesmo encontrado por Pellegrino e colaboradores (2002), entre amostras isoladas no Rio de Janeiro e por Gales e colaboradores (2003), entre as amostras isoladas em São Paulo. Este resultado evidencia a importância epidemiológica da disseminação intra-hospitalar e interhospitalar destas amostras tanto no âmbito local como regional e sugere a presença de alguma característica de virulência peculiar, que lhes permite predominar e torna-las reservatórios potenciais de outros genes de resistência.

As 10 amostras restantes, distribuídas entre os outros três perfis de resistência, mostraram uma grande diversidade genética, refletindo . Embora o número de amostras analisadas tenha sido pequeno, a grande variabilidade genética detectada poderia ser explicada pela significativa pressão seletiva dos diferentes regimes antimicrobianos utilizados em cada um dos hospitais estudados.

## 7 – Conclusões

- De um modo geral, as amostras de *P. aeruginosa* avaliadas neste trabalho, apresentaram taxas de resistência inferiores quando comparadas com as relatadas na literatura para amostras isoladas no município de Rio de Janeiro. Somente uma amostra foi sensível apenas à polimixina.
- O isolamento de amostras com elevados graus de multirresistência isoladas de pacientes ambulatoriais enfatiza a possibilidade de ocorrer falha na terapêutica empírica, reforçando a necessidade do monitoramento laboratorial da resistência aos antimicrobianos.
- O agrupamento das amostras em perfis de resistência característicos, como efetuado neste trabalho, mesmo com as limitações próprias de um critério apenas fenotípico, pode ser útil para avaliar, de maneira prática, o grau de pressão antimicrobiana seletiva exercida num determinado hospital ou em setores do mesmo, a eficácia das medidas de controle da transmissão cruzada de microrganismos e a eleição de antibioticoterapia empírica nos casos em que a mesma é inevitável. Pode também constituir-se num parâmetro para comparar a multirresistência de *P. aeruginosa* entre diferentes setores, hospitais e regiões.
- Trata-se do primeiro relato de detecção de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M-β1a na cidade de Niterói.
- A verificação da elevada similaridade genética entre as amostras M-β1a positivas isoladas no Rio de Janeiro, São Paulo e Niterói, confirma a disseminação interhospitalar de um único grupo clonal de amostras

apresentando tal característica nas instituições brasileiras analisadas até o momento.

- Finalmente, estes resultados reforçam a necessidade do monitoramento contínuo das características de resistência deste importante patógeno hospitalar, de efetuar um uso racional dos antimicrobianos, assim como da constante implementação de barreiras para minimizar a transmissão intra e inter-hospitalar.

## 8 - Bibliografia

- AENDEKERK S, GHYSELS B, CORNELIS P & BAYSSE C. 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**. 148: 2371-2381.
- ANDRADE S S, JONES R N, GALES A C & SADER H S. 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J. Antimicrob. Chemother.** 52: 140-140.
- ARAKAWA Y, SHIBATA N, SHIBAYAMA K, KUROKAWA H, YAGI T, FUJIWARA H & GOTO M. 2000. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J. Clin. Microbiol.** 38: 40-43.
- AUBERT D, POIREL L, ALI A B, GOLDSTEIN F W & NORDMANN P. 2001. OXA-35 is an OXA-10-related beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother.** 48: 717-721.
- BELKUM Van A , STRUELENS M, VISSER de A, VERBRUGH H & TIBAYRENC M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, & microbial epidemiology. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 547-560.
- BERGMANS D, BONTEN M, Van TIEL F, GAILLARD C, LONDON N, Van DER GEEST S, DE LEEUW P & STOBBERINGH E. 1997. Value of phenotyping methods as an initial screening of *Pseudomonas aeruginosa* in epidemiologic studies. **Infection.** 25: 350-354.
- BONE R C. 1993. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine **Clin. Microbiol. Rev.** 6: 57-68.
- CHUANCHUEN R, BEINLICH K, HOANG T T, BECHER, KARKHOFF-SCHWEIZER R R & SCHWEIZER H P. 2001. Cross-Resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45: 428-432.
- CHUANCHUEN R, NARASAKI C T & SCHWEIZER H P. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. **J. Bacteriol.** 184: 5036-5044.



- COLLIN B A, LEATHER H L, WINGARD J R & RAMPHAL R. 2001. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. **Clin Infect Dis.** 33: 947-953.
- DICE L R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology.** 26: 297-302.
- EPP S F, KÖHLER T, PLÉSIAT P, MICHÉA-HAMZEHPOUR M, FREY J, & PECHÈRE J. 2001. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45: 1780-1787.
- FASS R J & PRIOR R B. 1989. Comparative in vitro activities of piperacillin-tazobactam and ticarcillin-clavulanate. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 1268-1274.
- FREITAS A L P & BARTH A L. 2002. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **Braz. J. Infect. Dis.** 6: 01-06.
- GALES A C, MENDES R E, RODRIGUES J & SADER H S. 2002. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 38: 13-20.
- GALES A C, MENEZES L C, SILBERT S & SADER H S. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother.** 52: 699-702
- GALES A C, REIS A O & JONES R N. 2001. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **J. Clin. Microbiol.** 39: 183-190
- HANCOCK R E W & BELL, A. 1988. Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 7: 713-720
- HEAD N E & YU H. 2004. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. **Infect. Immun.** 72: 133-144.
- JO J T H, BRINKMAN F S L & HANCOCK R E W. 2003. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47: 1101-1111.

- KERSTERS K., LUDWIG W, VANCANNEYT M, DE VOS P, GILLIS M & SCHLEIFER K H. 1996. recent changes in the classification of the *pseudomonads*: an overview. **Syst. Appl. Microbiol.** 19: 465-477.
- KIEVIT T R, PARKINS M D, GILLIS R J, SRIKUMAR R, CERI H, POOLE K, IGLEWSKI B H & STOREY D G. 2001. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45: 1761-1770.
- KISKA, D L & GILLIAN, P H. *Pseudomonas*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. MURRAY P R, BARON E J, PFALLER M A, JORGENSEN J H & YOLKEN R H (eds), 8<sup>th</sup> ed. Manual of clinical microbiology. American Society for Clinical Microbiology, Washington DC.
- KÖHLER T, MICHEA-HAMZEHPOUR M, EPP S M & PECHERE J. 1999. Carbapenem Activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 424-427.
- KOHLER T, MICHEA-HAMZEHPOUR M, HENZE U, GOTOH N, CURTY L K & PECHERE J C. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol.** 23: 345-54.
- KONEMAN E W, ALLEN S D, JANDA W M, SCHRECKENBERGER P C. & WINN J R W C. 1997. Fifth edition. In: **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Lippincott. Philadelphia.
- KUCK N A, JACOBUS N V, PETERSEN P J, WEISS W J & TESTA R T. 1989. Comparative in vitro and in vivo activities of piperacillin combined with the beta-lactamase inhibitors tazobactam, clavulanic acid, and sulbactam. **Antimicrob Agents Chemother.** 33: 1964-1969.
- LAGATOLLA C, TONIN E A, MONTI-BRAGADIN C, DOLZANI L, GOMBAC F, BEARZ, C, EDALUCCI E, GIONECHETTI F, & ROSSOLINI G M. 2004. endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in european hospital. **Emerg. Infect. Dis.** 10: 535-538.
- LEE K, LEE W G, UH Y, HA G Y, CHONG. J C Y, & THE KOREAN NATIONWIDE SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GROUP. 2003. VIM and IMP-Type Metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas spp.* And *Acinetobacter spp.* In Korean Hospitals. **Emerg. Infect. Dis.** 9: 868-871.

- LI X Z, ZHANG L, SRIKUMAR R & POOLE K. 1998.  $\beta$ -Lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 399±403
- LI X Z , LIVERMORE D M & NIKAIDO H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38: 1732-1741.
- LI, X., NIKAIDO H & POOLE K. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 39: 1948±1953.
- LIVERMORE D M. 1992. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 2046±2048.
- LIVERMORE D M. 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance **Clin. Microbiol.** 8: 557-584.
- LIVERMORE D M. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J. Antimicrob. Chemother.** 47: 247-250.
- LIVERMORE D M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis.** 34: 634-340.
- LLANES C, HOCQUET D, VOGNE C, BENALI-BAITICH D, NEUWIRTH C & PLÉSIAT P. 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 1797-1802.
- LOMOVSKAYA O, LEE A, HISHINO K, ISHIDA H, MISTRY A, WARREN M S, BOYER E, CHAMBERLAND S & LEE V J. 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 1340±1346.
- LUZZARO F, MANTENGOLI E, PERILLI M, LOMBARDI G, ORLANDI V, ORSATTI A, AMICOSANTE G, ROSSOLINI G M & TONIOLO A. 2001. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. **J. Clin. Microbiol.** 39: 1865-1870.
- MANSILA, E C & GARROTE F G. 1998. Mecanismos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*. **Ver Clin Esp.** 198 (monograf 2): 10-16.

- MASEDA H, YONEYAMA H & NAKAE T. 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 44: 658-664.
- MASUDA N, SAKAGAWA E, OHYA S, GOTOH N, TSUJIMOTO H & TAKESHI NISHINO. 2000. substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 3322-3327.
- MASUDA N, SAKAGAWA E, OHYA S, GOTOH N, TSUJIMOTO T & NISHINO T. 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 2242±2246.
- MAYHALL C G. 1997. Nosocomial pneumonia: diagnosis and prevention. **Infect. Dis. North Am.** 11: 427-457.
- MINE T, MORITA Y, KATAOKA A, MIZUSHIMA T & TSUCHIYA T. 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 415-417.
- MINGEOT-LECLERCQ M-P, GLUPCZYNSKI Y & TULKENS P M. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 727-737.
- MOSKOWITZ S M, ERNST R K & MILLER S I. 2004. PmrAB, a Two-Component Regulatory System of *Pseudomonas aeruginosa* that Modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to Lipid A. **J. Bacteriol.** 186: 575-579.
- MUGNIER P, DUBROUS P, CASIN I, ARLET G & COLLATZ E. 1996. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 40: 2488-2493.
- MURATA T, GOTOH N & NISHINO T. 2002. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. **FEMS Microbiol Lett.** 217: 57-63.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS 2000a. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7<sup>th</sup> ed approved Standard M2-A7. **NCCLS**, Wayne, Pa.
- NIKAIDO H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. **J. Bacteriol.** 178: 5853±5859.
- NIKAIDO H. 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67: 593-656.

- NOBLE C G, BARNARD F M & MAXWELL A. 2003. Quinolone-DNA interaction: sequence-dependent binding to single-stranded DNA reflects the interaction within the gyrase-DNA complex. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47: 854-62
- NORDMANN P & GUIBERT M. 1998. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother.** 42: 128-131.
- NORDMANN P, RONCO E, NAAS T, DUPORT C, MICHEL-BRIAND Y & LABIA R. 1993. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37: 962-699.
- OKAMOTO K, GOTOH N, & NISHINO T. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45: 1964-1971
- OLIVE D M & BEAN P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **J. Clin. Microbiol.** 37: 1661-1669.
- PALLERONI N J, KUNISAWA R, CONTOPOULOU R & DOUDOROFF M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 23: 333±339.
- PELLEGRINO F L. 2001. Resistência a antimicrobianos e diversidade genômica em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em hospitais do Rio de Janeiro (Dissertação - mestrado em microbiologia). **Instituto de microbiologia professor Paulo de Góes, UFRJ.**
- PELLEGRINO F L, TEIXEIRA L M, CARVALHO M G S, NOUE´R S A, OLIVEIRA M P , SAMPAIO J L M, FREITAS A D, FERREIRA A L P, AMORIM E L T, RILEY L W & MOREIRA B M. 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 40: 2420±2424.
- POIREL L, MAGALHAES M, LOPES M & NORDMANN P. 2004. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 48: 1406-1409.
- POLLACK M. 1995. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J. & Dolin, R. (eds). Principles and practice of infections diseases. Churchill Livingstone, New York.
- POOLE K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 49: 479-487.

- POOLE K, KREBES K, MCNALLY C & NESHAT S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon J. **Bacteriol.** 175: 7363-7372.
- POOLE, K, TETRO K, ZHAO Q, NESHAT S, HEINRICHS DE, & BIANCO N. 1996. Expression of the multi-drug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40: 2021±2028.
- POOLE, K., GOTOH N, TSUJIMOTO H, ZHAO Q, WADA A, YAMAGASHI T, NESHAT S, YAMAGASHI J, LI X Z & NISHINO T. 1996. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** 21: 713±724.
- SADER H S, CASTANHEIRA M, MENDES R E, TOLEMAN M, WALSH T R & JONES R N. 2005. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Antimicrob Agents.** 25: 57-61.
- SADER H S, REIS A O, SILBERT S & GALES A C. 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect.** 11: 73-6
- SAIMAN L & SIEGEL J. 2004. Infection control in cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev.** 2004 17: 57-71.
- SANTOS FILHO L , SANTOS I B & ASSIS A M L. 2002. Determinação da produção de metalo- -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 38: 291-296.
- SAWA T, OHARA M, KURAHASHI K, TWINING S S, FRANK D W, DOROQUES D B, LONG T, GROPPER M A & WIENER-KRONISH J P. 1998. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections Infect. **Immun.** 66: 3242-3249.
- STANIER R Y, PALLERONI N J & DOUDOROFF M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **J Gen Microbiol.** 43: 159±271.
- SZETO C C, CHOW K M, LEUNG C B, WONG T Y, WU A K, WANG A Y, LUI S F & LI PK. 2001. Clinical course of peritonitis due to *Pseudomonas* species complicating peritoneal dialysis: a review of 104 cases. **Kidney Int.** 59: 2309-2315.
- TEIXEIRA L M, CARVALHO M G, MERQUIOR V L, STEIGERWALT A G, BRENNER D J & FACKLAM R R. 1997. Phenotypic and genotypic

characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. **J Clin Microbiol.** 35: 2778-2781.

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

TENOVER F C, ARBEIT R D & GOERING R V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 18 : 426-39.

TORRES, J C N, ÂNGELO M R F, SALVIANO M N C, OLIVEIRA I R N, XAVIER, D L, SANTOS FILHO L & MENEZES, E A. 2003. Cepas de *Pseudomonas* sp. produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia.**

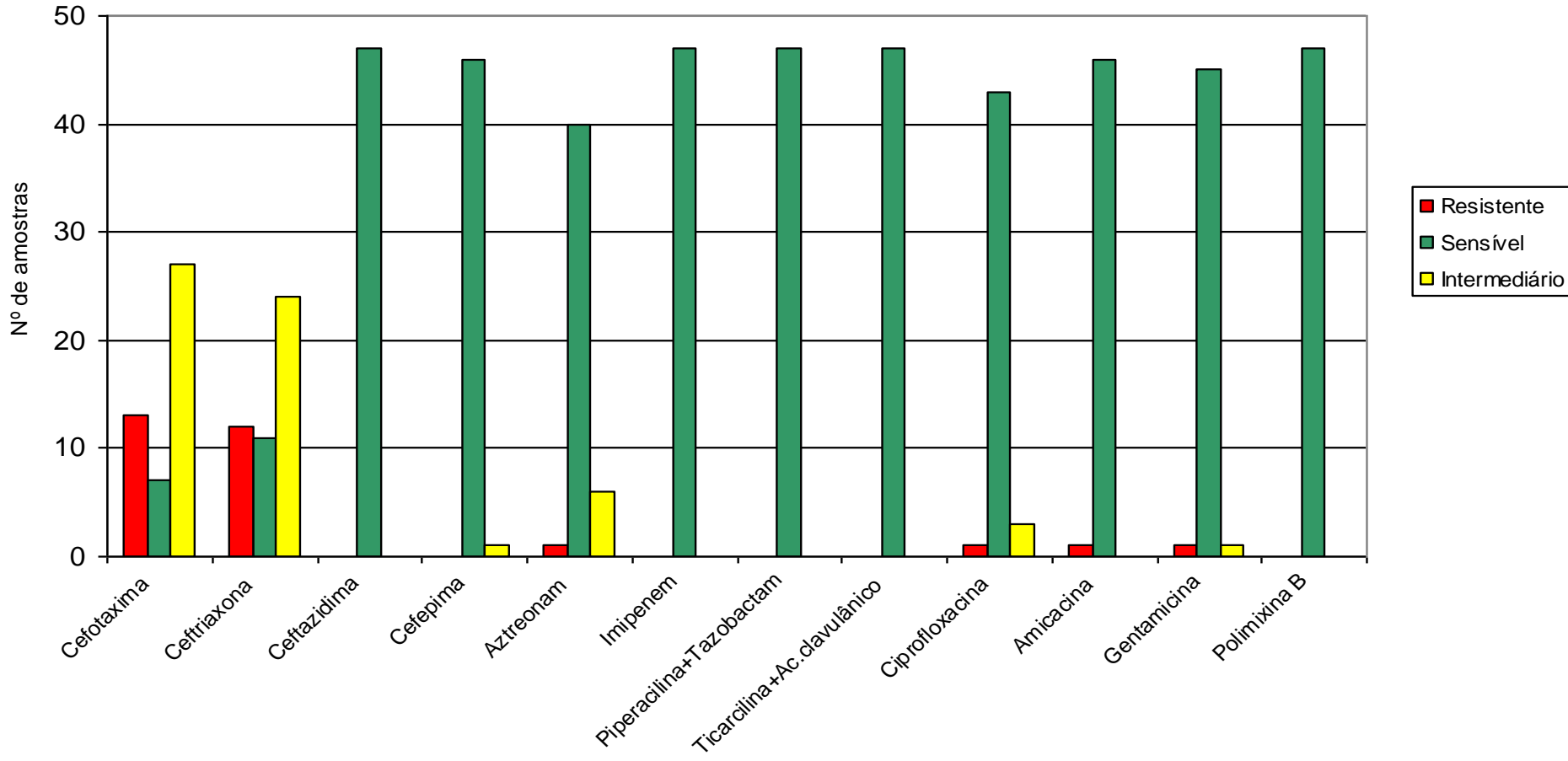
TRIAS J., & H NIKAIDO. 1990. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 34: 52± 57.

VAHABOGLU H, OZTURK R, AYGUN G, COSKUNKAN F, YAMAN A, KAYGUSUZ A, LEBLEBICIOGLU H, BALIK I, AYDIN K & OTKUN M. 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother.** 41: 2265-9. Erratum in: **Antimicrob Agents Chemother** 42: 484

VASIL M L. 1986. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **J Pediatr.** 108: 800-805.

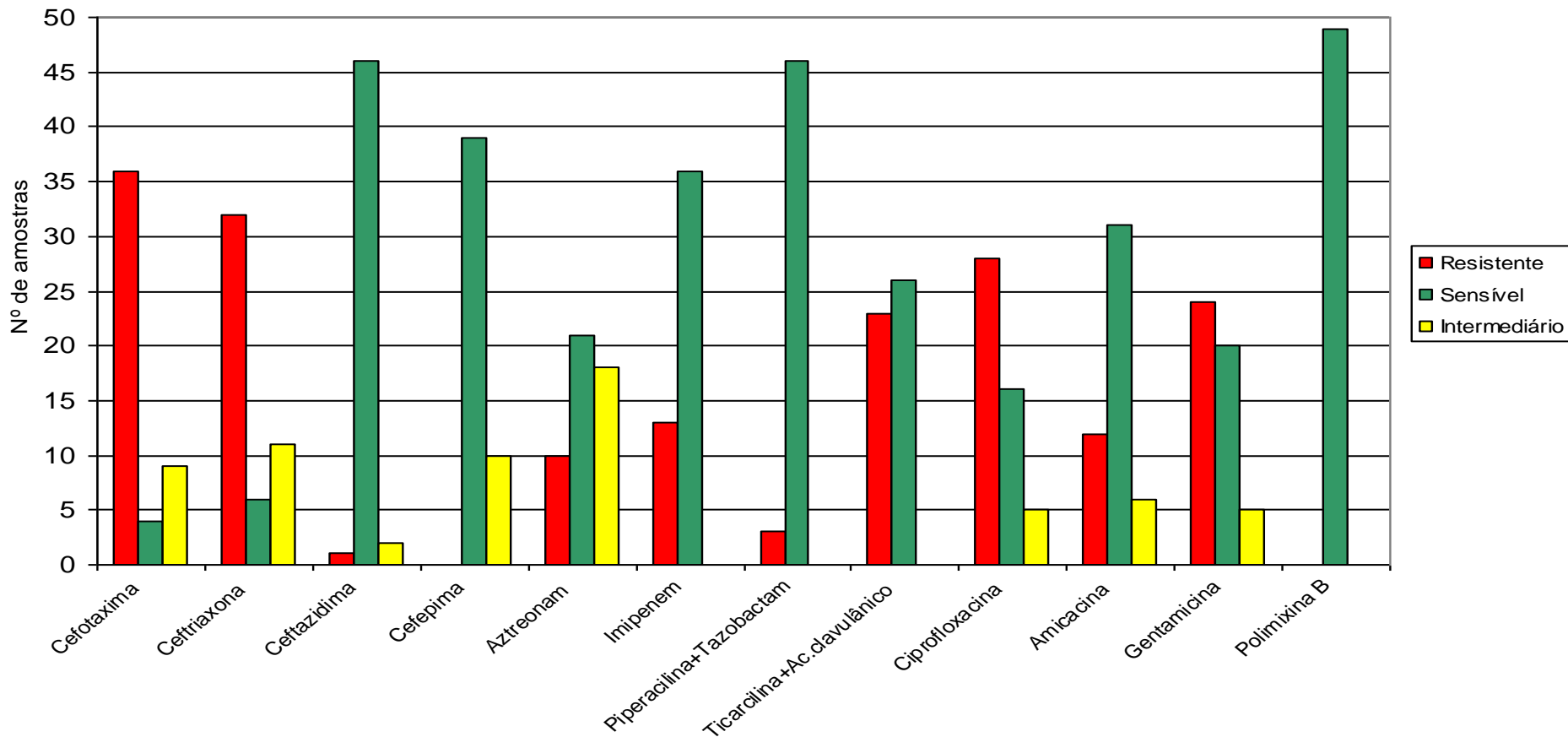
YAMANO Y, T NISHIKAWA & Y KOMATSU. 1990. Outer membrane proteins responsible for the penetration of beta-lactams and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother.** 26: 175±184.

**Gráfico 1: Perfil I de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com os resultados do teste de difusão**

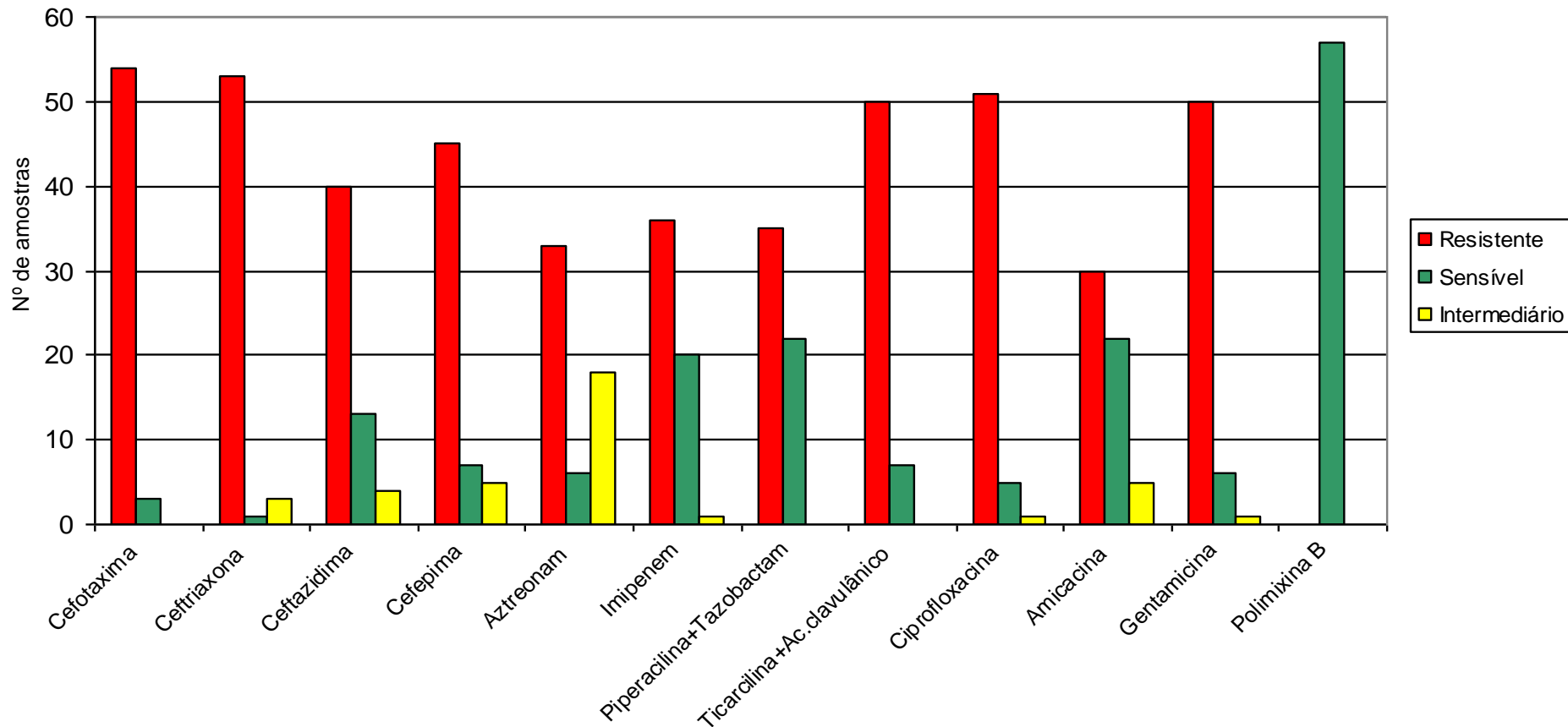




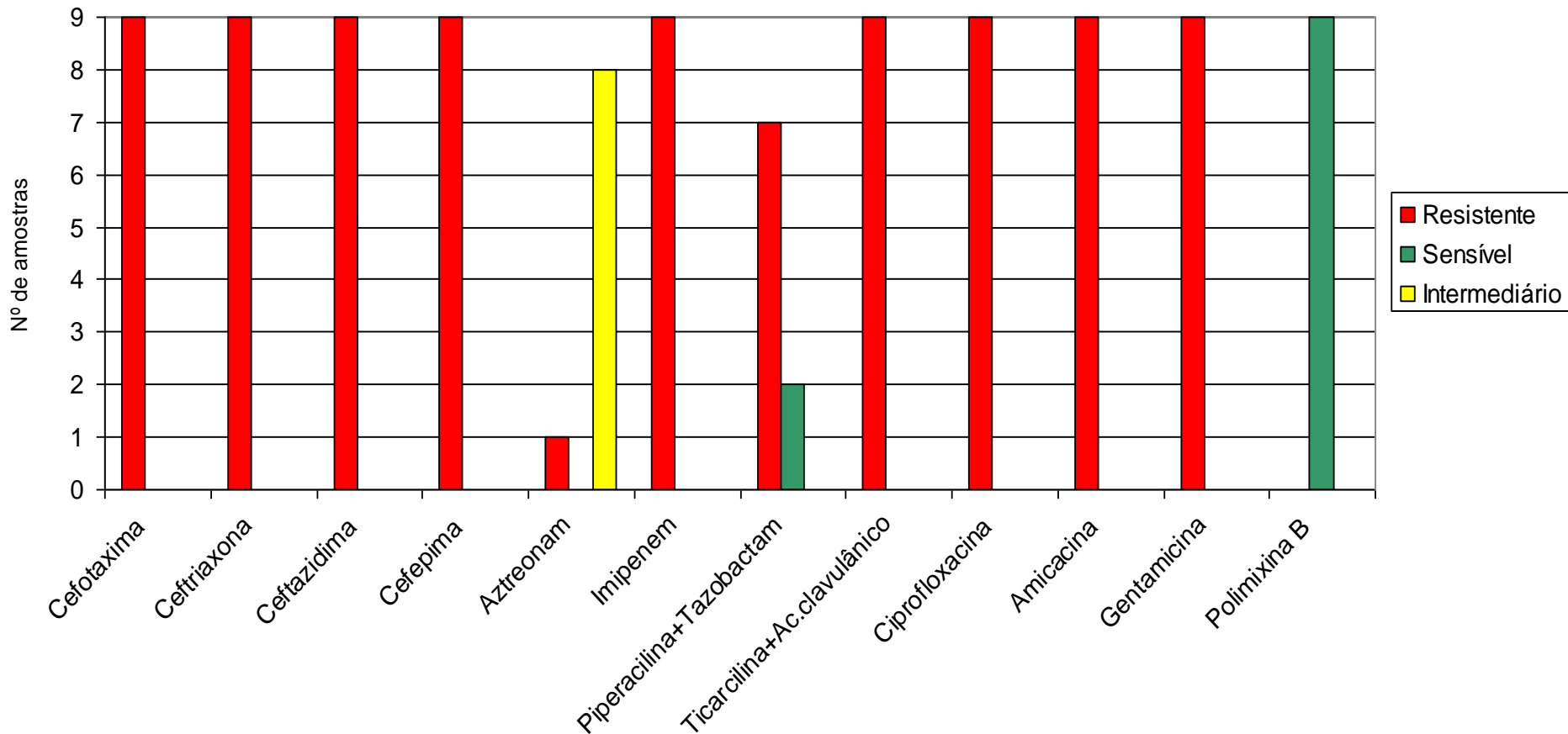
**Gráfico 2: Perfil II de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com os resultados do teste de difusão**



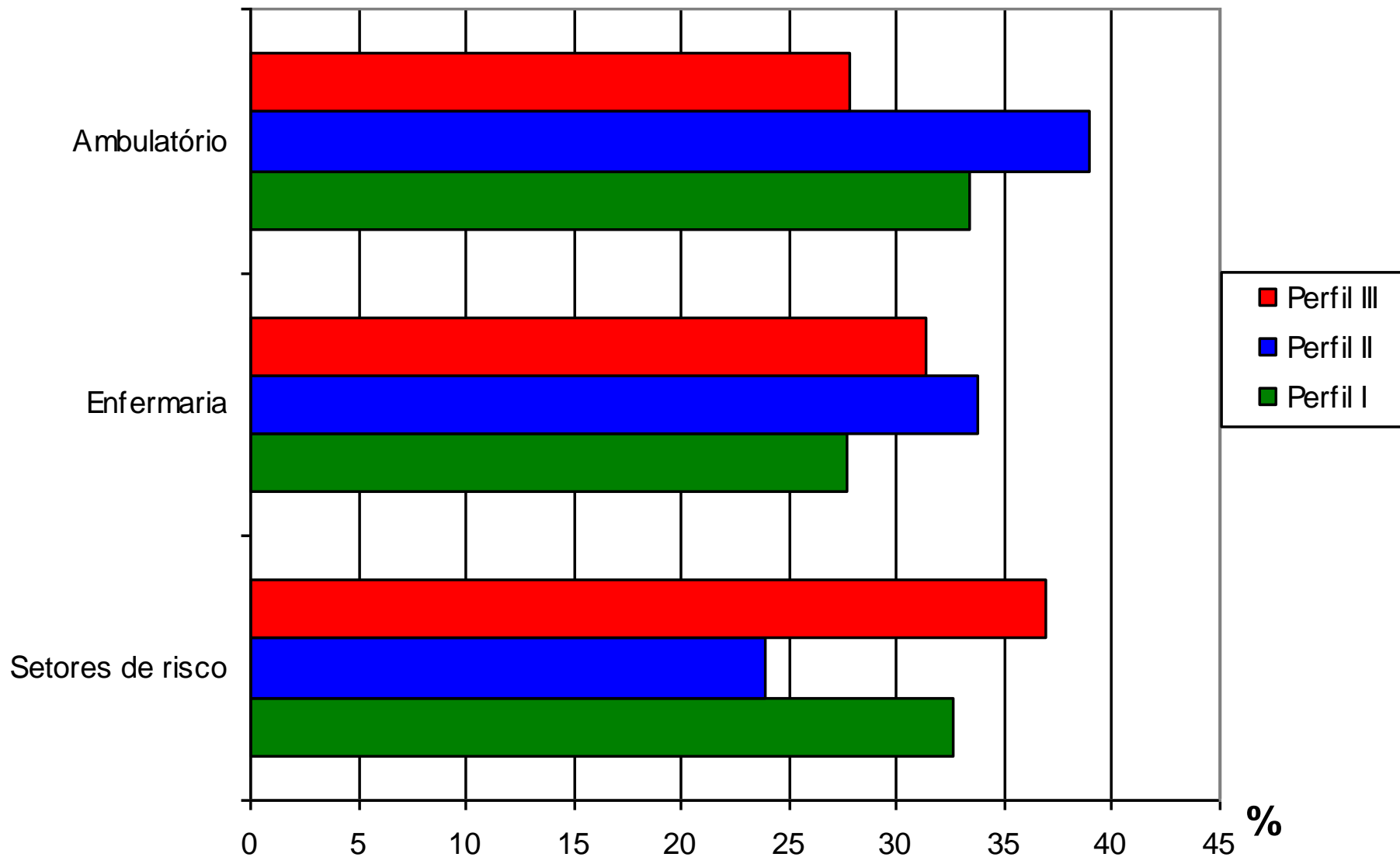
**Gráfico 3: Perfil III de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com os resultados do teste de difusão**



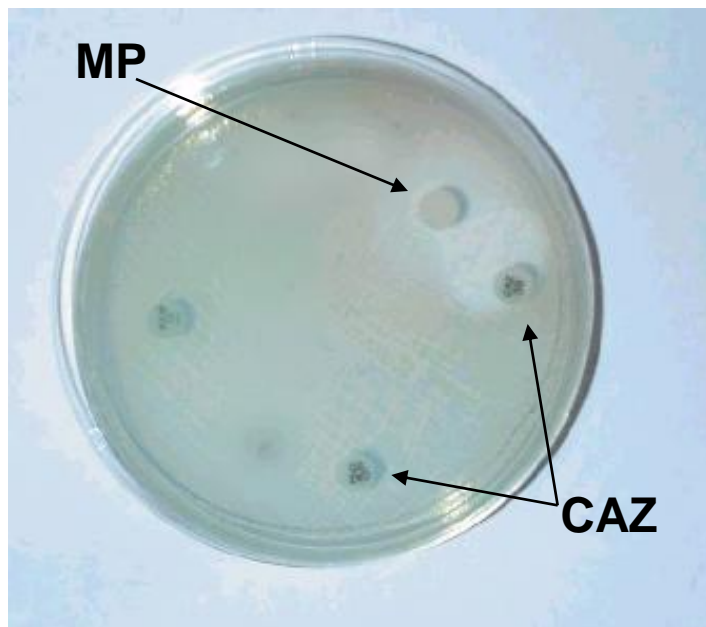
**Gráfico 4: Perfil VI de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com os resultados do teste de difusão**



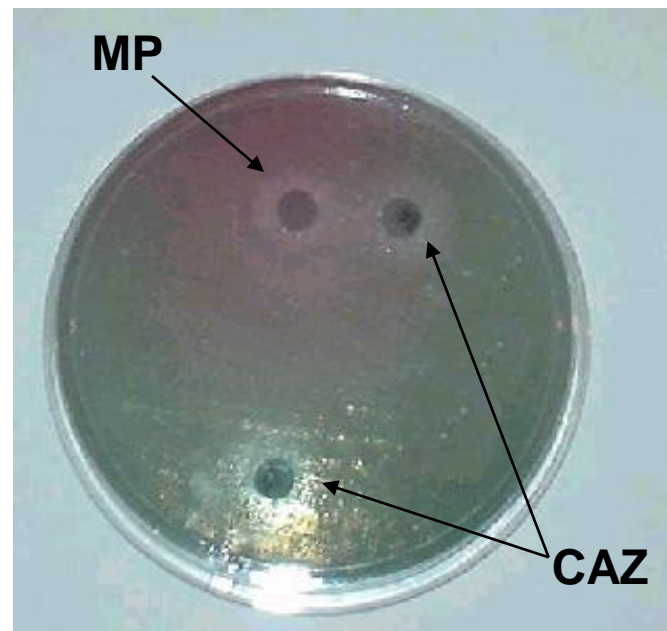
**Gráfico 5: Distribuição dos 3 perfis de resistência aos antimicrobianos, observados entre amostras de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com os setores de atendimento dos pacientes**



**Figura 1 – Teste de disco aproximação para avaliar a produção de M- $\beta$ la em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando discos de ceftazidima (CAZ) e discos contendo ácido 2-mercatopropiônico (MP)**

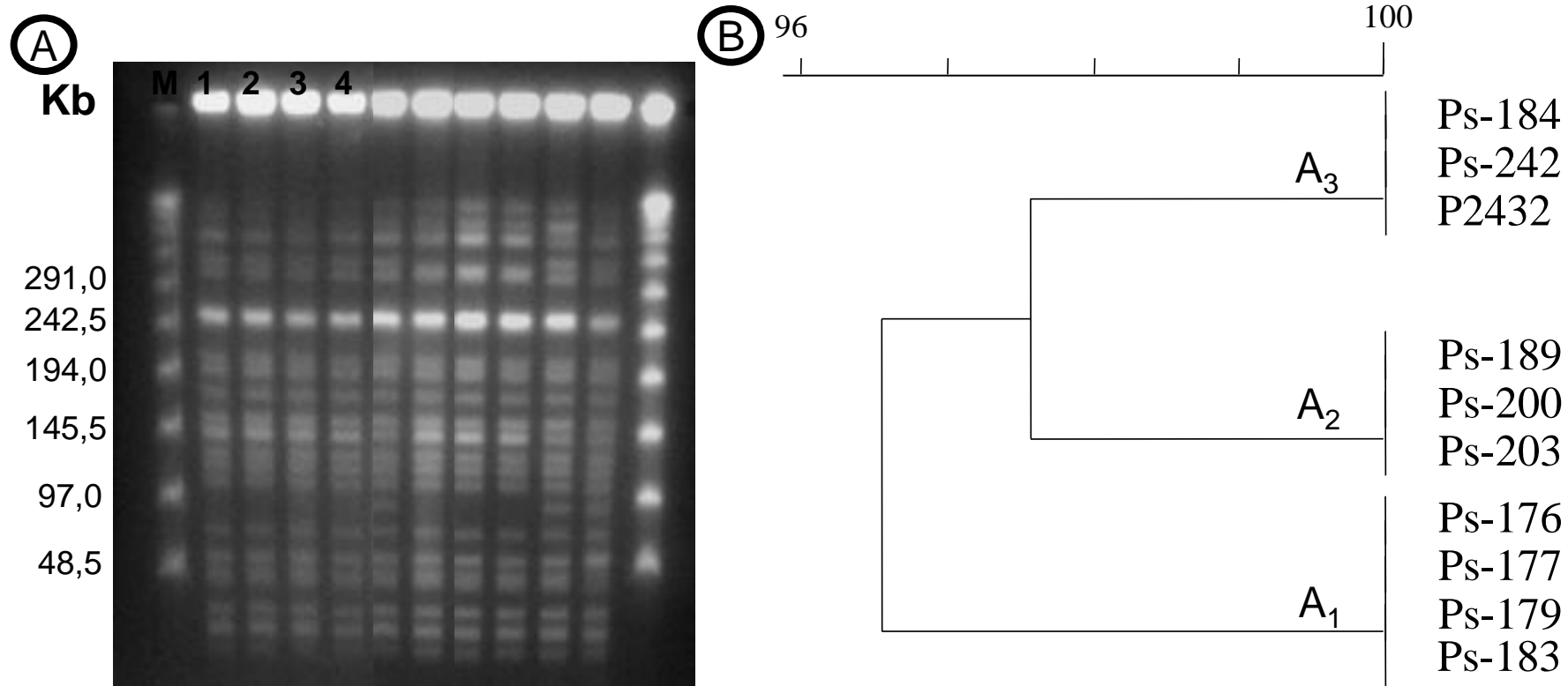


Teste positivo



Teste negativo

**Figura 2 – A. Comparação dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com SpeI, de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de M-βla. B. Dendograma resultante da análise comparativa dos perfis apresentados em A.**



M: Padrão de pesos moleculares expressos em kilobases (Kb)

Linhas 1 a 3, amostras isoladas no HAL<sup>1</sup>: Ps-176, A<sub>1</sub>; Ps-177, A<sub>1</sub>; Ps-179, A<sub>1</sub>

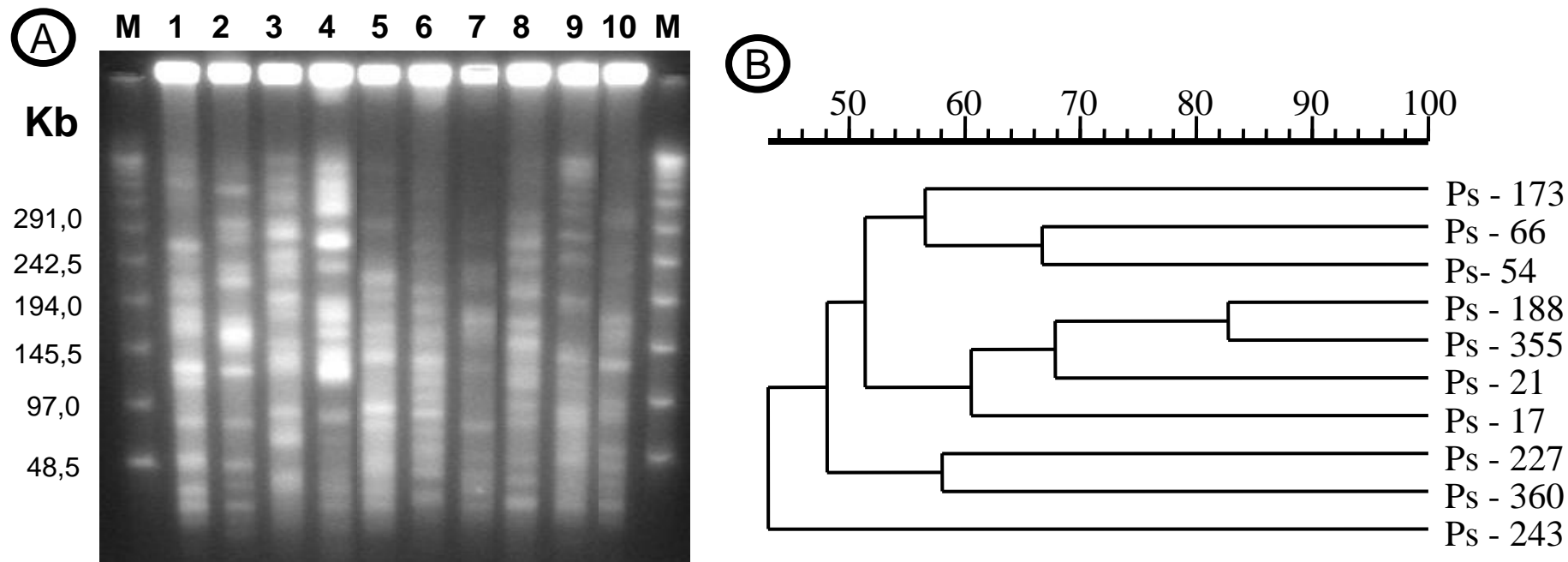
Linhas 4 a 8, amostras isoladas no HSC<sup>1</sup>: Ps-183, A<sub>1</sub>; Ps-184, A<sub>3</sub>; Ps-189, A<sub>2</sub>; Ps-200, A<sub>2</sub>; Ps-203 A<sub>2</sub>

Linha 9, amostra isolada na CSMSM<sup>1</sup>: Ps-242, A<sub>3</sub>

Linha 10, amostra isolada no Hospital São Paulo, São Paulo: P2432

<sup>1</sup> HAL – Hospital Azevedo Lima; HSC – Hospital Santa Cruz e CSMSM - Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha

**Figura 3 – A. Comparação dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, obtidos após digestão com *SpeI*, de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não produtoras de M- $\beta$ la e pertencentes aos diferentes perfis de resistência. B. Dendograma resultante da análise comparativa dos perfis apresentados em A.**



M: Padrão de pesos moleculares expressos em kilobases (Kb)

Linhas 1 a 5, amostras pertencentes ao perfil de resistência I, Ps-21, Ps-66, Ps-188, Ps-227 e Ps-360.

Linhas 6 a 8, amostras pertencentes ao perfil de resistência II, Ps-54, Ps-243 e Ps-355.

Linhas 9 e 10, amostras pertencentes ao perfil de resistência III, Ps-17e Ps-173.

**TABELA 1- Distribuição de 162 amostras de *P. aeruginosa* de origem clínica, de acordo com a fonte de isolamento, em quatro hospitais localizados na cidade de Niterói, no período de julho de 2002 até dezembro 2003.**

<b>Nº de amostras (%) de <i>P. aeruginosa</i> por instituição <sup>1</sup></b>					
<b>Fontes de isolamento</b>	<b>HAL</b>	<b>HSC</b>	<b>CSMSM</b>	<b>HUAP</b>	<b>Total (%)</b>
Urina	9 (26,5)	11 (20,0)	8 (40,0)	9 (17,0)	<b>37(22,8)</b>
Secreções <sup>2</sup>	15 (44,1)	37 (67,3)	7 (35,0)	26 (49,1)	<b>85 (52,5)</b>
Ponta de cateter	1 (2,9)	1 (1,8)	1 (5,0)	7(13,2)	<b>10 (6,2)</b>
Sangue	7 (20,6)	4 (7,3)	0	3(5,7)	<b>14 (8,6)</b>
Líquidos de Punção <sup>3</sup>	1 (2,9)	0	0	2 (3,8)	<b>3 (1,9)</b>
Outras fontes <sup>4</sup>	1 (2,9)	2 (3,6)	4 (20,0)	6 (11,3)	<b>13 (8,0)</b>
<b>Total</b>	<b>34 (21,0)</b>	<b>55 (34,0)</b>	<b>20 (12,3)</b>	<b>53 (32,7)</b>	<b>162 (100)</b>

<sup>1</sup>HAL – Hospital Azevedo Lima; HSC – Hospital Santa Cruz; CSMSM: Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha; HUAP- Hospital Universitário Antônio Pedro

<sup>2</sup> Inclui: secreções de feridas, de drenos, oculares, de ouvido, intrabdominais, do trato respiratório inferior e outras

<sup>3</sup> Inclui: líquido pleural e líquido ascítico

<sup>4</sup> Inclui: fragmento de tecido plantar, fragmento unha e raspado de lesão



**TABELA 2- Distribuição de 162 amostras de *P. aeruginosa* de origem clínica, de acordo com os setores de atendimento aos pacientes, em quatro hospitais localizados na cidade de Niterói, no período de julho de 2002 até dezembro 2003.**

<b>Nº de amostras (%) de <i>P. aeruginosa</i> por instituição<sup>1</sup></b>					
<b>Setores de atendimento</b>	<b>HAL</b>	<b>HSC</b>	<b>CSMSM</b>	<b>HUAP</b>	<b>Total (%)</b>
Setores de risco <sup>2</sup>	22 (64,7)	12 (21,8)	0	12 (22,6)	<b>46 (28,4)</b>
Enfermarias	4 (11,8)	33 (60,0)	13 (65,0)	33 (62,3)	<b>83 (51,2)</b>
Ambulatório	1 (2,9)	10 (18,2)	0	7 (13,2)	<b>18 (11,1)</b>
Desconhecido	7 (20,6)	0	7 (35,0)	1 (1,9)	<b>15 (9,3)</b>
<b>Total</b>	<b>34 (21,0)</b>	<b>55 (34,0)</b>	<b>20 (12,3)</b>	<b>53 (32,7)</b>	<b>162 (100)</b>

<sup>1</sup> HAL – Hospital Azevedo Lima; HSC – Hospital Santa Cruz; CSMSM: Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha; HUAP- Hospital Universitário Antônio Pedro

<sup>2</sup> Inclui: Centro de terapia Intensiva; Unidade de pacientes graves; Unidade intermediária; Unidade coronariana e UTI neonatal.

**TABELA 3- Distribuição das freqüências de resistência a 11 antimicrobianos, de 162 amostras de *P. aeruginosa* de origem clínica isoladas em quatro hospitais da cidade de Niterói, no período de julho de 2002 até dezembro 2003.**

Antimicrobianos	N <sup>o</sup> (%) de amostras resistentes em cada instituição <sup>1</sup>				Total (%)
	HAL	HSC	CSMSM	HUAP	
Cefotaxima	22 (64,7)	35 (63,6)	16 (80,0)	39 (73,6)	112 (69,1)
Ceftriaxona	24 (70,6)	37 (67,3)	12 (60,0)	33 (62,3)	106 (65,4)
Ceftazidima	13 (38,2)	19 (34,5)	5 (25,0)	13 (24,5)	50 (30,9)
Cefepima	16 (47,1)	17 (30,9)	7 (35,0)	14 (26,4)	54 (33,3)
Aztreonam	6 (16,6)	15 (27,3)	6 (30,0)	18 (34,0)	45 (27,8)
Imipenem	16 (47,1)	26 (47,3)	8 (40,0)	8 (15,1)	58 (35,8)
Piperacilina-tazobactam	10 (29,4)	17 (30,9)	7 (35,0)	11 (20,8)	45 (27,8)
Ticarcilina-ac. clavulânico	20 (58,8)	28 (50,9)	10 (50,0)	24 (45,3)	82 (50,6)
Ciprofloxacina	21 (61,8)	30 (54,5)	14 (70,0)	24 (45,3)	89 (54,9)
Amicacina	16 (47,1)	18 (32,7)	11 (55,0)	7 (13,2)	52 (32,1)
Gentamicina	22 (64,7)	27 (49,1)	12 (60,0)	23 (43,4)	84 (51,9)

<sup>1</sup> HAL – Hospital Azevedo Lima; HSC – Hospital Santa Cruz; CSMSM - Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha; HUAP- Hospital Universitário Antônio Pedro

**TABELA 4- Características das 9 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M-βla isoladas em três hospitais da cidade de Niterói.**

<b>Amostras</b>	<b>Data de Isolamento</b>	<b>Hospital de Origem<sup>1</sup></b>	<b>Setor de Origem</b>	<b>Fonte de Isolamento</b>	<b>Perfis de PFGE</b>
Ps-176	18/11/02	HAL	Unidade intermediária	Urina	A <sub>1</sub>
Ps-177	26/11/02	HAL	Unidade intermediária	Urina	A <sub>1</sub>
Ps-179	10/12/02	HAL	Unidade intermediária	Ponta de cateter	A <sub>1</sub>
Ps-183	23/11/02	HSC	Enfermaria	Sec. respiratória	A <sub>1</sub>
Ps-184	27/11/02	HSC	Enfermaria	Lavado brônquico	A <sub>3</sub>
Ps-189	27/11/02	HSC	Enfermaria	Lavado brônquico	A <sub>2</sub>
Ps-200	13/11/02	HSC	Enfermaria	Urina	A <sub>2</sub>
Ps-203	11/12/02	HSC	Enfermaria	Lavado brônquico	A <sub>2</sub>
Ps-242	09/02/03	CSMSM	Enfermaria	Urina	A <sub>3</sub>

<sup>1</sup> HAL – Hospital Azevedo Lima; HSC – Hospital Santa Cruz e CSMSM - Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha

**TABELA 5- Distribuição dos 4 perfis de resistência de 162 amostras de *P. aeruginosa* nos hospitais avaliados.**

Hospitais de origem <sup>1</sup>	Numero (%) de amostras em cada perfil				Total (%) n=162
	I n=47	II n =49	III n =57	IV n =9	
HAL	7 (20,6)	9 (26,5)	15 (44,1)	3 (8,8)	34 (21,0)
HSC	17 (31,0)	15 (27,3)	18 (32,7)	5 (9,1)	55 (34,0)
CSMSM	4 (20,0)	7 (35,0)	8 (40,0)	1 (5,0)	20(12,3)
HUAP	19 (35,8)	18 (34,0)	16 (30,2)	0	53(32,7)

<sup>1</sup> HAL – Hospital Azevedo Lima; HSC – Hospital Santa Cruz e CSMSM - Casa de Saúde e Maternidade Santa Martha; HUAP- Hospital Universitário Antônio Pedro

**TABELA 6- Comparação da susceptibilidade ao imipenem e ao meropenem entre 89 amostras de *P. aeruginosa*, de acordo com o teste de difusão.**

<b>Resultado do teste de susceptibilidade</b>		<b>Total (%)</b>
<b>Imipenem</b>	<b>Meropenem</b>	<b>n=89</b>
Resistente	Resistente	23
Sensível	Sensível	50
<b>Resultados concordantes</b>		<b>73 (82%)</b>
Resistente	Sensível	9
Resistente	Intermediário	5
Sensível	Resistente	1
Intermediário	Resistente	1
<b>Resultados discrepantes</b>		<b>16 (18%)</b>