



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ELISETH COSTA OLIVEIRA DE MATOS

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, LETALIDADE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES, PRODUTORAS
DE METALOBETALACTAMASES DE ISOLADOS CLÍNICOS EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA NA REGIÃO NORTE.**

BELÉM
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ELISETH COSTA OLIVEIRA DE MATOS

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, LETALIDADE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES PRODUTORAS
DE METALOBETALACTAMASES, EM ISOLADOS CLÍNICOS EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA NA REGIÃO NORTE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais. Orientadora: Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima, Co-Orientadora: Profa. Dr^a Ina Carla do Rosário Souza Carneiro.

BELÉM/PARÁ

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ELISETH COSTA OLIVEIRA DE MATOS

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, LETALIDADE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES PRODUTORAS
DE METALOBETALACTAMASES, EM ISOLADOS CLÍNICOS EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA NA REGIÃO NORTE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais. Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais.

Aprovado em ____/____/____

Conceito: _____

Banca Examinadora

Profa.Dra. Karla Valéria Batista Lima

Orientadora – IEC/SVS/MS

Profa.Dra.Irna Carla do Rosário Souza Carneiro (FSCMPA/UEPA)

Co-orientadora

Prof. Dr.Haroldo José de Matos (IEC/SVS/MS)

Profa. Dra.Rosana Libonati (*IEC/SVS/MS/UFPA*)

Profa. Dra. Karla Tereza da Silva Ribeiro (UFPA)

Profa. Dra.Rita Catarina Medeiros de Souza (NMT/UFPA)

Profa. Dra. Cléa Carneiro Bichara (UEPA/UFPA)

Membro Suplente

*Dedico este trabalho a toda **minha Família**, que esteve presente apoiando os momentos mais difíceis de minha trajetória.*

Meus pais Epaminondas, Marly Oliveira e meu esposo Ediel Matos.

A maior riqueza do ser humano é amar e ser amado por sua família.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Karla Valéria pela orientação e ensinamentos para o desenvolvimento e conclusão do projeto. Agradeço a amizade, admiro a dedicação, disciplina, apoio e a preocupação que tem com seus orientandos;

À Profa Dra Irna Carla R. S. Carneiro pela orientação, amizade, valiosos momentos de aprendizado agradeço os momentos de conversa e troca de conhecimento além da confiança depositada em meu trabalho;

À Profa Dra Rita Medeiros, pelo apoio e colaboração no trabalho.

Agradeço à Dra Elizabeth Santos, diretora do Instituto Evandro Chagas, pela aprovação do projeto e autorizar o desenvolvimento do mesmo nas dependências desta conceituada Instituição.

À Dra Maria Luiza Lopes pela participação autorizando a realização dos experimentos na seção de Bacteriologia e Micologia- IEC/SVS/MS.

Ao Dr Edvaldo Loureiro pela participação, colaboração no diagnóstico bacteriológico e orientações dadas ao trabalho;

À Profa Dra Ana Cristina Gales, professora e Coordenadora do Laboratório ALERTA-UNIFESP, por disponibilizar o espaço do laboratório para experimentos de Hidrólise, PCR e Microdiluição e concessão de cepas ATCCs para Controle de Qualidade.

À equipe do Laboratório ALERTA, pela colaboração nos experimentos, em especial Adriana Nicoletti e Rodrigo Cayô.

Ao Prof Dr. Pignatari, professor e Coordenador do Laboratório LEMC- UNIFESP, por disponibilizar o espaço do laboratório para experimentos de PFGE.

À Equipe do laboratório de Microbiologia da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, que estiveram dispostas em participar do projeto colaborando com o diagnóstico e disponibilizar as cepas bacterianas para o estudo;

À querida amiga Andrea Moura pela disponibilidade em colaborar com o trabalho sem qualquer dificuldade.

À Equipe da CCIH-FSCMPA, Enfermeiras Elaine, Liliane, Liliam, Emylia, Débora, à Dra Wardi, Dra Débora, Dra Paula pelo interesse em fornecer as informações de IRAS e colaboração no trabalho;

À Ester pelo carinho, atenção e dedicação ao trabalho que desenvolve na CCIH;

Ao Prof Dr. Regis Bruni Andriolo, Prof Dr. Haroldo José Matos e Profa Ismari Perini Furlaneto pela colaboração nas análises estatística.

À Núbia Modesto bolsista de iniciação científica - pelo levantamento de dados realizados na FSCMPA e pelo apoio acadêmico;

À Daiane Brasil bolsista de iniciação científica-pelo levantamento de dados realizados na FSCMPA e pelo apoio acadêmico;

À Wana Lailan - bolsista de iniciação científica pela amizade, carinho e pela realização de experimentos na Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas;

À Marília Lima - aluna de mestrado, pela amizade e pela colaboração nos experimentos na Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas;

As colegas Dra. Roberta, Dra. Luana e Ismari e Ana Judith pelo apoio e colaboração no decorrer dos trabalhos;

À Dra Silvia e Dra Maurimélia, do Laboratório de Micologia pela colaboração com materiais para realização de experimentos;

Aos Bolsistas: Emily, Marília, Joseane, Jean, Wana, Yan, Joseline, Rafaela, Arthur, Bárbara pela alegria de estar em uma equipe nota dez em dedicação e alegria, adorei vocês.

À Dolores e Caetano - técnicos do Laboratório de Bacteriologia pelo constante apoio nos experimentos.

Ao Arnaldo e Equipe do Meio de Cultura (IEC) - Funcionários da Esterilização, sem eles não teria o básico para desenvolver os trabalhos experimentais.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram na realização deste estudo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A resistência bacteriana é responsável por grandes preocupações quanto ao impacto imediato aos sistemas de saúde. A proposta deste estudo foi determinar as características epidemiológicas, letalidade e aspectos moleculares de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em hospital de ensino de Belém/Pará e analisar o desempenho do teste de sensibilidade para *P. aeruginosa* em sistema automatizado VITEK-2 para esclarecimento da resistência. A população do estudo foi constituída de 54 pacientes com infecção por *P. aeruginosa* internados na UTI adulto, pediátrica e neonatal no período de janeiro de 2010 a março de 2012. Para investigação epidemiológica foram coletados dados demográficos, co-morbidades, tempo de permanência na UTI, classificação dos episódios de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), uso de procedimentos invasivos, tipo de infecção, terapia utilizada e desfecho do paciente (alta ou óbito), escore de MacCabe Jackson, APACHE II, escore de Charlson. A identificação bacteriana foi realizada a partir dos testes bioquímicos e do sistema Vitek-2. O teste de sensibilidade foi realizado com a aplicação do método de referência microdiluição em caldo, e a detecção da produção de metalo-beta-lactamase pelo método do duplo disco e pela PCR. A genotipagem por amplificação por meio do sistema DiversiLab. A *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno mais freqüente no hospital e esta ocorrência foi maior na UTI adulto. A infecção respiratória foi predominante na UTI adulto, enquanto a infecção de corrente sanguínea prevaleceu nas UTI neonatal e pediátrica. A multirresistência foi mais encontrada na UTI adulto, a média da faixa etária da população foi de 28 anos com tempo de internação em média de 87,1 dias, a maioria das doenças de base eram potencialmente fatais e os principais fatores de risco para aquisição de infecção por PaMR foram o uso de ventilação mecânica e sonda vesical. Podemos afirmar que após os resultados da metanálise foi possível evidenciar que as cepas MR apresentaram taxa de mortalidade maior, com duas vezes mais chances de ocorrer o óbito, sendo a multirresistência um fator de mau prognóstico em pacientes com infecção por PaMR. Foi detectado quatro isolados produtores da variante blaSPM-1 e na genotipagem figurou a presença de similaridade genética maior que 97%, as variações observadas podem ter relação com pressão seletiva existente na UTI adulto, somada a terapia inadequada. Este estudo mostrou a importância de investigação de infecções por patógenos multirresistentes em unidades críticas, contribuindo para o melhor monitoramento e controle destas infecções.

Palavras-chave: Infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, Resistência Bacteriana, Infecção Relacionada à Assistência a Saúde.

ABSTRACT

The bacterial resistance is responsible for major concerns about the great problems on health systems. The proposal of this study was to determine the epidemiological, lethality and molecular characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) in a teaching hospital in city of Belem, Pará, Brazil and analyze the performance of susceptibility testing for *P. aeruginosa* in automated VITEK -2 to study the antimicrobial resistance. The target people of this study consisted of 54 patients with *P. aeruginosa* infection at the adult , pediatric and neonatal ICUs from January 2010 to March 2012. For the epidemiological research, demographic data, comorbidities, length of stay were collected. Episodes of Healthcare-associated infections were defined in accordance to Center for Disease Control and Prevention (CDC), use of invasive procedures, previous therapy and patient outcome, Jackson MacCabe score, APACHE II score and Charlson score were documented. The bacterial identification was performed by biochemical tests and VITEK-2 system. The sensitivity test was performed with the application of the method of broth microdilution , and detection of metallo-beta-lactamase by the double disc and PCR method. The test of Genotyping was made by amplification through DiversiLab system. The *P. aeruginosa* was the second most common pathogen in the hospital and this occurrence was higher in the adult ICU. The respiratory infection was predominant in the adult ICU, while bloodstream infection was prevalent in pediatric and neonatal ICU. The multidrug resistance was higher in the adult ICU, the average age of patients was 28 years, with an average length of stay of 87.1 days, the diseases were potentially fatal and major risk factors for acquisition of PaMR infection were the use of mechanical ventilation and urinary catheterization. Through the meta-analysis study, we found that infections caused by MR strains showed higher mortality rate, and were twice as likely to death occurs, multidrug resistance a factor of poor prognosis in patients with infection PaMR. Four isolates producers blaSPM-1 variant was detected and genotyping figured the presence of genetic similarity greater than 97%, the changes observed may be related to selective pressure existing in the adult ICU, coupled with inadequate therapy. This study demonstrated the importance of investigations of infections with multidrug-resistant pathogens in critical care units, contributing to these data the possibility of better monitoring and control of these infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* Infection, Bacterial Resistance, Infection-Related Assistance to Health.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação da família <i>Pseudomonaceae</i> por homologia dos grupos de RNAr.....	25
Quadro 2- Síntese dos fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
Quadro 3- Esquema de classificação das β -lactamases, baseado no estudo de Draws e Bonomo, 2010.....	40
Quadro 4- Sistema de pontuação de mortalidade estimada (APACHE II).....	64
Quadro 5- Índice de Comorbidade de Chalson (ICC).....	65
Quadro 6- Relação de sequência dos oligonucleotídeos e amplicons obtidos nas reações de PCR, para a pesquisa dos genes codificadores de M β L em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
Artigo 2 – Quadro 1 Perfil fenotípico de multirresistência, óbito e padrão do Diversilab de <i>P. aeruginosa</i> ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI adulto, pediátrica.....	104
Artigo 2 - Quadro 2 Perfil fenotípico de multirresistência, óbito e padrão do Diversilab de <i>P. aeruginosa</i> ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI neonatal....	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formando biofilme em torneira hospitalar por Pearson (2012).....	27
Figura 2 - Disseminação global dos diferentes tipos de M β L.....	51
Figura 3 - Disseminação no Brasil de Metalo- β -Lactamases bla SPM-1.....	51
Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos laboratoriais utilizados para congelamento a -70°C das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Figura 5 – Demonstração da microplaca para realização do teste: a) materiais para realização da microdiluição em caldo, b) microplaca com a droga e c) microplaca após 18 – 24hs de incubação – leitura e interpretação.....	71
Figura 6 - Modelo esquemático do posicionamento do disco aproximação para detecção de M β L.....	73
Artigo 2 - Figura 1 - Prevalência de isolados de <i>P. aeruginosa</i> recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.....	91
Artigo 2 – Figura 2 Distribuição de cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes e produção de blaSPM-1 like recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.....	92
Artigo 2 – Figura 3 Proporção de infecção por <i>P. aeruginosa</i> segundo grupos etários, ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.....	92
Artigo 2 – Figura 4 Box Plot da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos: imipenem, meropenem, gentamicina, ampicacina, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam, cefepime e ceftazidima, testados em isolados de <i>P. aeruginosa</i>	99
Artigo 2 – Figura 5 Isolados de <i>P. aeruginosa</i> produtores do gene SPM-1.....	100
Artigo 2 – Figura 6 Dendrograma da relação clonal das cepas de <i>P. aeruginosa</i> . Os isolados destacados são os casos que apresentaram 97% de semelhança.....	101
Artigo 2 – Figura 7 Dendrograma da relação clonal das cepas de <i>P. aeruginosa</i> . Os isolados destacados são os casos que apresentaram 97% de semelhança.....	102

Artigo 4 - Figura 01- Razões de chance para mortalidade entre pacientes com infecção por <i>P. aeruginosa</i> com fenótipo de PAMR comparado aos PA não MR.....	133
Artigo 4 - Figura 02- Razões de chance para mortalidade entre pacientes com infecção por <i>P. aeruginosa</i> com fenótipo de MR produtor de MβL, SPM-1 comparado aos não MR.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentual de resistência de <i>P. aeruginosa</i> isolados na América Latina e Brasil.....	35
Artigo 1- Tabela 1. Prevalência de agentes associados as infecções relacionadas a assistência a saúde no período de 2005 a 2010 na unidade de terapia intensiva da FSCMPA.....	83
Artigo 1- Tabela 2. Distribuição percentual de micro-organismos no período de 2005 a 2010 na unidade de terapia intensiva da FSCMPA.....	84
Artigo 1 - Tabela 03. Densidade de incidência de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde por <i>P. aeruginosa</i> no período de 2005 a 2010, na FSCMPa.....	85
Artigo 1 - Tabela 04. Prevalência de <i>P. aeruginosa</i> nos diferentes espécimes clínicos no período de 2005 a 2010, na unidade de terapia intensiva da FSCMPa.....	85
Artigo 1 - Tabela 05. Distribuição percentual de espécimes clínicos com isolamento de <i>P. aeruginosa</i> , por unidade de terapia intensiva no período de 2005 a 2010 da FSCMPa.....	85
Artigo 1 – Tabela 06- Perfil de resistência de <i>P.aeruginosa</i> no período de 2005 a 2010 nas unidades de terapia intensiva da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.....	86
Artigo 2 – Tabela 01 - Análise bivariada das características clínicas dos pacientes com infecção por <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI da FSCMPA.....	95
Artigo 2 – Tabela 02 - Análise bivariada das características clínicas dos pacientes com infecção por <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI da FSCMPA.....	96
Artigo 2 – Tabela 03 - Análise bivariada dos <i>scores</i> de gravidade dos pacientes com infecção por <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período	

de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI da FSCMPA.....97

Artigo 2 – Tabela 04 - Análise multivariada com variável dependente o óbito, das características clínicas dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistentes, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI da FSCMPA.....97

Artigo 2 – Tabela 05 - Análise multivariada com variável dependente a multirresistência, dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistentes, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI da FSCMPA.....98

Artigo 2 – Tabela 06 – Perfil de sensibilidade de 54 isolados de *P. aeruginosa* frente a seis antimicrobianos, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI da FSCMPA.....98

Artigo 3 - Tabela 01. Resultado da comparação entre os a Determinação da CIM do Vitek e da Microdiluição em caldo dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* frente aos seis antimicrobianos testados, isolados de pacientes internados em unidade de terapia intensiva em hospital de ensino de Belém-Pará, no período de janeiro de 2010 a março de 2012.....120

Artigo 4 - Tabela 01. Distribuição dos 54 casos de IRAS por *P. aeruginosa* em UTI e evolução para o óbito no hospital de ensino de Belém-Pará.....130

Artigo 4 - Tabela 02. Descrição dos estudos elegíveis para metanálise.....131

Artigo 4 - Tabela 03. Total de pacientes com infecção por PAMR e PA não MR produtores de MβL gene blaSPM-1 e respectivos números absolutos de óbitos.....132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP binding cassette
<i>abba</i>	Estrutura tridimensional
AIM	<i>Australian imipenemase</i>
APACHE-II	Sistema de pontuação de mortalidade estimada (Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II)
ATP	Adenosina trifosfato
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centers for Diseases Control and Prevencion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
5'CS	Região conservada
DIM	Dutch Imipenemase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
GES-1	β -lactamases de espectro estendido mediada por plasmideo
GIM	German Imipenemase
ICS	Infecção de Corrente Sanguinea
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecção Relacionada a Assistência à Saúde
ITR	Infecção do Trato Respiratório
ITU	Infecção do Trato Urinário
KMH	Kyorin Health Science Metalobetalactamase
LPS	Lipopolissacarideo
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion
M β L	Metalobetalactamase
MR	Multirresistente
MFS	Major Facilitador Superfamily
MYSTIC	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Colletion

NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamase
NH2	Acetilação do grupamento amina
NNIS	National Nosocomial Infectious Surveillance
OH	Grupamento hidroxila
<i>Omp</i>	Outer-membrane protein
OprD	outer-membrane protein
OXA	Oxacilinase, grupo de β -lactamases
PER-1	β -lactamases de espectro estendido mediada por plasmideo
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PSE	<i>Pseudomonas Specific Enzyme</i>
RND	Resistance nodulation-division
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
RT-PCR	PCR transcriptase reversa
SENTRY	Sentry Antimicrobial Surveillance
SMR	Small Multidrug Resistance
SHV	β -lactamases de espectro estendido
SIM	Seoul Imipenemase
SPM-1	São Paulo Imipenemase
TEM	β -lactamases de espectro estendido
TMB	Tripole Metalobetalactamase
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias/mL
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEB-1	β -lactamases de espectro estendido mediada por plasmideo
VIM	Verona Imipenemase
XR	Extraresistente
ZN ²⁺	Molécula de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	24
3.1	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	24
3.1.1	Taxonomia	24
3.2	MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	31
3.2.1	Baixa permeabilidade da membrana externa	35
3.2.2	Sistema de efluxo em <i>P. aeruginosa</i>	36
3.2.3	Produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos	38
3.2.4	Produção de betalactamases	38
3.3	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (I.R.A.S.).....	41
3.4	METALO-B-LACTAMASE (MβL) MÓVEIS OU ADQUIRIDAS.....	45
3.4.1	Aspectos epidemiológicos das MβL	47
3.5	ANTIMICROBIANOS COM AÇÃO ANTI-<i>PSEUDOMONAS</i>	52
3.5.1	Cefalosporinas	52
3.5.2	Aminoglicosídeos	53
3.5.3	Quinolonas	54
3.5.4	β-Lactâmicos + inibidores de β-Lactamases	54
3.5.5	Carbapenemas	55
3.6	ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS MBL	57
4	OBJETIVOS.....	59
4.1	OBJETIVO GERAL.....	59
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
5.1	LOCAL DO ESTUDO.....	60

5.2	POPULAÇÕES DO ESTUDO.....	60
5.3	TIPO DE ESTUDO.....	61
5.3.1	Critério de adequação da Terapia Antimicrobiana.....	61
5.3.2	Critérios epidemiológicos de IRAS padronizados pelo CDC.....	62
5.3.3	Classificação de MacCabe Jackson.....	63
5.3.4	Uso de dispositivos invasivos.....	64
5.3.5	Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II-APACHE...64	
5.3.6	Escore Chalon.....	65
5.4	ESTUDO COMPARATIVO COM METANÁLISE.....	65
5.5	ISOLAMENTO BACTERIANO E CARACTERÍSTICA FENOTÍPICA.....	67
5.5.1	Teste de identificação bacteriana	67
5.5.2	Procedimento de estocagem das amostras	67
5.6	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	69
5.6.1	Método automatizado – VITEK 2.....	69
5.6.2	Método de microdiluição em caldo.....	70
5.6.2.1	Preparo de solução estoque do antibiótico.....	70
5.6.2.2	Preparo da suspensão bacteriana.....	71
5.6.3	Critério Interpretativo de erro.....	72
5.7	DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES OU METALO-BETA- LACTAMASE (MβL).....	73
5.8	DETECÇÃO MOLECULAR DOS GENES blaSPM-1, blaIMP-1 E blaVIM-1.....	74
5.9	TIPAGEM MOLECULAR PELO DIVERSILAB.	76
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
5.11	ASPECTOS ÉTICOS.....	77
6	RESULTADOS.....	78
6.1	APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS.....	78
7	ARTIGOS	79
7.1	ARTIGOS 01 - PREVALÊNCIA DE AGENTES MICROBIANOS E SENSIBILIDADE DA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	79

7.2	ARTIGO 02 - PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> EM UTI DE UM HOSPITAL DE BELÉM-PARÁ.....	91
7.3	ARTIGO 03: ALTAS TAXAS DE ERROS EM SISTEMAS AUTOMATIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	116
7.4	ARTIGO 04: MORTALIDADE POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> MULTIRRESISTENTES: ESTUDO COMPARATIVO COM METANÁLISE.....	124
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
9	REFERÊNCIAS.....	143
10	APÊNDICES.....	157
	ANEXOS.....	162

1 INTRODUÇÃO

O panorama da resistência bacteriana tem sido observado de forma dramática no contexto hospitalar e particularmente entre pacientes graves, pela presença de linhagens microbianas multirresistente (MR), extra-resistentes (XR) agravando ainda mais a problemática destas infecções (GONÇALVES et al., 2009; GOMES et al., 2011; MAGIORAKOS et al., 2011). Esses micro-organismos apresentam características de MR, pela produção de diferentes mecanismos, sejam eles isolados ou associados, promovendo a resistências aos diferentes fármacos, o qual pode ou não ter implicações clínicas, dependendo dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos aplicados aos antimicrobianos específicos (CLIMACO, 2011; GOMES et al., 2011; MAGIORAKOS et al., 2011; PICÃO et al., 2012).

Importante destacar que as infecções por *P. aeruginosa* são de difícil tratamento, pela baixa efetividade dos fármacos a este patógeno. A ação de muitos antimicrobianos é limitada para tratar infecções causadas por esta espécie, devido às barreiras naturais da bactéria e ou pela aquisição de resistência. É um micro-organismo intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, dentre estes o cloranfenicol, a tetraciclina, algumas quinolonas e betalactâmicos. Entre os fármacos mais utilizados na terapêutica estão: as penicilinas (piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), carbapenemas (meropenem e imipenem), monobactâmicos (aztreonam), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e ampicacina) e as fluoroquinolona (ciprofloxacina) (ROSSOLINI E MANTENGOLI, 2005; ARORA, JINDAL, ROMIT, 2011).

O interessante é que este patógeno é capaz de persistir em ambientes hospitalares por período prolongado, em consequência da pressão seletiva existente e sua real adaptabilidade ao meio ambiente (CLIMACO, 2011). O fenótipo da resistência aos

antimicrobianos tem se alastrado com muita rapidez para muitos fármacos (PATERSON e BONOMO, 2005; ARORA, JINDAL, ROMIT, 2011; WILLMANN et al., 2013).

Com o exposto, torna-se fundamental o conhecimento detalhado dos mecanismos que as bactérias utilizam para se tornarem resistentes aos antimicrobianos, de modo que este conhecimento é necessário tanto para adequação de protocolos de tratamento das infecções, quanto para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. (ZAVASCKI et al., 2006; PICOLI, 2008; CLIMACO, 2011; FEHLBERG, 2012). É importante ressaltar que a luta contra a resistência bacteriana continua sendo um desafio na saúde e deve ser abordado sob diferentes aspectos.

A compreensão dos processos relacionados à ação dos antibióticos no surgimento da resistência segue uma linha para se entender o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes lançados no mercado, sendo que a sua aplicação terapêutica de forma racional e a adoção de normas para controle de infecções no contexto hospitalar têm representado diferentes níveis de ações contínuas e inter-relacionadas. Os recentes avanços na identificação de novos alvos macromoleculares relevantes e no entendimento dos mecanismos de ação de antibiótico revelam um panorama muito complexo, onde diversos efeitos podem ser responsáveis pela potência de uma determinada substância, a partir de fenômenos que ocorrem em consonância e contribuem de maneira diferenciada para a atividade antibacteriana (CLIMACO, 2011; NEVES et al., 2011; FEHLBERG, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A problemática da resistência bacteriana tem trazido grandes preocupações no que se refere ao impacto imediato aos sistemas de saúde, o que inclui novas exigências para o tratamento do paciente, colaborando para o maior tempo de internação do indivíduo no ambiente hospitalar, e por consequência, elevação dos custos com a administração de novos antimicrobianos. Assim, diferente do que se postulavam as infecções bacterianas não foram extintas após a descoberta dos antibióticos, e se mantêm até os dias atuais. A chamada pressão antibiótica referente à relação entre extensão de uso de antibióticos e seleção de linhagens resistentes é assunto ainda polêmico na literatura (CRIVARO et al., 2009; CLÍMACO, 2011; PICÃO et al., 2012).

Pela amplitude do problema, tem se intensificado as mobilizações dos diferentes órgãos de vigilância com intuito de aumentar a efetividade da assistência à saúde, por meio do uso racional de antimicrobianos e da detecção tempestiva, prevenção e controle da emergência e disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no país (PICOLI, 2008; TAHERI et al., 2008; MAGIORAKOS et al., 2011).

No Brasil e no mundo as Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) representam um grande transtorno para os pacientes e para as instituições de saúde, por apresentar elevada morbidade e mortalidade. Inseridos nesse cenário estão os hospitais, onde os avanços científicos têm sido utilizados para fornecer aos pacientes os serviços diagnósticos e terapêuticos mais eficazes e atualizados, e onde se tem buscado cada vez mais um controle efetivo das IRAS.

Considerando a escassez de dados regionais relacionados aos mecanismos de resistência microbiana, sobretudo à genotipagem de amostras bacterianas, entendemos ser de grande relevância determinar as características epidemiológicas e moleculares de

Pseudomonas aeruginosa isoladas de pacientes internados em unidade de terapia intensiva do hospital de ensino de Belém/Pará e analisar os resultados dos testes de sensibilidade do Vitek-2.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

3.1.1 Taxonomia

Os componentes do gênero *Pseudomonas* pertencem ao grande grupo de bastonetes Gram-negativos da família *Pseudomonadaceae*, constituída dos gêneros *Burkholderia*, *Commamonas*, *Acidorax*, *Brevundimonas*, *Sternotrophomonas*, *Acinetobacter* e *Moraxella*. São micro-organismos móveis, não fermentadores da glicose e lactose, os quais podem viver em vários ambientes como: solo, água, plantas e mesmo nos animais, incluindo os seres humanos (WINN et al., 2008).

Dentro da classificação bacteriana, o termo não fermentador faz referência a um grupo de bactérias denominadas bacilos Gram-negativos aeróbios, que não produzem esporos e são incapazes de utilizar o carboidrato como fonte de energia ou degradá-los através das vias metabólica oxidativa ao contrário da fermentativa (WINN et al., 2008; FERREIRA e LALA, 2010).

Apresentam-se sob forma de bastão medindo cerca 0,5 a 0,7 μm de espessura por 1,5 a 3,0 μm de comprimento crescem facilmente em diferentes meios de cultura, produzindo um odor adocicado ou semelhante ao de uva. Algumas cepas lisas hemácias, formam colônias lisas e redondas de coloração esverdeada fluorescente. Em geral, a identificação ocorre através da morfologia das colônias, na positividade da oxidase, e no crescimento entre 37°C a 42°C (CORNELLIS et al., 2008; WINN et al., 2009; FERREIRA e LALA, 2010). Seu crescimento a 42°C ajuda a diferenciá-la de outras espécies de *Pseudomonas* do grupo fluorescente (WINN et al., 2009).

É reconhecido que cada integrante dos cinco grupos de Ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) representam grupos genéticos taxonomicamente distintos, sendo que pela distinção foi estabelecido diferentes denominações de gêneros para cada um dos grupos de RNAr. Apenas a designação de gênero *Pseudomonas* foi mantida para os membros do grupo I de RNAr (ANZAI et al., 2000; CORNELLIS et al., 2008; WINN et al., 2009).

Quadro 1- Classificação da família *Pseudomonaceae* por homologia dos grupos de RNAr.

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

Fonte: Anzai et al., (2000); Winn et al., (2008):

A espécie mais frequente em seres humanos é a *P. aeruginosa*, tratam-se de micro-organismos aeróbios estritos, móveis (flagelo polar), de crescimento rápido, facilmente isolados em meios de cultura *in vitro*, crescem entre as temperaturas de 10 a 42°C e com temperatura ideal 37°C. A *P. aeruginosa* produz pigmentos hidrossolúveis difusíveis no meio de cultura característicos como (piocianina) um pigmento de cor azul, a pioverdina pigmento responsável pela cor verde-brilhante, a piorrubina (roxo) e piomelanina (marrom) (CORNELLIS et al., 2008; WINN et al., 2009; RODRIGUES, 2010).

A característica das colônias de *P. aeruginosa* tem variação morfológica, podendo ser puntiforme, gelatinosa, rugosa ou mucóide. A forma mucóide ocorre devido à produção de grandes quantidades de polissacarídeo extracelular, o alginato, identificada em amostras clínicas de portadores de fibrose cística. Estas cepas formam agregados de colônias mais firmes, que superam os mecanismos de defesa e que permitem maior aderência a superfícies celulares. A constituição física e química (polianiônica) da membrana externa desta bactéria demonstra poder de barreira à passagem de substâncias, como antibióticos e antissépticos, os quais precisam saturar toda a sua superfície antes da penetração, possibilitando maior resistência a essas linhagens (FERREIRA e LALA, 2010).

Quadro 2: Síntese dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fatores de virulência	Atividade Biológica
Alginato	Polissacarídeo capsular responsável pela aderência à superfície epitelial pulmonar e formação de biofilmes.
Fimrias (<i>Pili</i>)	Apêndices de superfície que permitem a aderência do micro-organismos.
Neuraminidase	Facilita a aderência.
Lipopolissacarídeo (LPS)	Produz endotoxina e causa a Síndrome séptica.
Exotoxina A	Destroem tecidos, inibe síntese proteica, interrompe atividade celular e atividade dos macrófagos.
Enterotoxina	Promove a diarreia.
Exoenzima S	Inibe a síntese de proteína.
Fosfolipase C	Destroi a membrana citoplasmática, destrói o surfactante pulmonar, inativa opsoninas.
Elastase	Degrada imunoglobulinas
Leucocidina	Inibe a função dos neutrófilos e dos linfócitos.
Piocianinas	Impede o crescimento de outras bactérias e elimina a atividade ciliar respiratória.

Fonte: Cornellis et al., (2008); Winn et al., (2008)

Estudos clássicos enfatizam sua capacidade singular para crescimento em ambientes úmidos (ROSENTHAL, 1974; ZIMAKOFF et al., 1983). Trata-se de uma bactéria

com capacidade invasiva e toxigênica, produz metabólitos extracelulares, como a elastase e proteases, que estão envolvidos na patogênese das infecções. Ela é capaz de obter carbono e nitrogênio de fontes diversas como aminoácido, ácidos graxos e amins alifáticas (FLAHERTY e STOSOR, 2004). A associação com umidade é um fator importante para a contaminação de superfícies, artigos e equipamentos hospitalares (FORTALEZA, 2005; WINN et al., 2009).

Relacionado a esses dados, relatamos a ocorrência na Irlanda de episódios de óbitos em UTI neonatal por *Pseudomonas aeruginosa* presentes na água e na torneira, a presença da bactéria foi evidenciada pela análise microbiológica da água e da torneira, após investigação mais profunda foi verificada a contaminação na torneira com formação de biofilme, figura 1, PEARSON, 2012.



Figura 1- Isolamento de *P. aeruginosa* formando biofilme em torneira hospitalar por Pearson, (2012).

Esses micro-organismos podem colonizar vários tecidos, por apresentarem uma cápsula mucóide, que possibilita a aderência à superfície da mucosa normal, além da característica antifagocitária que permite a formação de micro-colônias, chamadas de biofilmes, que estão fortemente aderidos e recobertos por material espesso, constituído pelo próprio alginato, lipopolissacarídeo e proteína (CORNELLIS et al., 2008; FERREIRA e LALA, 2010)

Estes biofilmes são formados a partir de agrupamento de células bacterianas em camadas, fortemente unidas na matriz extracelular. A associação dos organismos em

biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (CORNELLIS et al., 2008; MA et al., 2009).

A formação de biofilmes é frequente na superfície de próteses vasculares, articulares, cateteres, drenos, além de outros corpos estranhos utilizados na prática médica. Os biofilmes estão envolvidos na patogênese da placa bacteriana, endocardites e infecções pulmonares em portadores de bronquiectasia e mucoviscidose. Além da possibilidade de se organizar em biofilmes, outra característica importante da *P. aeruginosa* são as implicações epidemiológicas e fisiopatológicas (CORNELLIS et al., 2008; MA et al., 2009; FERREIRA e LALA, 2010).

Esta espécie assume importante papel como agente etiológico relacionado à ocorrência de infecções hospitalares. Na maioria dos casos, essas infecções têm início quando há alteração ou destruição de barreiras físicas entre as quais se evidenciam a utilização de cateteres urinário, tubo oro traqueal, procedimentos cirúrgicos, ventilação mecânica, pacientes queimados, em uso de drogas imunossupressoras e pacientes oncológicos (TORRES et al., 2006; FERNANDES et al., 2010). A importância clínica e a frequência dos bacilos Gram-negativos não fermentadores vêm aumentando com o crescente número de casos associados à infecção, em razão da gravidade da infecção, das altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados e do grande risco de resistência aos antimicrobianos (DEPLANO et al., 2005; TORRES et al., 2006).

Raramente a *P. aeruginosa* torna-se causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis. A baixa necessidade de nutrientes para seu desenvolvimento, sua tolerância a uma série de condições físicas adversas e sua resistência a agentes antimicrobianos contribuem para o sucesso ecológico e para o importante papel como

patógeno oportunista em ambientes hospitalares (CASTANHEIRA, 2005; FERREIRA e LALA, 2010). Nesta categoria estão enquadradas: otites externas, ceratites relacionadas à lente de contato e endocardites em usuários de drogas endovenosas (MORIYAMA e HOFLING-LIMA, 2008).

Em um relato de caso descrito por Eguchi (2013), um paciente com conjuntivite relacionada ao fio de sutura (biomaterial) contaminada por *P. aeruginosa*, teve a via de transmissão da infecção identificada pela técnica molecular de *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE). Os isolados bacterianos foram recuperados do meio ambiente domiciliar do paciente, sendo que este havia realizado cirurgia para glaucoma. Os biomateriais (fios de suturas, lentes intra-oculares, e lentes de contato) também podem servir como foco de infecções bacterianas e todo procedimento que envolve o uso de biomateriais requer cuidados e acompanhamento clínico.

Em dados epidemiológicos registrados em 2004, refere-se que a casuística do *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS) indica que a *P. aeruginosa* está entre os cinco principais patógenos associados aos casos de IRAS nos Estados Unidos (NNIS, 2004), constituindo-se ainda como a terceira causa de infecção mais comum do trato urinário, a quarta causa de infecção de sítio cirúrgico e o sétimo patógeno mais frequentemente isolado em corrente sanguínea (NNIS, 2004; CASTANHEIRA, 2005).

No entanto, dados do *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC (2013) confere ter aproximadamente 8% de ocorrência de todas as IRAS por *P. aeruginosa* e 13% das infecções graves por este patógeno são multirresistentes.

No Brasil, segundo dados do Programa SENTRY, programa conhecido por ser constituído de uma rede de laboratórios em todo o mundo, que monitora a prevalência dos padrões de sensibilidade / resistência antimicrobiana em bactérias que causam infecções tanto

hospitalar como comunitária. Nos registros deste programa, a *P. aeruginosa* foi à causa mais prevalente de infecções do trato respiratório, seguida das infecções urinárias e infecções de ferida cirúrgica, além do sexto patógeno de maior incidência em infecções da corrente sanguínea no período de 1997 a 2001 (SADER et al., 2001; GALES et al., 2003; PIRES et al., 2009). Em outro estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, foi demonstrado que existe alta prevalência de *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar, com 26% de isolados do total de amostras (n=701) originados principalmente de infecções respiratórias (PIRES et al., 2009).

Importante destacar que o sistema de vigilância *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) realiza monitoramento da sensibilidade bacteriana aos carbapenemas e outros antimicrobianos em hospitais. Dados obtidos por este sistema mostram que na Europa, a *P. aeruginosa* ficou como segundo agente mais isolado em Unidades de Terapia Intensiva e o primeiro em unidades para pacientes com fibrose cística (MENDES et al., 2007).

É frequente o isolamento de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenemas, com capacidade de produção da enzima metalo-beta-lactamases, fato comum a detecção destes mecanismos em diferentes hospitais brasileiros (GRAF et al., 2008; AL-MARJANI et al., 2010). Os carbapenemas são antimicrobianos de eleição para o tratamento de *P. aeruginosa*, embora o imipenem apresente 20% de resistência demonstrada em estudo observacional de ensaio clínico randomizado com revisão sistemática, que buscou identificar a incidência de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem em pacientes com quadro de pneumonia (ZIBERBERG et al., 2010).

3.2 MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

O aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos pode ser considerado como uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente, e o desenvolvimento de parte dos fármacos apresenta certa eficiência no combate às infecções bacterianas, o que revolucionou a terapia antimicrobiana no passado, ocasionando na época a redução da mortalidade causada por doenças de origem microbianas. Por outro lado, o uso descontrolado dos antimicrobianos na terapêutica, a pressão seletiva a diversos fármacos e a versatilidade adaptativa causada por diferentes fatores associados à escassez nutricional, vêm estimulando o desenvolvimento de espécies microbianas com expressão de diferentes mecanismos de resistência que contribuem para elevação das taxas de mortalidade nestas infecções. (ZAVASCKI et al., 2006; CLÍMACO, 2011).

Os carbapenêmicos (imipenem e meropenem), que são beta-lactâmicos de amplo espectro, derivados da tienamicina, apresentam ação bactericida no tratamento de infecções para a espécie *P. aeruginosa* e são considerados como antimicrobianos de primeira linha no tratamento de infecções por este patógeno. A resistência a essas drogas tem sido documentada de forma significativa em pacientes críticos, tornando-se um dos grandes desafios no manejo terapêutico das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) nas UTIs (ZIBERBERG et al., 2010; NEVES et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2012).

Os estudos voltados para investigação dos mecanismos de resistência bacteriana vêm apresentando notável avanço nos últimos anos, aprimorando cada vez mais o conhecimento da estrutura e da genética destes micro-organismos favorecida pelas ferramentas da Biologia molecular. Por definição, a resistência bacteriana pode ser descrita como um conjunto de mecanismos de adaptação da bactéria contra o efeito nocivo ou letal aos quais estas estão sendo submetidas. Considera-se ainda, resistência quando o micro-

organismo é capaz de crescer *in vitro* na presença de concentrações inibitórias que estas drogas atingem no sangue (TAVARES, 2001; CLÍMACO, 2011).

Fundamentalmente, a aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível sempre decorre de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente. (MENDES et al., 2006; GRAF et al., 2008). Dentre os principais mecanismos de resistência temos como destaque: a baixa permeabilidade da membrana; sistema de efluxo de múltiplas drogas, principalmente MexA-MexB-OprM; redução na absorção do antimicrobiano devido à perda de um canal para entrada da droga, em particular a porina OprD (*outer-membrane porin*); e a expressão de enzimas, como a AmpC, IMP e VIM, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas (GUTIÉRREZ et al., 2007; DIAS, 2009).

Considera-se que alguns antimicrobianos hidrofílicos que possuem menor peso molecular, como o imipenem, consegue difundir-se através de canais aquosos na membrana, formados por proteínas chamadas porinas. A ausência de porinas, que apresenta alta permeabilidade em *P. aeruginosa* confere resistência intrínseca a um grande grupo de antibióticos. Em especial, pode-se citar as porinas OprD, cuja ausência em algumas cepas, em consequência de uma mutação, dificulta a entrada do imipenem na célula. Esse fato eleva a Concentração Inibitória Mínima (CIM) na célula deste antimicrobiano conferindo resistência clínica de grande importância (TORRES et al., 2006; FERREIRA e LALA, 2010).

Outro mecanismo de resistência de natureza intrínseca importante, encontrado em linhagens de *P. aeruginosa*, é o conhecido sistema de efluxo. Essa bactéria apresenta genes estruturais de pelo menos 12 sistemas de efluxo. A ativação de um sistema eficiente, como o MexA-MexB-OprM, remove o antimicrobiano do interior da célula bacteriana, o que aumenta a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das penicilinas, cefalosporinas e quinolonas, sem

afetar a CIM do imipenem. Apesar de não alcançar resistência clínica, a CIM do meropenem é afetada por esta bomba de efluxo (NEVES et al., 2011).

Já a resistência adquirida resulta de uma alteração fisiológica ou na estrutura bacteriana, não sendo previsível e que pode ou não envolver alteração genética. Quando há alteração genética, estas podem ocorrer por mutação, transdução, transformação ou conjugação. Quando não há alteração genética pode ocorrer à indução de um fenótipo devido às condições do meio, que pode ser estável e permanecer mesmo que o fator de exposição seja retirado, ou ainda instável, desaparecendo juntamente com o fator de exposição (FERREIRA e LALA, 2010; NEVES et al., 2011).

Um importante grupo de antimicrobianos que agem interferindo na síntese da parede celular é o grupo dos β -lactâmicos, que constituem uma família de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico heterocíclico azetidiona denominado β -lactâmico. Este grupamento é o responsável pela atividade antimicrobiana deste grupo de antibióticos e seu rompimento em qualquer ponto resulta na perda completa da ação antibiótica da droga (TORRES et al., 2006; RODRIGUES, 2010).

No grupo dos β -lactâmicos estão classificadas as duas principais classes de antibióticos: as penicilinas (que podem ser naturais e sintéticas) e as cefalosporinas, que formam um grupo de antibióticos beta-lactâmicos relacionados com as penicilinas. Com o avanço da química e da farmacologia foi possível a descoberta de novos β -lactâmicos que vem sendo descritos na literatura, desses se destacam as cefamicinas e carbapenemas (DIAS, 2009; RODRIGUES, 2010).

Foi considerado até a década de 1960, dentre os antimicrobianos existentes, que a *P. aeruginosa* só se mostrava sensível à ação das polimixinas, sendo reconhecida por sua resistência natural às diferentes classes de antimicrobianos disponíveis. Posteriormente, com a

descoberta de novas substâncias antimicrobianas, verificou-se a sensibilidade desta bactéria a alguns aminoglicosídeos, tais como: amicacina, tobramicina, netilmicina e gentamicina, às carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, além de algumas cefalosporinas de terceira geração, sobretudo a ceftazidima; às cefalosporinas de quarta geração, às carbapenemas, ao aztreonam e às fluorquinolonas, especialmente o ciprofloxacina. No entanto, a versatilidade desse microorganismo em adquirir resistência, por diferentes fenômenos tornou a ação dos antimicrobianos obsoleta, como por exemplo, a carbenicilina. Nos últimos anos, a resistência desses patógenos aos antimicrobianos vem se acentuando em todos os países, particularmente no ambiente hospitalar, com registros de surtos de infecções por linhagens multiresistentes (TAVARES, 2001; PICÃO et al., 2012).

Nos últimos anos, observou-se um aumento no uso de cefalosporinas com intuito de tratar infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa*. Porém, isso vem sendo acompanhado por um aumento da prevalência de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases de espectro ampliado, conhecidas como ESBL. Linhagens produtoras destas enzimas são resistentes à cefalosporinas de amplo espectro e a outros antimicrobianos desta classe (VAHABOGLU et al., 2001).

O impacto da resistência é tido como grande preocupação nos hospitais brasileiros, sendo que os estudos multicêntricos vêm mostrando que a resistência aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas tem se elevado gradativamente nos últimos anos, como podemos observar na tabela 1. Estes resultados foram obtidos no estudo de Neves et al. (2011), que analisou dados amostrais da América Latina e do Brasil.

Tabela 1- Percentual de resistência de *P. aeruginosa* isolados na América Latina e Brasil.

Antibióticos	America Latina		Brasil		
	Resistência (%)		Resistência (%)		
	SENTRY (n=93)	MYSTICY (n=32)	Região Centro-Oeste (n=121)	Região Sudeste (81)	Região Sul (28)
Imipenem	30,2	36,6	58,3	38,3	82,7
Meropenem	25,6	33,9	50,0	30,4	-
Amicacina	30,5	33,8	57,6	35,6	78,7
Ceftazidima	34,3	36,0	48,7	36,5	90,7
Ciprofloxacina	41,3	48,3	59,5	43,0	93,7

Fonte: Neves et al. (2011).

3.2.1 Baixa permeabilidade da membrana externa

A membrana externa das bactérias Gram negativas está constituída por dupla membrana, formada por lipopolissacarídeos (LPS) lipoproteínas e fosfolipídios, com várias funções especializadas, e serve como barreira para certos antibióticos como a penicilina. A sua permeabilidade está associada à presença de proteínas nessa membrana, denominadas porinas, que estabelecem canais proteicos específicos, constituídos por subunidades que se agrupam formando poros que permitem a passagem de moléculas para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. As porinas restringem a entrada de muitas substâncias como à entrada de alguns fármacos (TORTORA, 2005; RODRIGUES, 2010).

A denominação mais comum para o termo porinas é “*Omp*”, o qual significa “*outer membrane protein*” que é um complexo de proteínas de membrana. As proteínas mais conhecidas da membrana externa de *P. aeruginosa* são classificadas como OprC, OprD, OprE, OprF, considera-se a última como a maior e em maior quantidade. OprF é uma proteína inespecífica com propriedade de realizar uma lenta difusão dos substratos pelo seu canal, o que explica a resistência intrínseca da bactéria a diferentes antimicrobianos (SOARES, 2005; RODRIGUES, 2010). A alteração na permeabilidade da membrana será responsável pela

resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina e pela resistência de *P. aeruginosa* ao trimetoprim. As bactérias utilizam esta estratégia na aquisição de resistência. Assim, uma alteração na porina específica da membrana celular externa de *P. aeruginosa*, pela qual o imipenem geralmente se difunde, pode excluir o antimicrobiano de seu alvo, tornando a *P. aeruginosa* resistente ao imipenem (DIAS, 2009).

Percebe-se que a perda de porina OprD resulta na resistência ao imipenem e em redução da sensibilidade ao meropenem sem modificar a resistência de outros β lactâmicos. Existe uma homologia da OprE com OprD, embora a primeira seja específica para a resistência de cefalosporinas (SOARES, 2005; RODRIGUES, 2010).

3.2.2 Sistema de efluxo em *P. aeruginosa*

O sistema de efluxo consiste no bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, sendo que esta retirada ativa de compostos tóxicos do interior da célula é parte de mecanismos utilizados pela bactéria para se proteger contra produtos adversos do ambiente em que vivem. Podem-se destacar os antimicrobianos como produtos tóxicos presentes na clínica, que por pressão seletiva contribuem para o aumento de expressão de resistência bacteriana aos antibióticos. Estes mecanismos são marcantes para os bacilos Gram negativos não fermentadores, sendo descritos em diferentes sistemas de efluxo para *P. aeruginosa* e caracterizados pela sigla MDR (do inglês, *multiple drugs resistance*) (SOARES, 2005; CLIMACO, 2011).

Os sistemas de efluxo são constituídos de proteínas únicas ou por um complexo de proteínas transmembranas. A classificação dos sistemas de efluxo é baseada em três características: a) a fonte de energia usada pelo sistema; b) a relação filogenética com outros sistemas de efluxo e c) a especificidade do substrato, sendo que estes podem ser agrupados em cinco famílias: ABC (*ATP binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), SMR

(*small multidrug resistance*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) e RND (*resistance-nodulation-division*) encontrados tanto entre as bactérias Gram positivos como entre as Gram negativos (XAVIER, 2008; CLIMACO, 2011).

O sequenciamento do genoma de *P. aeruginosa* permitiu a identificação de 12 sistemas de efluxo da família RND (*resistance-nodulation-division*) denominados Mex (*multidrug efflux pump*). Sete desses sistemas já foram caracterizados, a saber: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexGHI-OpmD, MexVW-OprM (POOLE, 2007; XAVIER, 2008).

O funcionamento deste sistema baseia-se na abertura de um canal que atravessa a membrana externa e interna, favorecendo a emissão da substância para o meio extracelular. Este canal é composto de três proteínas: a primeira conhecida como bomba propriamente dita, que depende de energia e está situada na membrana citoplasmática e tem como principal função o transporte, conhecidas como (MexB, MexD, MexF, MexY); a segunda proteína facilita a passagem da substância para a membrana externa e são (OprM, OprJ, OprN, OprB, OprG, OmpI) e uma terceira proteína, periplasmática, que realiza a função de ligação entre as duas outras proteínas (MexA, MexC, MexE, MexX, MexJ, MexGH) (SOARES, 2005; XAVIER, 2008).

Nas espécies de *P. aeruginosa* é comum encontrarmos a superfamília RND, formadas pelas três subunidades MexAB-OprM (Mex- proteína ligadora, MexB- bomba, OprM- canal de saída), nota-se que quando superexpressa, leva à resistência às penicilinas antipseudomonas (ticarcilina e piperacilina), as cefalosporinas, quinolonas e a sensibilidade reduzida ao meropenem. Já a MexXY-OprM (Mex- proteína ligadora, MexY- bomba e OprM - canal de saída) apresentam características diferentes da citada acima, por reduzir a sensibilidade aos aminoglicosídeos (CLIMACO, 2011).

3.2.3 Produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos

A inativação dos aminoglicosídeos constitui um dos principais mecanismos de resistência dos micro-organismos a estes antimicrobianos. São três os tipos de modificação enzimática possíveis de ocorrer:

- 1- Fosforilação dos grupamentos hidroxila (OH), tendo o ATP como doador de fosfato;
- 2- Acetilação dos grupamentos amina (NH₂), tendo a acetilcoenzima A como doadora de acetila;
- 3- Adenilação dos grupamentos hidroxila, tendo o ATP e outros nucleosídeos trifosfatos como doadores de adenila.

Algumas cepas de *P. aeruginosa* apresentam resistência por estes mecanismos. Os relatos na literatura vêm mostrando a resistência aos aminoglicosídeos (tobramicina, gentamicina) em diversas partes do mundo. São fármacos com múltiplos sítios de ataque para enzimas produzidas por estes patógenos, considera-se que quanto maior a pressão seletiva, mais frequente será detectada os bacilos Gram Negativos produtores desta enzima (SOARES, 2005; FERREIRA e LALA, 2010;).

3.2.4 Produção de betalactamases

As β -lactamases são enzimas capazes de conferir resistência aos carbapenens por hidrólise, particularmente à classe de β -lactâmicos, com maior espectro de atividade antibacteriana. Historicamente, em 1993 foi identificada a primeira ESBL da classe A de Ambler, caracterizada em uma amostra de *P. aeruginosa*, detectada em espécimes clínicos na Turquia. Em seguida foi detectada na Síria, Irã, Iraque, Leste Europeu, França, Bélgica e Itália a enzima PER-1. As enzimas dos tipos TEM e SHV, bastante comuns entre enterobactérias, foram identificadas em *P. aeruginosa* entre 1996 e 2002. Já em 1999 foi

observado que 93% das amostras de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima, isoladas em um hospital Tailandês, eram produtoras de ESBL denominada VEB-1 (PICÃO e GALES, 2007).

As β -lactamases de espectro restrito que hidrolisam preferencialmente oxacilina e cloxacilina são denominadas oxacilinasas (OXA) pertencentes à classe D de Ambler. Entre estas enzimas já descritas temos a OXA-4, -15, -17, -18, -31 e -32 que apresentam atividades contra cefalosporinas de amplo espectro (PICÃO; GALES, 2007). Em 2000, a enzima GES foi identificada em uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* isolada na França. O gene *blaGES-1* também foi identificado em amostras de *P. aeruginosa* isoladas na França e em Portugal e em 2001 foi encontrada uma nova variante de GES-1 e foi reportada em *P. aeruginosa* isolada na África do Sul a GES-2 que possuía uma única alteração de aminoácido quando comparada com a GES-1. No entanto, essa alteração ampliou o espectro de atividade da enzima, que passou a hidrolisar imipenem, além das cefalosporinas de amplo espectro (PICÃO e GALES, 2007).

A produção de metalo- β -lactamases (M β L) tem sido o mecanismo de resistência de grande impacto, e as linhagens produtoras desta enzima surgiram em consequência do uso frequente de carbapenêmicos, quando eram considerados os únicos antibióticos eficazes contra outras β -lactamases. Com relação aos primeiros isolados produtores de M β L, destacam-se o primeiro registro ocorrido no Japão em 1991 de *P. aeruginosa* produtora da enzima, a partir deste ano foram isoladas na Europa, na Ásia e na América passando a registrar ocorrências desta enzima em diferentes países. No Brasil, foram isoladas várias cepas produtoras de M β L, sendo que o gene prevalente no país é o *blaSPM-1*, isolado originalmente em São Paulo (MENDES et al., 2006; GRAF et al., 2008).

Apesar da maioria destas enzimas serem cromossômicas, a possibilidade de plasmídios ou integrons incorporarem a parte do DNA cromossômico, que contenha tais

genes de resistência, preocupa muito a comunidade científica, devido à grande chance destes plasmídios se disseminarem para bactérias de espécie distinta. (GALES et al., 2001).

Em se tratando de produção de β -lactamase cromossômica, com possível resistência induzível, será responsável pela resistência intrínseca destas bactérias (*P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.) aos b-lactâmicos, tais como as cefalosporinas e penicilinas, embora a resistência às cefalosporinas de espectro ampliado possa ter como principal mecanismo a hiperexpressão de betalactamase cromossômica associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa, e também pela hiperexpressão da bomba de efluxo (BUSH; JACOB MEDEIROS, 1995; SACHA et al., 2008; DRAWZ e BONOMO, 2010).

Quadro 3- Esquema de classificação das β -lactamases, baseado no estudo de Drawz e Bonomo, 2010.

Classe Ambler	Classe Bhus-Jacob Medeiros	Substrato	Inibidores de Clavulanato	Enzimas Representantes
A (serina β -lactamase)	(2a, 2b, 2c)	β -lactamase de amplo espectro: TEM-1, TEM-2, SHV-1	+	PC1 de <i>S.aureus</i>
	2b	Penicilina (Cefalosporinas de amplo espectro)	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Penicilina, Cefalosporinas de amplo espectro e Cefalosporinas de espectro estendido	+	SHV-2 para SHV-6, TEM-3 para TEM-26, CTX-72
	2br	Penicilinas	-	TEM-30, SHV-72
	2c	Penicilina, Carbenicilina	+	PSE-1
	2e	Cefalosporina de espectro estendido	+	FEC-1, Cep-A
	2f	Penicilina, Cefalosporina, Carbapenema	+-	KPC-2, SME-1, NMC-A
	2f	Penicilina, Cefalosporina, Carbapenema	+-	KPC-2, SME-1, NMC-A
B (metalo- β -lactamases)	3	Alguns β -lactâmicos incluindo carbapenem	-	IMP-1, VIM-1, CcrA e BcII (B1); CphA (B2); L1 (B3)
C (Cefalosporinas)	1	Cefalosporinas	-	AmpC, CMY-1, ACT-1
D (oxacilinase)	2d	Penicilinas, Cloxacilina	+-	OXA-1, OXA-10

Fonte: Bush & Jacob Medeiros (1995); Sacha et al. (2008); Drawz e Bonomo (2010)

No Quadro 3 é apresentada a classificação das enzimas β -lactamase, a qual pode ser dada por dois esquemas de classificação: a primeira pode ocorrer de acordo com a homologia dos aminoácidos, classificada por Ambler em classes A a D, e pelo perfil do substrato inibidor que são os grupos classificados por Bush-Jacob-Medeiros em 1 a 4. Nesta distribuição temos: as classes A, C e D serine β -lactamase, e a Classe B, a qual é denominada metalo β -lactamase (M β L) (BUSH, JACOB-MEDEIROS, 1995; SACHA et al., 2008; DRAWZ; BONOMO, 2010).

Estas enzimas serine β -lactamase da classe A, C e D, clivam a ligação amida do anel β -lactâmico inativando, assim, o antibiótico, enquanto que a classe B requer moléculas de íons Zn^{2+} para a sua atividade. As M β L catalisam a reação química idêntica (como enzimas serina), usando um ou dois cátions divalentes de Zn^{2+} (SACHA et al., 2008).

3.3 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (I.R.A.S.).

Estima-se que aproximadamente 720.000 pessoas adquirem IRAS nos hospitais brasileiros por ano, sendo que 20% deste total evoluem para óbito. Estas infecções podem estar associadas ao ambiente hospitalar e surgem durante seu confinamento, acometendo mais de 15% dos pacientes internados (BARROS et al., 2012).

Por definição, as IRAS compreendem aquelas adquiridas após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (Portaria nº 2616/1998, ANVISA/MS). O termo IRAS foi criado para reconhecer que tais agravos não ocorrem exclusivamente em situações de internação hospitalar, mas podem estar associadas ao contato do paciente com outras modalidades assistenciais, como atendimento ambulatorial, serviços de cuidados domiciliares, entre outros (STRATEVA et al., 2007; DALTOÉ, KUCHENBECKER e WAGNER 2008).

As mãos dos profissionais de saúde representam uma importante fonte de transmissão de infecção por *P. aeruginosa* no hospital, e é um dos mais valorizados e importantes aspectos de epidemiologia, por tratar-se de cadeia de transmissão de doenças. A literatura enfatiza o potencial disseminador de micro-organismos por contaminação através das mãos dos profissionais. Considerando a colonização preceder uma infecção, a fonte do micro-organismo e o modo de transmissão nem sempre são esclarecidos.

Observa-se que pacientes internados em instituições de saúde apresentam exposição a uma ampla variedade de agentes patogênicos, em particular na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Nestas unidades críticas são admitidos pacientes em estado grave que necessitam de monitoramento, intervenções terapêuticas, procedimentos médicos e de enfermagem de maneira contínua. Esses pacientes apresentam grande risco de adquirir infecção hospitalar em virtude da gravidade do quadro clínico (como no caso de doenças de base associadas) e do uso frequente de procedimentos invasivos. Entretanto, a UTI apresenta tecnologia aplicada à assistência hospitalar, que viabiliza o prolongamento da sobrevivência do paciente, em situações muito adversas. Apesar do grande avanço no manejo diagnóstico e terapêutico proporcionado pelos centros de tratamento intensivo, o aumento do risco de IRAS é um evento esperado durante a evolução dos pacientes críticos (MOURA et al., 2007; OLIVEIRA; KOVNER e SILVA, 2010; BARROS et al., 2012).

No Brasil, os índices de IRAS permanecem altos e com maior incidência nos hospitais universitários, quando comparado aos outros hospitais. Este aumento está atribuído a diversidade de doenças, os procedimentos de alta complexidade, o tempo de internação prolongado e grande fluxo de pessoas contribuem para infecção (BARROS et al., 2012).

Durante hospitalização, o recém-nascido (RN) fica exposto a diferentes procedimentos invasivos, favorecendo o desenvolvimento de infecções mais graves, elevando

as taxas de morbidade e mortalidade. Registros indicam que as taxas gerais de IRAS em UTI neonatal nos países desenvolvidos ficam em torno de 8,4 a 26%. No entanto, no Brasil, a UTI neonatal de nível terciário possui taxas de infecção em torno de 18,9 a 57,7%, considerando que as possíveis causas nas taxas elevadas de infecção podem estar relacionadas às condições de trabalho e estrutura física da UTI neonatal, além do número de profissionais distribuídos por leito, os quais muitas vezes não atendem a necessidade real de desinfecção do ambiente (PINHEIRO et al., 2009; RANGEL, SOUZA e OLIVEIRA 2012).

Entre os micro-organismos mais frequentemente associados às IRAS nos pacientes internados em UTI estão os Cocos Gram positivos seguido dos bacilos Gram negativos. No entanto, tem sido observado frequentemente o aumento na prevalência dos bacilos Gram negativos não fermentadores, dentre os quais podemos citar a *P. aeruginosa* sendo comum em relatos de eventos de resistência aos antibióticos e em surtos de infecção (OLIVEIRA et al., 2009; BARROS et al., 2012).

A espécie *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez por Gessard em 1882 a partir de pus esverdeado, denominada *Bacillus pyocyaneus* (PIER e RAMPHAL, 2010). Posteriormente, a espécie foi recuperada em uma variedade de infecções humanas de seps neonatal, sepsis graves, infecções pulmonares agudas e crônicas. É importante ressaltar que a *P. aeruginosa* está entre os agentes mais comuns em infecções, como a urinária (35 a 45%), ferida cirúrgicas e pneumonia com ventilação mecânica (10 a 25%) (PAVIANI et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2007).

Em estudos do programa SENTRY a *P. aeruginosa* corresponde ao quinto agente mais frequente responsável por bacteremias (GRAF et al., 2008; FERREIRA e LALA, 2010). Complementando os dados, Fernandes et al. (2010), destacam este micro-organismo como a principal causa de óbito em pacientes oncológicos, considerado como o quarto agente mais

isolado em infecções de corrente sanguínea no Instituto de Oncologia Pediátrica em São Paulo.

Os serviços de UTI, neonatologia e clínica cirúrgica são ambientes que apresentam fluxo intenso de antibióticos, e representam um *habitat* favorável, que alberga bactérias com grande possibilidade de se tornarem resistentes às drogas padronizadas pelo hospital. Alguns fatores contribuem para a seleção de linhagens Multirresistente (MR) e extra resistentes (XP), que são atribuídos a imunodepressão do pacientes, pacientes queimados, procedimentos invasivos, mecanismos de ação das drogas e o nível do antibiótico que atinge a população bacteriana (GUTIÉRREZ et al., 2007; BURJANADZE et al., 2007; PICOLI, 2008; MAGIORAKOS et al., 2011; CLIMACO, 2011).

A classificação de linhagens de *P. aeruginosa* como multirresistentes e panrresistentes é definida como segue (CLIMACO, 2011; MAGIORAKOS et al., 2011):

i) Multirresistentes (MR): Define-se como MR a ocorrência de resistência a pelo menos três antimicrobianos de diferentes classes como: carbapenema (imipenem, meropenem), cefalosporinas anti-pseudomonas (ceftazidima e cefepime), fluoroquinolona (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina), e b-lactâmicos com inibidor (piperacilina-tazobactam).

ii) Extra-resistentes (XP) ou Panrresistentes: são as linhagens resistentes a todas as classes acima citadas, inclusive aos monobactâmicos e Polimixina B.

A literatura revela que os fatores de risco usualmente implicados nas infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* envolvem geralmente o uso de ventilação mecânica na insuficiência respiratória, disfunção neurológica associada à presença de traqueostomia, doença de base, nos extremos de idade, uso de procedimentos invasivos e antibioticoterapia no hospital, além do próprio ambiente da UTI que favorece a seleção natural de micro-

organismos (LISBOA et al., 2007; BARROS et al., 2012; OLIVEIRA, KOVNER E SILVA, 2010).

Oliveira, Kovner e Silva (2010) ao analisarem 146 isolados bacterianos com 8,9% de *P. aeruginosa*, constataram que os dados obtidos foram de acordo com a literatura, este obteve uma taxa de 20,3% de IRAS com média de permanência hospitalar de 19,3 dias, com taxa de letalidade de 39,5% relacionando os resultados com os fatores de risco para aquisição de infecção hospitalar.

Em estudo realizado na Suécia com pacientes internados num tempo acima de 48 horas de hospitalização, dos quais 196 pacientes desenvolveram um total de 364 episódios de infecção hospitalar, após uma mediana de 8 a 10 dias de internação, em que se teve prolongamento de permanência no hospital por 8 a 9 dias, dobrando o risco de óbito. Observaram-se neste estudo como principais fatores de risco de infecção: i) o sítio cirúrgico; ii) a pneumonia; iii) infecção de corrente sanguínea e iv) infecção do trato urinário (APPLEGREN et al., 2001).

Em análise de regressão múltipla, as principais variáveis para infecção foram: i) cateter venoso central; ii) ventilação mecânica; iii) dreno pleural e iv) trauma com fratura exposta, este último aumentando o risco superior a duas vezes, principalmente devido o sítio cirúrgico. Os autores concluíram que os pacientes poli-traumatizados com fratura exposta representaram o maior risco de infecção em UTI a despeito do baixo índice de gravidade (APPLEGREN et al., 2001).

3.4 METALO-B-LACTAMASE (M β L) MÓVEIS OU ADQUIRIDAS.

São β -lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby. As metalo- β -lactamase são enzimas que hidrolizam todos os β -lactâmicos comercialmente disponíveis. Estas apresentam a mesma estrutura tridimensional (*abba*) e

necessitam dos dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica. Adicionalmente, estas enzimas são inibidas *in vitro* por Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e compostos derivados do ácido tiolático (ex: ácido mercaptopropiônico) e não são inibidos por inibidores de serino β -lactamases disponíveis comercialmente, tais como: o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (SANTOS FILHO et al., 2002; MENDES et al., 2006; PICOLI, 2008; SACHA et al., 2008).

Os novos genes que codificam as M β LS foram encontrados inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene, e com isso estas enzimas passaram a ser conhecidas como M β LS móveis ou M β LS adquiridas. Atualmente, elas são identificadas em seis subclasses de M β LS adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) codificada pelo gene *blaSPM-1*, GIM (German imipenemase), SIM, e mais recentemente a NDM. A primeira M β L descrita foi a IMP-1, detectada inicialmente em uma amostra de *Serratia marcescens* isolada no Japão, com característica fenotípica de resistência a imipenem e cefalosporinas de espectro ampliado (OSANO et al., 1994). As enzimas do tipo VIM apresentam menos de 40% de homologia nas sequências de aminoácidos quando comparadas àquelas do tipo IMP. A primeira variante VIM-1 foi descrita em 1999 a partir de uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na Itália em 1997. A M β LS GIM-1 foi detectada posteriormente em *P. aeruginosa*, e o gene que codifica *blaGIM-1* foi descrito por Castanheira et al., (2004) em cinco amostras de *P. aeruginosa* de diferentes pacientes em um mesmo centro médico na Alemanha (LAURENTTI et al., 1999; GALES et al., 2001; CASTANHEIRA et al., 2004; SACHA et al., 2008).

As metalo- β -lactamases adquiridas são codificadas por genes localizados tanto no cromossomo quanto no plasmídio bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, as demais M β LS adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons (SANTOS

FILHO et al., 2002; MENDES et al., 2004; GARZA-RAMOS et al., 2008; SACHA et al., 2008).

Os *integrons de classe 1* são elementos genéticos constituídos de uma região conservada 5' (5'-CS) formada por um gene *intl1*, em uma região promotora e um sítio de recombinação *attI1* e uma região conservada 3'(3'- CS). Essa última região é geralmente composta do gene *qacEAI* conjugado ao gene *sull*, sendo que esses genes codificam resistência a compostos quaternários e sulfonamidas (MENDES et al., 2006; SASHA et al., 2008).

A presença de betalactamases plasmídicas em *P. aeruginosa* são menos frequentes que em enterobactérias, porém as mais habituais são aquelas conhecidas pela *Pseudomonas Specific Enzyme* (PSE), e em menor frequência, as betalactamases do tipo TEM e OXA (MEDEIROS, 2008).

3.4.1 Aspectos epidemiológicos das MβL

As metalo-β-lactamases estão mundialmente distribuídas e a ocorrência desta enzima tem mediado resistência em diferentes patógenos, além de ter sido responsável pela ocorrência de vários surtos hospitalares em diferentes partes no mundo. Nestes, e em outros casos, pode-se destacar a relevância dos estudos epidemiológicos nos hospitais e investigações dos mecanismos de resistência bacteriana (FURTADO et al., 2006; SACHA et al., 2008; PICÃO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010).

Na década de 90 as MβLs não apresentavam tanta importância na clínica, porque eram produzidas em cromossomo por alguns micro-organismos de pouca importância clínica e que estavam associados com infecções oportunistas. No entanto, a partir da descoberta da resistência mediada por enzima, transferida por elementos genéticos móveis, passamos a ter uma mudança no quadro. Os mecanismos pelos quais as bactérias adquirem resistência são

muito diversificados (PICOLI, 2008). A partir desta década, novos genes que codificam a M β L estão sendo descritos em micro-organismos patogênicos de importância clínica, tais como: *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae*.

A ocorrência desta variante (IMP-1) se deu por longo período de forma restrita no Japão, em consequência da disseminação, atualmente, a IMP-1 vem sendo detectada em diferentes linhagens bacterianas, tais como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. *Klebsiella pneumoniae*, recuperadas em diferentes localizações geográficas (KOH et al., 1999; GALES et al., 2003; MENDES et al., 2006; GASPARETO et al., 2007; SACHA et al., 2008).

No Brasil, tem sido cada vez mais frequente o isolamento de linhagens de *P. aeruginosa* MR produtoras de metalo- β -lactamases em infecções hospitalares, com características peculiares de resistência aos carbapênicos, sendo que a variante IMP foi descrita em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemas e ceftazidima, originados de pacientes internados em três hospitais de Porto Alegre e foi confirmada a identificação do gene *bla* IMP-1 (GASPARETO et al., 2007). Em outro estudo realizado por Martins et al. (2007) observou-se o isolamento de 33 amostras de *P. aeruginosa* produtora de M β L, destes, cinco apresentaram o gene IMP-1 e três destas foram sensíveis ao imipenem. Em janeiro de 2002 foi publicado pelo Programa SENTRY cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenemas com perfil genotípico da variante IMP-16 em paciente internado num hospital em Brasília (MENDES et al., 2004).

Em Santa Catarina foi isolada uma amostra de *P. aeruginosa* produtora de M β L variante IMP-16 com perfil fenotípico de resistência aos carbapênicos, e sensível a polimixina B. O estudo incluiu 29 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemas recuperados de pacientes internados no Hospital Universitário de Florianópolis (SCHEFFER et al., 2010).

Já em Goiânia, em um hospital privado, foram analisadas 75 amostras de *P. aeruginosa*. Destas amostras foram confirmados genotipicamente 26 (74,3%) isolados produtores de M β L blaSPM-1, 9 (25,7%) com fenótipo positivo para M β L e não foram detectados nem um dos genes investigados. A detecção de genes de resistência em isolados clínicos e a avaliação de seu perfil de sensibilidade fornecem dados importantes para a racionalização da terapia antimicrobiana e redução da taxa de mortalidade (GONÇALVES et al., 2009).

A subclasse VIM (Verona imipenemase), foi a segunda subclasse descrita, com seu primeiro relato registrado em 1999, recuperadas de amostras de *P. aeruginosa* isoladas na Itália (LAURETTI et al., 1999), sendo que no Brasil foi recuperada com uma frequência menor. (GRAF et al., 2008). Cerca de 37 isolados de *P. aeruginosa* recuperadas de amostras clínicas num hospital em São Paulo foram estudadas por técnica de PCR, obtendo (55,6%) blaSPM-1 (30,6%) produtora de blaVIM e (8,3%) produtora de blaIMP-1.

A literatura tem destacado que no Brasil, a *P. aeruginosa* portadora do gene blaSPM-1 está cada vez mais disseminada, considerando-se que a taxa de isolados produtores de M β Ls tem sido variável por região, já identificado em Brasília/DF, São Paulo/SP, Rio de Janeiro/RJ, Goiânia/GO, Uberlândia/MG, Florianópolis/SC, Rio Grande do Sul/RS, Recife/PE, Bahia/BA, Fortaleza/CE e Maranhão/MA. Estes foram estudos realizados em hospitais universitários em sua maioria que detectaram por método do PCR a genotipagem das cepas e confirmando a produção de M β L com gene blaSPM-1 (PELLEGRINO et al., 2002; SADER et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005; MARTINS et al., 2007; GRAF et al., 2008; GONÇALVES et al., 2009; PICÃO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010; FERNANDES et al., 2010).

As novas variantes da enzima caracterizadas foram: *German imipenemase* (GIM-1), da classe B de Ambler em isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao carbapenemas resistente, recuperados de isolados clínicos de pacientes na Alemanha. Outra variante detectada em 2005, foi isolada em sete amostras de *A. baumannii* na Coreia, predominando a *Seoul imipenemase* (SIM-1), e a variante *Australian imipenemase* (AIM) detectada em 2007 na Austrália. Em seguida foi relatada uma nova MβL a *Kyorin health science metallo-beta-lactamase* (KMH), em isolado clínico de *Citrobacter freundii* identificado no Japão. *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM-1) detectada em *K. pneumoniae* isolada de paciente sueco com cepa de origem indiana. O paciente viajou para Nova Delhi, na Índia, e adquiriu uma infecção urinária por este patógeno (CASTANHEIRA et al., 2004; LEE et al., 2005; YOUNG et al., 2007; SEKIGUCHI et al., 2008; YONG et al., 2009).

Além destas, mais duas outras foram identificadas como novas metalo-beta-lactamases a *Dutch imipenemase* (DIM-1), isolada de *Pseudomonas stutzeri*, e a variante *Tripoli MβL* (TMB-1). Uma linhagem de *Achromobacter xylosoxidans* isolada do ambiente de um hospital central em Tripoli (Líbia) produziu uma única metalo-β-lactamase (POIREL et al., 2009, EL SALABI et al., 2009).

Na figura 2, é demonstrado o panorama MβL distribuídas em todo o mundo, e a figura 3 a distribuição da variante SPM-1 no Brasil.

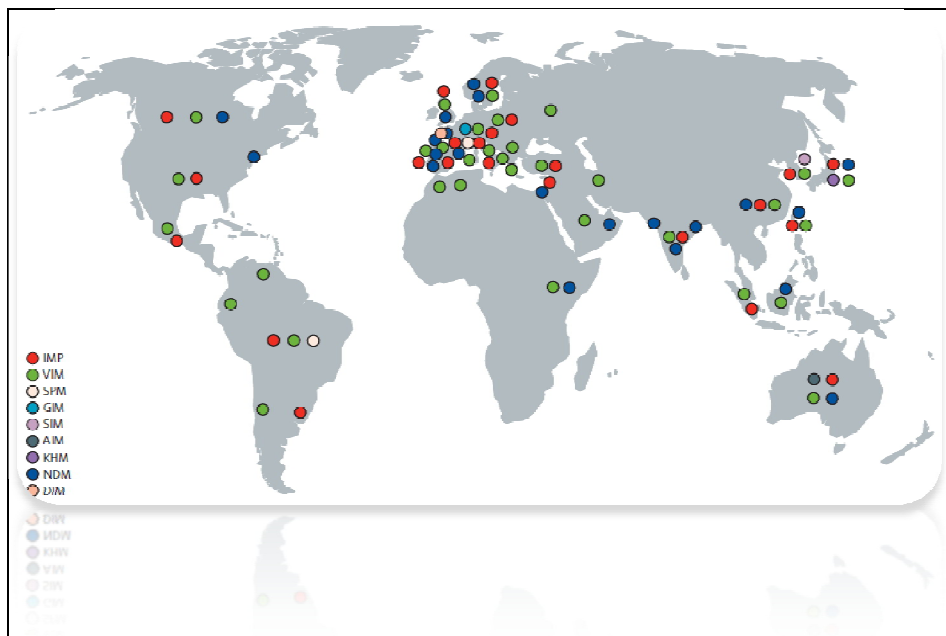


Figura 2 - Disseminação global dos diferentes tipos de Metallo - β - lactamases.

Legenda: IMP (imipenemase) VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metallo- β -lactamase), GIM (German imipenemase), SIM-1 (Soul imipenemase), AIM (Australian imipenemase), NDM (Nova deli metallo- β - lactamase), KHM (Kyorin hospital metallo- β -lactamase) e DIM (Duth imipenemase).

Fonte: Cornaglia et al (2011).

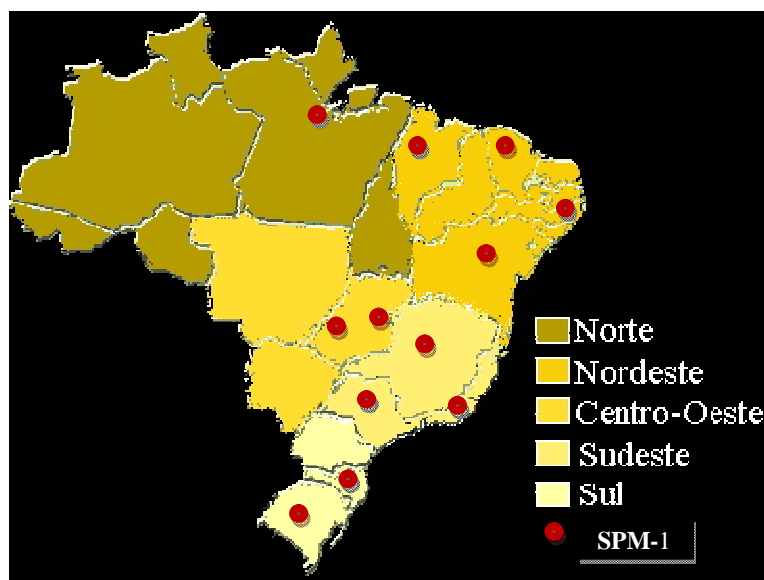


Figura 3 - Disseminação no Brasil de Metallo - β - lactamases blaSPM-1.

Fonte: <https://www.google.com.br/search?q=criar+mapa+com+regiões+do+brasil+by:experts&hl=ptBR&authuser=0&tbn=isch&imgil=awgaVF1zerFXnM%253A%253Bhttps%253A%252F%252Fencrypted>.

3.5 ANTIMICROBIANOS COM AÇÃO ANTI-PSEUDOMONAS.

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* são de maneira geral limitada e incluem as cefalosporinas de amplo espectro, o aztreonam, carbapenems e as fluoroquinolonas, particularmente a ciprofloxacina (CARMELI et al., 1999). Os aminoglicosídeos são frequentemente utilizados em regimes combinados aos β -lactâmicos na tentativa de potencializar a atividade antimicrobiana e de evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, sendo a monoterapia raramente utilizados.

3.5.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas são antibióticos β -lactâmicos com ação bactericida e classificadas em quatro classes - 1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração - de acordo com o seu espectro de atividade. São eficazes na presença de bactérias Gram negativos e Gram positivos, no entanto à medida que se avança nas diferentes gerações, o espectro para Gram negativos amplia-se (as cefalosporinas de 4^a geração são as mais activas) mas perde-se alguma actividade para os Gram positivos (TAVARES, 2006; GOODMAN & GILMAN'S, 2007).

Dentre as cefalosporinas em questão, ressaltamos a cefepima é uma cefalosporina de quarta geração, e como todas as cefalosporinas, são antibióticos β -lactâmicos, Tem um espectro mais amplo sobre Gram negativos que as restantes subclasses atuando ainda sobre *P. aeruginosa* e algumas *Enterobactereaceae* que são geralmente resistentes às cefalosporinas de 3^a geração. A principal vantagem em relação a toda a classe é apresentar elevada resistência à maioria das β -lactamases. Tem indicação terapêutica dirigida para o tratamento de infecções nosocomiais graves (TAVARES, 2006; ANVISA, 2007; GOODMAN & GILMAN'S, 2007).

Seu mecanismo de ação é similar aos das outras cefalosporinas, ou seja, inibe a síntese da parede bacteriana à qual se liga pela sua grande afinidade com as proteínas ligadoras de penicilina (TAVARES, 2006).

3.5.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas activos contra a maioria das bactérias aeróbias Gram - incluindo a espécie *P. aeruginosa*. Desta classe fazem parte os fármacos gentamicina, neomicina, amicacina, netilmicina e estreptomicina. Todos os aminoglicosídeos agem pelo mesmo mecanismo da ação, inibem a síntese de proteínas nas bactérias. O mecanismo de ação inicia-se com a ligação à parede celular, sendo depois transportado para o citoplasma por um processo dependente de gasto energético. No citoplasma liga-se a fração 30S do RNAr causando uma leitura errada da RNAm. Isto conduz a uma sequência errada de proteínas codificadas que ao serem incorporadas na membrana celular afetam a sua permeabilidade, conduzindo ao efluxo de moléculas e ions vitais para a bactéria (GOODMAN & GILMAN'S, 2007).

A resistência de algumas espécies é devida à existência de enzimas que inactivam o antibiótico. Existem mais de nove tipos não relacionados, que acetilam, fosforilam ou adelinam os aminoglicosídeos. Os genes que codificam essas enzimas são espalhados de bactérias resistentes para bactérias ainda susceptíveis através da recombinação sexual bacteriana, com troca de plasmídeos ou transposição de DNA (GOODMAN & GILMAN'S, 2007)

A gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos extraído de culturas de fungos do género *Micromonospora*, com ação sobre *P. aeruginosa* ou *S. marcescens*, no tratamento de infecções urinárias e do trato respiratório.

A amicacina é um aminoglicosídeo semi-sintético, derivado da canamicina, tendo maior atuação sobre bactérias Gram-negativos, além de ser bactericida. A amicacina pode produzir oto e nefroxicidade (TAVARES, 2006; AMATO NETO, 2007).

3.5.3 Quinolonas

A sua actividade bactericida resulta da inibição do ADN girase ou topoisomerase II, enzima essencial à replicação e transcrição do DNA bacteriano. A inibição desta enzima impede o super-enrolamento do ADN, não ocorrendo a separação da cadeia de DNA, logo inibindo a transcrição e a síntese proteica. Apresenta um espectro de actividade que abrange muitos micro-organismos Gram positivo e Gram negativo incluindo *P. aeruginosa* e *E.coli*. Apresenta pouca ou nenhuma ação sobre *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina e anaeróbios (GOODMAN & GILMAN'S, 2007, ANVISA, 2007).

A ciprofloxacina é o principal representante desta classe e a que apresenta maior actividade contra *P. aeruginosa*. Está indicada no tratamento de infecções do tracto respiratório, urinário e genital. A norfloxacina está exclusivamente indicada no tratamento de infecções urinárias.

3.5.4 β -Lactâmicos + inibidores de β -Lactamases

Os β -lactâmicos são a classe de antimicrobianos mais prescritos em todo o mundo e possuem em comum na sua estrutura o anel β -lactâmico. Fazem parte deste grupo 4 grandes sub grupos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemas e Monobactas.

O mecanismo de ação interfere com a síntese do peptidoglicano que é responsável por manter a integridade da parede bacteriana. No caso das bactérias Gram negativo, o antibiótico deve conseguir penetrar através das porinas presentes na membrana externa da parede celular e ligar-se a receptores proteicos bacterianos designados por PBPs (Penicillin Binding Proteins) ou transpeptidase e conseguir inactivá-las. Desta forma impedem a etapa final na síntese da parede celular. Em bactérias Gram positivo o polímero de peptidoglicano

encontra-se mais à superfície da célula, permitindo que o antibiótico se ligue mais facilmente as PBP's (TAVARES, 2006; GOODMAN & GILMAN'S, 2007).

A piperacilina é uma penicilina semi-sintética de amplo espectro, ativa contra numerosas bactérias aeróbicas e anaeróbicas, Gram-positivos e Gram-negativos, exercendo sua atividade bactericida através da inibição da síntese da parede celular e dos septos. O tazobactam é um derivado sulfonado do ácido triazolil metil penicilâmico; potente inibidor de numerosas beta-lactamases, incluindo enzimas mediadas por plasmídeos e cromossomos, as quais produzem resistência às penicilinas e às cefalosporinas.

A presença do tazobactam nessa associação medicamentosa aumenta o espectro antibiótico da piperacilina passando a cobrir muitas bactérias produtoras de beta-lactamases normalmente resistentes a ela e a outros antibióticos beta-lactâmicos. A piperacilina + tazobactam tem uma elevada atividade tanto contra micro-organismos piperacilina-sensíveis quanto contra aqueles piperacilina-resistentes. Estes micro-organismos são bactérias Gram-negativas fermentadoras e não fermentadores da glicose (TAVARES, 2006; AMATO NETO, 2007).

A piperacilina + tazobactam atua sinergicamente com os aminoglicosídeos contra certas cepas de *P. aeruginosa* e o tratamento combinado mostrou ser eficaz, especialmente em pacientes com as defesas diminuídas. Ambos os fármacos devem ser usados em suas doses terapêuticas máximas, e após conhecer os resultados da cultura e das provas de sensibilidade, ajustar o tratamento antimicrobiano (TAVARES, 2006).

3.5.5 Carbapenemas

Os carbapenemas são antibióticos β -lactâmicos que tem como característica uma estrutura química composta de duas cadeias unidas representadas por um anel pentacíclico não-saturado, de conformação variável, ligado ao anel β -lactâmico. São produzidos por

diferentes espécies de *Streptomyces*, sendo hoje disponíveis comercialmente o imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem, cujo protótipo é a tienamicina (DRAWZ & BONOMO, 2010).

São uma classe de uso reservado para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias resistentes aos demais β -lactâmicos, como as enterobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores representados pela *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Mantendo estabilidade à hidrólise pela maioria das β -lactamases incluindo as β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) (SADER et al., 2001; TAVARES, 2006; DRAWZ; BONOMO, 2010).

O Imipenem é um antibiótico β -lactâmico sintético, introduzido em 1979, o qual consiste na N-formimidoil-tienamicina, uma amida cristalina derivada da tienamicina, que se mantém estável em soluções e em estado sólido. Este antimicrobiano apresenta propriedades antimicrobianas exercendo ação bactericida sobre germes sensíveis, com atuação sobre a parede celular bacteriana em crescimento, provocando sua lise osmótica (TAVARES, 2006; DRAWZ; BONOMO, 2010).

O meropenem é um antibiótico da família carbapenems, partilhando com o imipenem a presença de um radical hidroxietil no carbono quatro, como diferença a presença de novas cadeias de carbono dois e três, as quais lhe conferem maior atividade contra bacilos gram-negativos e anaeróbios, apesar de apresentar o mesmo espectro de ação do imipenem (TAVARES, 2006; DRAWZ; BONOMO, 2010).

O emprego dos carbapenemas pode exercer pressão seletiva sobre os micro-organismos nosocomiais, possibilitando gerar aumento de resistência a eles devido à seleção de sub-populações menos sensíveis (PICOLI, 2008). Nos últimos anos, o isolamento de amostras de *P. aeruginosa* resistentes também aos carbapenems vem se tornando cada vez mais comum em todo o mundo (SADER et al., 2005; GRAF et al., 2008).

3.6 ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS MβL.

A ferramenta molecular para o diagnóstico laboratorial trouxe grandes avanços na compreensão da resistência bacteriana. Técnicas moleculares mostraram perspectivas totalmente novas, acerca da diversidade, distribuição, adaptação, filogenia de diferentes micro-organismos. Aspectos que não seriam possíveis de se observar utilizando os métodos tradicionais fenotípicos. Estas técnicas oferecem diferentes níveis de sensibilidade, resolução e se ajustam a diferentes objetivos de investigação e podem fornecer dados para uma base racional consistente útil para investigações epidemiológicas.

Nas investigações epidemiológicas em casos de surtos de infecção hospitalar, procura-se elucidar as fontes e vias de transmissão, para que o surto possa ser controlado. Os recursos laboratoriais disponíveis envolvem desde os métodos clássicos de tipagem bacteriana até as mais recentes técnicas de biologia molecular. A disponibilidade destes recursos é escassa ou inexistente em nosso meio, limitando a atuação dos microbiologistas. Muitas destas técnicas oferecem elevado grau de discriminação entre bactérias aparentemente iguais, permitindo um melhor conhecimento dos aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares.

Na área das doenças infecciosas, a detecção rápida de micro-organismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, passa a ser possível pela técnica de biologia molecular (MOLINA; TOBO, 2004). Dentre estas técnicas, destacam-se os perfis plasmidiais, análise de restrição da endonuclease e genômica de DNA plasmidial, hibridização do tipo *dot* ou *blot*, *Southern* e *Northern*, e hibridização *in situ*; técnica de amplificação de alvos-específicos como PCR, PCR competitiva, PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) e a PCR em tempo real; métodos de amplificação de sinal, como a *branched DNA* (bDNA); *tecnologia de arrays* e perfis de DNA cromossômico usando eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Todos estes métodos usam campos elétricos para separar fragmentos de DNA, cromossomos inteiros, plasmídeos em padrões únicos ou impressões digitais que são visualizados através da coloração com brometo de etídio ou por sonda de hibridização e ácidos nucléicos (MOLINA; TOBO, 2004). São técnicas escolhidas de acordo com o micro-organismo e o evento que se quer investigar, vêm sendo empregadas em epidemiologia molecular (SACHA et al., 2008; PICÃO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010).

Embora os testes fenotípicos de triagem para M β L sejam relativamente prático, ele não permitem definir especificamente qual a M β L envolvida no processo de resistência. O desenvolvimento de uma técnica molecular para a detecção de genes responsáveis pela produção de M β L utilizando a Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) tem tomado destaque em diversas publicações (GALES, 2003; SADER et al., 2006; SACHA et al., 2008; PICÃO et al., 2009; SCHEFFER et al., 2010).

Essa metodologia consiste no desenho de iniciadores (*primers*) que são sequências de oligonucleotídeos que hibridizam em regiões específicas do DNA molde, as quais são amplificadas pela enzima Taq polimerase, gerando um produto (amplicon) que é visualizado em gel de agarose que sofreu eletroforese. Esta técnica permite a detecção de genes codificadores específicos como: bla IMP-1, blaVIM-1, blaSPM-1, responsáveis pela produção da enzima M β L.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características epidemiológicas, de resistência, molecular e a letalidade por *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva em hospital de ensino de Belém/Pará.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os principais agentes causadores de IRAS em hospital de ensino de Belém (PA);
- b) Descrever os aspectos epidemiológicos das infecções por *P. aeruginosa* em pacientes internados na UTI de hospital de ensino de Belém (PA).
- c) Avaliar o desempenho do teste de sensibilidade para *P. aeruginosa* em sistema automatizado VITEK-2;
- d) Investigar a produção de metalo-beta-lactamase (MβL), em amostras resistentes à carbapenemas;
- e) Identificar a presença dos genes blaSPM-1, blaIMP-1 e blaVIM-1 nos isolados de *P. aeruginosa* recuperados de espécimes clínicos;
- f) Analisar a ocorrência de mortalidade associada à infecção por *P. aeruginosa* multirresistentes (MR), o impacto clínico da MR e presença do gene blaSPM.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPa), uma Fundação de Direito Público, vinculada à Secretaria Especial de Proteção Social (SEPROS). Possui 22.000 m² de área construída, distribuída horizontalmente em 395 leitos e realiza em média 1.500 internações/mês. Tem como missão promover assistência, ensino e pesquisa integrados, buscando atendimento ético, de qualidade e humanizados aos clientes. A FSCMPa é distribuída em Clínicas Médica, Tocoginecologia, Cirúrgica, Pediatria, UTI-Adulto, UTI-Neonatal, UTI Pediátrica com diferentes programas em desenvolvimento.

O número de leitos por UTI é de 10 leitos na UTI adulto e na UTI pediátrica e 50 leitos na UTI neonatal.

Esse hospital possui uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) organizada, dentro das normas legais vigentes, que realiza vigilância ativa no hospital e desenvolve políticas de controle de infecção, bem como educação continuada, em todas as áreas do hospital. É composta por médicos, enfermeiros, farmacêuticos, biomédicos especializados na área de controle de infecções.

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi composta de pacientes com infecção por *Pseudomonas aeruginosa* internados nas UTIs adulto, pediátrica e neonatal, de ambos os sexos. Para efeito de análise de amostragem os dados das UTIs pediátrica e neonatal foram aglutinados em uma só, denominado NeoPed.

Foram analisados 54 isolados de *P. aeruginosa* recuperados de diferentes espécimes clínicos no laboratório de bacteriologia do hospital, tais como: sangue, urina,

lavado bronco alveolar (LBA), secreção traqueal e ponta de cateter vascular central, coletado no período de janeiro de 2010 a março de 2012. O critério de inclusão no estudo foi considerado o fato de ser paciente de UTI com infecção por *P. aeruginosa* isolado em cultura microbiológica.

5.3 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo Coorte retrospectiva, em que a classificação inicial dos indivíduos foi feita pela presença ou ausência da multirresistência.

“EXPOSTOS” = pacientes com a infecção por *P. aeruginosa* MR (PaMR).

“NÃO EXPOSTOS” = pacientes com infecção por *P. aeruginosa* não MR (Pa não MR).

Para esta investigação foram coletados dados demográficos (sexo, idade), comorbidade, tempo de permanência na UTI, classificação do episódio de IRAS, uso de procedimentos invasivos, terapia antimicrobiana utilizada (adequada e inadequada) e desfecho do paciente (alta ou óbito), sendo que o tempo para desfecho foi considerado em dias, entre a data da internação na UTI e a alta ou óbito, Classificação de McCabe Jackson, APACHE II, Classificação de Charlson.

5.3.1 Critério de adequação da terapia antimicrobiana.

Foi considerada **adequada**, quando a bactéria em questão era sensível *in vitro* a pelo menos um dos antimicrobianos usados na terapia.

Nos casos em que o agente bacteriano isolado não foi sensível *in vitro*, a nenhum dos antimicrobianos empregados no tratamento do paciente, ou se, este não estivesse usando nenhum antibiótico, a terapêutica foi considerada **inadequada**.

5.3.2 Critérios epidemiológicos de IRAS padronizados pelo CDC.

Os episódios de infecção foram obtidos após avaliação da equipe e da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do hospital (CCIH), conforme registrado nas fichas de busca ativa e no prontuário do paciente. Estes dados foram baseados nos critérios epidemiológicos de IRAS padronizado pelo CDC (GARNER et al.,1988), que classifica as infecções como segue:

- i) Infecção do Trato Respiratório Inferior (ITR): Presença de manifestações clínicas relacionadas à infecção de vias aéreas inferiores, com ou sem alterações radiológicas.
- ii) Infecção do Trato Urinário (ITU): quando apresentam sinais e sintomas de infecção urinária associados à presença de leucocitúria no exame de urina tipo I e com urocultura com $>10^5$ UFC/mL com não mais de dois organismos.
- iii) Infecção de Corrente Sanguinea (ICS): quando o paciente apresenta uma ou mais hemocultura positiva. O paciente apresenta pelo menos, um dos sinais ou sintomas, a saber: febre (38°C), calafrios ou hipotensão.
- iv) Infecção de pele ou partes moles (IPPM): presença de sinais inflamatórios com secreção purulenta em pele ou planos profundos, com tecido muscular, não sendo necessária a documentação de agente por cultura.
- v) Infecção gastrointestinal (IGI): presença de quadro clínico compatível com infecção restrita ao trato gastrointestinal (por exemplo, diarreia com ou sem vômitos), com ou sem confirmação por coprocultura.

5.3.3 Classificação de McCabe Jackson

Os pacientes foram classificados segundo o critério utilizado por McCabe Jackson, com o objetivo de verificar a relação da gravidade da doença à admissão e a ocorrência da infecção hospitalar. Considerou-se a doença de base do paciente classificada como:

i) Doença rapidamente fatal: são classificadas como enfermidades de aparecimento abrupto e de rápida evolução, cujo prognóstico estimado em dias ou semanas, estão incluídas: leucemias agudas, leucemias crônicas em crise blástica, neoplasias em estágio avançado e doenças crônicas com descompensação aguda que acarretam o aumento da letalidade de forma imediata (miocardiopatias refratária, síndrome de hipertensão portal com manifestação hemorrágica grave).

ii) Doença potencialmente fatal: apresenta expectativa de vida maior, consideradas as anemias aplásticas, leucemias crônicas, insuficiência renal em tratamento dialítico, insuficiência hepática, pancreatopatias crônicas, doença pulmonar com hipercapnia ou hipoxemia basais em níveis considerados não críticos, hepatopatias crônicas com hipertensão portal e sem manifestação hemorrágica. Ou ainda, doenças que acarretam alterações na resposta imune, muitas vezes, relacionadas à terapia instituída (transplante renal, cardíaco, pulmonar ou de medula óssea, as doenças do colágeno, com terapia imunossupressora e as neoplasias em tratamento quimioterápico).

iii) Doenças de base não fatal ou ausência de doença de base: são os portadores de doença com prognóstico e sobrevida superiores aos anteriormente citados, cuja terapia empregada não foi associada à imunossupressão. Nesse grupo estão às neoplasias consideradas com cura clínica após tratamento cirúrgico, hipertensão arterial sistêmica (leve a moderada), diabetes mellitus descompensado, úlcera péptica, hipotireoidismo ou hipertireoidismo, doença

pulmonar obstrutiva crônica compensada, miocardiopatia com insuficiência cardíaca compensada.

5.3.4 Uso de dispositivos invasivos

Foi considerado como uso de dispositivo invasivo, o uso de cateter venoso central (CVC) de longa e curta permanência, sonda vesical de demora (SVD), ventilação mecânica (VM).

5.3.5 Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II -APACHE II

Sistema de pontuação de mortalidade estimada é um índice que pode ser calculado após admissão imediata do paciente no hospital, principalmente em unidade de terapia intensiva (UTI), e que levam em considerações variáveis fisiológicas, idade e doença crônica. É recomendado pelo Ministério da Saúde devido ao seu uso consagrado em pacientes adultos que precisam de cuidados intensivos (CHIAVONE, 2003).

Quadro 4- Sistema de pontuação de mortalidade estimada (APACHE II).

Escore (pontos)	Risco de mortalidade
0-4	aproximadamente 4%
5-9	aproximadamente 8%
10-14	aproximadamente 15%
15-19	aproximadamente 25%
20-24	aproximadamente 40%
25-29	aproximadamente 55%
30-34	aproximadamente 75%
> 34	aproximadamente 85%

Fonte: Chiavone (2003).

5.3.6 Escore de Chalson

É um método que emprega condições clínicas selecionadas, registradas como diagnóstico secundário – co-morbidades - no cálculo do risco de óbito. O índice calcula a

carga de morbidade do paciente, independentemente do diagnóstico principal. Para compor o Índice de Comorbidade de Chalon (ICC), foram definidas 17 condições clínicas. Para cada uma das condições clínicas, uma pontuação é estabelecida com base no risco relativo, com pesos variando de um a seis.

Quadro 5-Índice de Comorbidade de Chalon (ICC).

Escore (pontos)	Condições Clínicas
1	Infarto do miocárdio Insuficiência cardíaca congestiva Doença vascular periférica Doença cérebro-vascular Demência Doença pulmonar crônica Doença do tecido conjuntivo Úlcera Doença crônica do fígado
2	Diabetes sem complicações Hemiplegia ou paraplegia Doença renal severa ou moderada Diabete com complicação Tumor Leucemia Linfoma
3	Doença do fígado severa ou moderada
6	Tumor maligno, metástase AIDS

Fonte: Charlson (1987).

5.4 ESTUDO COMPARATIVO COM METANÁLISE:

Foi aplicada a metanálise dos estudos da mesma natureza, para avaliar a concordância do cenário desta investigação regional realizado em Belém do Pará, com os dados dos demais trabalhos selecionados. Na expectativa de maior certeza de que a infecção por PAMR, quando comparado com o outro tipo PA não MR, contribuem como um dos fatores determinantes para o óbito.

Foram analisados neste estudo, pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) por *P. aeruginosa*, no período de janeiro de 2010 a março de 2012 em hospital de ensino de Belém-Pará. O grupo de

“expostos” foi constituído por pacientes com infecção por PAMR produtoras ou não de M β L gene blaSPM-1 e os “não expostos” constituídos de pacientes com infecção por PA não MR.

Foi considerado como MR a ocorrência de resistência a pelo menos três antimicrobianos de diferentes classes como: carbapenema (imipenem, meropenem) cefalosporinas anti-pseudomonas (ceftazidima e cefepime), fluoroquinolona (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina), β -lactâmicos com inibidor (piperacilina-tazobactam).

Para este artigo foram analisados estudos originais, publicados em inglês e que apresentavam os termos utilizados para pesquisa: *P. aeruginosa* MR (*multiresistance*), gene blaSPM-1, mortalidade (*mortality*). Os estudos foram analisados com base nas normas de metanálise constantes no *Cochrane Handbook for Systematic Review of Intervention section*, editado por HIGGINS e GREEN, 2011. Os resumos foram examinados pelo autor e por mais um revisor. Foram consultadas as bases de dados PUBMED, MEDLINE, BIREME, EMBASE. Foram incluídos prioritariamente artigos publicados no período de 2006 a 2013.

Os dados extraídos dos artigos foram por número de pacientes com infecção por PAMR e não MR, número de óbitos respectivamente, número de cepas produtoras do gene blaSPM-1 e número de óbitos relacionados. Foram extraídos de cada estudo: autor, período do estudo, desenho do estudo, país, unidade de internação, população estudada, definições sobre óbito e sítio de infecção.

Nos casos em que não houve concordância entre os revisores, foram realizadas discussões específicas, até o consenso. Os revisores não estavam cegos para os autores, instituições e jornais de publicação. Não foram incluídos estudos não publicados ou de comunicação pessoal.

5.5 ISOLAMENTO BACTERIANO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.

Todo o material para realização de cultura bacteriológica foi processada no laboratório do hospital em sua rotina diária e eram registrados os resultados da cultura dos pacientes. Quando diagnosticado caso de infecção por *P. aeruginosa* nos pacientes de UTI, estas cepas eram separadas e semeadas em ágar nutriente (tubo de criopreservação com Ágar Nutriente), identificadas e armazenadas para posterior transporte ao Instituto Evandro Chagas - Laboratório de Bacteriologia, Micologia e Biologia Molecular (IEC/SVS/MS).

5.5.1 Teste de identificação bacteriana

Todas as amostras de *P. aeruginosa* isoladas foram semeadas em meios de Ágar Mac Conkey (Oxoid) e incubados por 24h/36°C. Após as 24h, quando foi preparado um esfregaço e submetido à coloração pelo método do Gram para observação de pureza do isolado.

Foi aplicada para a identificação bacteriana a metodologia automatizada através do sistema Vitek 2 (Vitek 2 software, version R02.03; Advanced Expert System [AES] software, version R02.00N [bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Foi usado neste estudo junto aos cartões ID-GNB e AST-N020 e AST-N239, os testes de identificação da espécie foi complementado com o teste da oxidase, ágar TSI não fermentação de glicose + sacarose + lactose, e posteriormente observação da produção de pigmento, comportamento oxidativo do meio Hugh- Leifson (OF) acrescido de 1% de glicose, reação de citocromo oxidase, para identificação fenotípica das bactérias.

5.5.2 Procedimento de estocagem das amostras

Foi realizado o sistema de preservação para o armazenamento em longo prazo das cepas de *P. aeruginosa* em ambiente e em baixa temperatura a -70°C. As colônias confirmadas de *P. aeruginosa* foram subcultivadas em Ágar Nutriente (Nutrient Agar

Difco™) com incubação na temperatura de 36°C/18 a 24 horas. Foram identificados os tubos de Ágar Luria (LB Ágar, Miller /Luria-Bertani), posteriormente foi semeada a amostra nova no tubo de ensaio com Agar Luria levemente inclinado para conservação em ambiente e incubado 18 às 24h/36°C e após as 24h de incubação, as amostras foram identificadas de acordo com o código do projeto para armazenagem na bacterioteca do IEC (WINN et al., 2008).

Dando continuidade, foram adicionados 10 mL de Caldo Luria com 20% de Glicerol (LB Broth, Miller/Luria-Bertanii) estéril no interior do tubo de Ágar Nutriente restante, com crescimento bacteriano, com o intuito de homogeneizar bem e transferir toda a suspensão bacteriana para um tubo estéril. Também foi preciso inocular assepticamente 0,5µl da suspensão bacteriana em dois tubos de *ependorff* identificado e com miçangas e um tubo de *ependoff* sem miçangas. Após esses procedimentos as amostras foram identificadas de acordo com as recomendações de identificação do laboratório, seguindo para a conservação em *freezer* a -70°C, figura 4 (WINN et al., 2008).

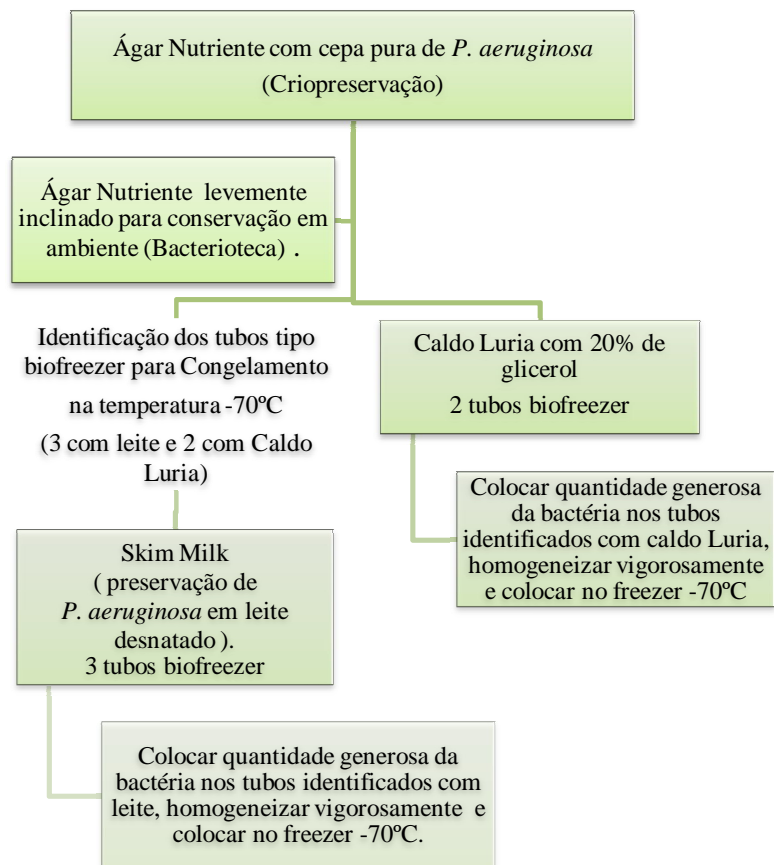


Figura 4- Fluxograma dos procedimentos laboratoriais utilizados para congelamento a -70°C das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.

5.6.1 Método automatizado – VITEK 2

Para a análise de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a metodologia automatizada Vitek-2, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Todas as amostras foram testadas para os seguintes antibióticos: Amicacina (AMI), Cefepima (CPM), Ceftazidima (CAZ), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (GN), Imipenem (IPM) e Piperacilina-tazobactam (PTZ) Meropenem (MER).

A polimixina foi testada realizando o método de difusão em ágar. Para o controle de qualidade dos testes foram utilizadas as cepas ATCC de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, cepas bacterianas gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da ALERTA - UNIFESP.

5.6.2 Método de Microdiluição em Caldo (Padrão Ouro)

Este método envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em microplacas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cônico. Cada poço deverá conter um total 0,2mL (0,1 mL caldo com antimicrobiano e 0,1 mL suspensão bacteriana). A maneira mais conveniente de preparar as placas de microdiluição é usar um dispositivo dispensador com diluições de antimicrobiano, com capacidade para 10mL de caldo. Essas diluições são usadas para dispensar 0,1mL ($\pm 0,02$) em cada um dos 96 poços da placa padrão. Cada placa deverá incluir um poço de controle positivo e um poço controle negativo.

5.6.2.1 Preparo da solução estoque do antibiótico.

Inicialmente deve-se preparar a solução estoque de antimicrobiano verificando a potência do sal da droga e calcular a quantidade de sal necessário de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Peso(mg)}: \frac{\text{volume(mL)} \times \text{Concentração Máxima do sal } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência do sal } (\mu\text{g/mL})}$$

Diluir 1mL da solução estoque do antimicrobiano (calculada para 2.560 $\mu\text{g/mL}$) em 9mL de caldo MH, dando um total de 10 mL desta solução. Este volume será utilizado para realizar as diluições seriadas de antimicrobiano. Em seguida distribuir a solução do antimicrobiano preparado, em placas de microdiluição em caldo, de acordo com as concentrações inibitórias mínimas da droga (ex: de 128 $\mu\text{g/mL}$ a 0,025 $\mu\text{g/mL}$).

5.6.2.2 Preparo da suspensão bacteriana.

Seleciona-se, de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico de cultura em placa de Agar nutriente. Toca-se o topo de cada colônia com uma alça, transferindo-se os micro-organismos para um tubo contendo 4-5mL de Caldo Mueller Hinton(MH) até alcançar a turbidez de uma solução padrão do tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8$) da escala de McFarland. Em seguida diluir 49,5 μ L dessa solução em 1.450,5 μ L de caldo MH (1:32- 5×10^6). Após este procedimento, diluir 1mL dessa ultima solução em 4mL de caldo MH (1:10- 10×10^5). Transferir 100 μ L dessa nova solução bacteriana para a placa de microdiluição, contendo 100 μ L da solução de antimicrobiano (diluição 1:2). A concentração final do inoculo na placa será de aproximadamente 5×10^5 e as concentrações do antimicrobiano diluídas pela metade (1x). Incubar as placas de microdiluição na estufa a 35°C por 18-24hs.

Após o período de incubação, realizar a leitura dos testes, verificando os poços dos controles positivos e negativos, a fim de verificar se houve crescimento bacteriano e se as placas não foram contaminadas, durante a inoculação das amostras. Considerar como CIM a diluição correspondente ao primeiro poço onde não houve crescimento bacteriano, ou seja, onde não houve turvação do meio de cultura.



Figura 5: Demonstração da microplaca para realização do teste a) materiais para realização do teste, b) microplaca com a droga e c) microplaca após 18-24hs de incubação – leitura e interpretação.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de antimicrobianos capaz de inibir o crescimento bacteriano. A CIM₅₀ e a CIM₉₀ foram definidas como as concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir o crescimento de 50% e 90%, respectivamente, dentre as amostras bacterianas testadas.

5.6.3 Critérios interpretativos de erros

Os valores da concordância geral e da concordância categórica foram calculados de acordo com Henry; Smith e Jones (1987). Foi considerada concordância geral (CA) quando as CIM obtidas eram concordantes pelas duas metodologias, e concordância categórica (EA) quando eram concordantes na mesma categoria, mesmo com CIM diferentes. A categorização de erros foi aplicada com as denominações erro muito grave (EMG): a mudança da categoria de resistente (R) pelo método referência para resultado sensível (S) na categoria testada (interpretação de falsa sensibilidade pela categoria testada); erro grave (EG): quando ocorre mudança da categoria sensível (S) pela metodologia referência para resistentes (R) na categoria testada (interpretação de falsa resistência pela metodologia testada) e erro leve (EL): quando houver relação com valores intermediários (reportar como sensível ou intermediário)^(3,16,17). As taxas de erro foram consideradas aceitáveis quando EMG for menor que 1,5%; EG menor que 3,0% e EL menor que 10,0%.

Como controles de qualidade dos testes foram utilizados as amostras da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.7 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES OU METALO-BETA-LACTAMASE (M β L).

Todas as amostras utilizadas no estudo foram submetidas ao teste de sinergismo com duplo disco, utilizando como inibidor para produção de M β L seguindo a metodologia do disco aproximação (ARAKAWA et al., 2000). Teve como inibidor de M β L o ácido o 2-mercaptotropiônico (MPA), que possui a propriedade de bloquear a ação da M β L partir do sequestro dos metais do meio.

Foram selecionadas cerca de três colônias aproximadamente para cada espécie em questão, para preparação de suspensão em caldo Mueller Hinton, considerando a turvação cerca de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Estas suspensões foram semeadas com o auxílio de um “*swab*” estéril em placas de “*Petri*” contendo o meio Mueller Hinton. Foram aplicados no meio um disco de Ceftazidima (CAZ), colocado na placa a uma distância de 2,0 mm, um disco de papel de filtro estéril (disco branco), ao qual foi adicionado 3 μ l de solução de 2-MPA e um disco de Imipenem (IPM), e posterior incubação das placas a 36°C por 18 - 24h, figura 6.

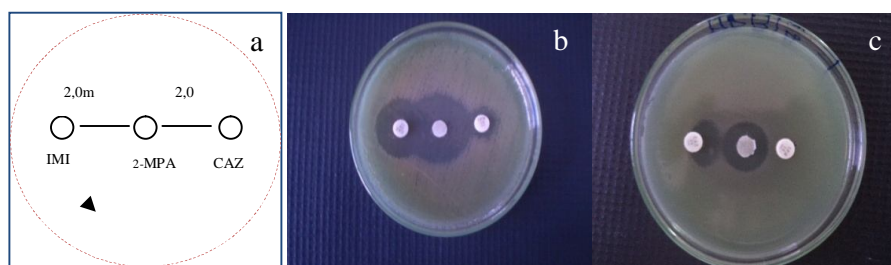


Figura 6 - Modelo esquemático do posicionamento do disco aproximação para detecção de M β L.

Legenda: a) representação esquemática do posicionamento dos discos b) M β Lactamase Negativa, c) M β Lactamase Positiva. Fonte: Arakawa et al., 2000.

Para o estudo da diversidade genética foram selecionadas as amostras sensíveis e resistentes. Dentre as amostras resistentes, aquelas produtoras de metalo-beta-lactamase, procedimento realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS).

5.8 DETECÇÃO MOLECULAR DOS GENES *blaSPM-1*, *blaIMP-1* e *blaVIM-1*.

Considerando a confirmação da produção de M β L como mecanismo de resistência aos carbapenêmicos foi realizado a pesquisa dos genes *blaIMP-1*, *blaSPM-1* e *blaVIM* codificadores desta enzima por reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) convencional ou multiplex. A sequência de oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos nas reações de PCR para detecção dos genes que codificam M β L (tabela 2), foram baseados nas regiões conservadas de cada gene, seguindo a sequência consenso determinada por Mendes et al. (2007). Após o isolamento da amostra bacteriana de cultura preferencialmente fresca (24 horas de incubação) em placas de Agar nutriente, suspenderam-se aproximadamente de três a cinco colônias bacterianas em 300 μ l de água Milli-Q estéril, e agitou-se vigorosamente em vórtex.

A extração do DNA foi realizada a partir de colônias bacterianas de 24 horas utilizando o método do fenol clorofórmio ou preparada diretamente a partir das colônias bacterianas.

O DNA extraído foi submetido à amplificação pela técnica de PCR utilizando a sequência dos *primers* para a pesquisa dos genes codificadores de M β L em isolados clínicos de *P. aeruginosa* utilizando os *primers* apresentados no Quadro 6, a seguir.

Quadro 6 - Relação de sequência dos oligonucleotídeos e amplicons obtidos nas reações de PCR, para a pesquisa dos genes codificadores de M β L em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	(pb)	Referência
<i>bla</i> IMP-F1	CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC	587	Gonçaves et al., (2009)
<i>bla</i> IMP-R1	GAACAACCAGTTTTGCCTTACC		
<i>bla</i> VIM-F1	TCTACATGACCGCGTCTGTC	920	Graft et al., (2008)
<i>bla</i> VIM-R1	TGTGCTTTGACAACGTTTCGC		
<i>bla</i> VIM-F2	ATGTTCAAACTTTTGAGTAGTAAAG	801	Graft et al., (2008)
<i>bla</i> VIM-R2	CTACTCAACGACTGAGCG		
<i>bla</i> SPM-F1	CCTACAATCTAACGGCGACC	650	Mendes et al., (2007)
<i>bla</i> SPM-R1	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC		
<i>bla</i> SPM-F1	CCTACAATCTAACGGCGACC	650	Gales et al., (2003)
<i>bla</i> SPM-R1	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC		

A reação de PCR teve na preparação mix (1x) 25 μ L com tampão da enzima (PCR Buffer 10X Quiagen) 3,0 μ L, MgCl₂ (25mM-Quiagen) 0,2 μ L, betaína 2,5 μ L, dNTP (5mM) 1,0 μ L, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (1,0 μ L) em reações isoladas contendo apenas um dos *primers* e 0,2 μ L da enzima Taq DNA polimerase (Hot StarTaq-Quiagen - 5U/mL), complementando com água de injeção. O programa utilizado para amplificação consistiu de: desnaturação a 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de baixa estrigência de 94°C por 1 minuto, 50,8°C por 1 minuto e 70°C por 1 minuto, com posterior extensão final a 72°C por 10 minutos em termociclador Bioneer (My Genie 96 Thermal Block).

Foram incluídas para controle de qualidade dos testes as ATCC *P. aeruginosa* produtora de SPM-1: 48-1997, *P. aeruginosa* VIM-1:75-3636C e *P. aeruginosa* IMP-1:19-A5386. Quando realizado PCR a diferenciação dos genes amplificados foi feita de acordo com o tamanho do amplicom, diferentes para cada gene que codifica M β L a ser detectado. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2,0% com 3,0 μ L de Sybr Safe DNA gel stain (*Invitrogen*) de brometo de etídio. Finalizando com a visualização em transiluminador de UV.

5.9 TIPAGEM MOLECULAR PELO DIVERSILAB.

Dos 54 isolados 44 foram submetidos à genotipagem por meio do Sistema automatizado DiversiLab (BioMérieux, Genebra, Suíça), dez amostras foram perdidas no descongelamento. Fundamentado na identificação e análise genética pelo método de rep-PCR, utilizando a presença de sequências repetitivas presentes no genoma bacteriano. A extração, amplificação e eletroforese capilar foram realizadas conforme recomendações do fabricante para posterior análise de dados.

Os isolados foram cultivados em agar Mc Conkey e incubadas durante 24 horas a 37°C. O DNA genômico foi extraído de uma alça de 10 µl de *P. aeruginosa* usando o kit UltraClean Microbial DNA (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado pelo software NanoDrop® 2100c (Thermo Scientific-EUA - Canadá) e a concentração utilizada foi entre 25ng/µl 50ng/µl para cada isolados. Após a extração, o DNA foi amplificado utilizando-se o kit DiversiLab (BioMérieux, Brasil), e AmpliTaq DNA-polimerase, com GeneAmp 10x PCR Buffer (Applied Biosystems, Brasil), seguindo as recomendações dos fabricantes. Os ciclos térmicos foram: a) desnaturação inicial a 94°C durante 120 segundos; b) 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; c) hibridação a 65°C durante 30 segundos; d) extensão a 70°C durante 90 segundos e e) extensão a 70°C para 180 segundos.

Os produtos de rep-PCR foram analisados utilizando o Sistema DiversiLab no qual, cada amostra apresenta um único *fingerprint* rep-PCR com múltiplas bandas de intensidade variável que são separados e detectados utilizando um LabChip em Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

A relação de semelhança entre os isolados foi realizada seguindo a sugestão do fabricante para espécies heterogêneos como "indistinguíveis", isolados considerados clones (sem diferença de bandas, percentual de similaridade geral > 97%); "semelhantes", isolados

epidemiologicamente relacionados (uma ou duas diferenças de bandas, porcentagem de semelhança, geralmente > 95%) e "diferente", isolados não relacionados (três ou mais faixas de diferença) (DiversiLab ® Análise Guia, 2009).

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análise bivariada: as variáveis categóricas foram comparadas por meio dos testes de Quiquadrado ou teste de Fisher e Mantel Haenszel e análise multivariada com Regressão Logística para avaliar o efeito isolado de cada um dos possíveis fatores de risco sobre a chance de ocorrer infecção por *P. aeruginosa* MR e não MR e consequentemente o óbito. Foram estimados *Odds Ratio* (Razão de Chances) e *Risk Ratio* (Risco Relativo), Intervalos de Confiança a 95% (IC 95%) e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os cálculos estatísticos foram aplicados através do programa Epi Info 7 e Biostat 5.0 (AYRES et al., 2007).

As análises estatísticas para o artigo da metanálise foram realizadas por meio do cálculo do *odds ratio*, com teste de Mantel-Haenszel e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para comparar os pacientes com infecção por PAMR com PA não MR. O Gráfico de floresta (*forestplot*) foi produzido pelo Review Manager 5.0.

5.11 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará em 30/05/2010 de nº CAAE. 0030.0.440.000-10 e protocolo nº 026/2010/CEP (Anexo A).

6 RESULTADOS

6.1 APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

O presente estudo descreve os principais agentes causadores de IRAS no hospital de ensino de Belém e são descritos no artigo 1 (seção 8.1), o qual descreve os dados retrospectivos de infecção no hospital no período de 2005 a 2010, traçando o perfil microbiano do período. O artigo mostra o isolamento de *P. aeruginosa* como segunda causa de infecção.

Em outra abordagem é descrito o perfil epidemiológico da população estudada, com suas características clínicas e análise molecular da *P. aeruginosa* recuperados de espécimes clínicos de pacientes internados em UTI, artigo 2 (seção 8.2).

Em abordagem mais diagnóstica é apresentado e discutido no artigo 3 (seção 8.3) o desempenho do teste de sensibilidade para *P. aeruginosa* em sistema automatizado VITEK-2. Foi realizada uma análise comparativa com o teste de referência baseado nas recomendações do CLSI (2012). Este artigo fundamenta a questão dos cuidados na realização de um teste de sensibilidade aos antimicrobianos para reduzir a margem de erro nos resultados dos testes.

Em seguida é discutida a ocorrência de mortalidade associada à infecção por *P. aeruginosa* multirresistentes (PaMR), de modo que o impacto clínico da MR e a presença do gene blaSPM-1 like é apresentado no artigo 4 (seção 8.4). Neste estudo é realizada uma metanálise com referência a multirresistência como fator de risco para o aumento da taxa de mortalidade.

7 ARTIGOS

7.1 ARTIGO 1 - PREVALÊNCIA DE AGENTES MICROBIANOS E SENSIBILIDADE DA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Prevalência de agentes microbianos e sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*¹.

Eliseth Costa Oliveira de MATOS², Núbia dos Santos MODESTO³, Wana Lailan Oliveira da COSTA⁴, Irna Carla do Rosário Souza CARNEIRO⁵, Karla Valéria Batista LIMA⁶

[Publicado na Revista Paraense de Medicina, v.28, p.35-43, abril/junho 2014](#)

RESUMO

Objetivo: descrever a ocorrência de agentes microbianos e avaliar o perfil de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de hospital sentinela em Belém, Pará, no período de 2005 a 2010. **Método:** abordagem retrospectiva e quantitativo-descritiva com dados oriundos da consulta das fichas dos pacientes, dos arquivos da comissão de controle de infecção hospitalar. **Resultados:** dentre os micro-organismos isolados obtive 40,8% de estafilococos coagulase negativo, 11,4% de *P. aeruginosa* e 7,4% de *Staphylococcus aureus*. A ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* foi maior na UTI adulto. A infecção respiratória foi predominante na UTI adulto e a infecção de corrente sanguínea predominante nas UTI pediátrica e neonatal. **Conclusões:** foram encontrados 49 grupos de micro-organismos na população estudada, sendo o *Staphylococcus* sp coagulase negativo, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* os mais predominantes. A *P. aeruginosa* apresentou elevada resistência aos antibióticos tradicionais. Os resultados obtidos neste trabalho destacam a importância de estudos epidemiológicos contínuos com a finalidade de se evitar a instalação de surtos.

DESCRITORES: *Pseudomonas aeruginosa*, Unidade de Terapia Intensiva, Infecção Nosocomial.

¹ Trabalho realizado na Fundação Santa Casa de Misericórdia, Belém, Pará.

² Biomédica Graduada pela Universidade Federal do Pará-UFPA, Mestre e Docente da Universidade do Estado do Pará-UEPA

³ Acadêmica do Curso de Enfermagem da Universidade do Estado do Pará-UEPA.

⁴ Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pará-UFPA.

⁵ Médica Infectologista Graduada pela Universidade Federal do Pará. Doutora e Docente da Universidade do Estado do Pará-UEPA e Universidade Federal do Pará-UFPA.

⁶ Farmacêutica Graduada pela Universidade Federal do Pará. Doutora e Docente da Universidade do Estado do Pará-UEPA.

INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam um considerável problema de saúde pública, o que eleva os custos do tratamento do paciente, aumenta o tempo de permanência do mesmo no hospital e como consequência gera aumento dos riscos de morbidade e de mortalidade para os indivíduos hospitalizados. A aquisição de IRAS está intimamente relacionada aos fatores de risco comumente descritos como o estado de saúde do paciente, realização de procedimentos invasivos e tempo de internação. Outro agravante para essas infecções é o crescente aumento de micro-organismos resistentes à terapia antimicrobiana dentro do ambiente hospitalar¹.

Estudos têm apontado os agentes bacterianos estafilococos coagulase negativo (SCN), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e espécies da família *Enterobacteriaceae* como os micro-organismos mais isolados em IRAS¹. A *P. aeruginosa*, componente da microbiota normal, é um bacilo Gram negativo não fermentador que possui requerimentos nutricionais mínimos e pode sobreviver a grande variedade de superfícies e ambientes aquosos. As taxas de colonização por *P. aeruginosa* aumentam naqueles pacientes hospitalizados por longos períodos de tempo e/ ou que estejam recebendo terapia antimicrobiana de amplo espectro ou terapia de combate à neoplasia.^{2, 3, 4}

A *P. aeruginosa* é resistente a antimicrobianos de diferentes classes estruturais, por mecanismos intrínsecos ou por aquisição de determinantes genéticos. A maioria das linhagens é

resistente à ampicilina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas de espectro-estendido (exceto ceftazidima e cefepima), tetraciclina, macrolídeos, rifamicinas, clorafenicol e trimetoprim-sulfametoxazol. O seu espectro de resistência ainda pode aumentar por alterações na permeabilidade da membrana, aumento da atividade da bomba de efluxo, alterações no sítio de interação ou degradação enzimática (ex. enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e lactamases).^{2,3,5} A diminuição da sensibilidade da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos tem sido discutida em âmbito mundial, ressaltando a mudança das respostas bacterianas aos carbapenêmicos e as cefalosporinas de terceira e quarta geração, as quais são as principais opções terapêuticas para o tratamento de infecção por esse agente.^{2,5}

OBJETIVO: Este estudo teve como objetivo descrever a ocorrência de agentes microbianos relacionados às infecções hospitalares e determinar o perfil de sensibilidade de *P. aeruginosa*.

MÉTODOS:

Este é um estudo transversal, que tem por base a análise de dados da assessoria da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), do Setor de Estatística e consulta aos prontuários dos pacientes da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPa). O estudo se deteve nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adulto, pediátrica e neonatal. Foram consideradas a taxa de densidade de incidência de infecção, casos confirmados de IRAS, identificação do agente e teste de sensibilidade.

A FSCMPa é uma fundação de direito público, vinculada à Secretaria Especial de Proteção Social, possui 22.000m² de área construída, distribuída horizontalmente com 370 leitos, portanto, trata-se de um hospital de nível terciário que realiza em média 1.500 internações/mês, distribuídas nas Clínicas Médica, Cirúrgica, Tocoginecologia, Pediatria, Neonatal, UTI neonatal, UTI Pediátrica, UTI Adulto e demais programas em desenvolvimento. A FSCMPa atende 100% dos pacientes oriundos do Sistema Único de Saúde (SUS) com referência na área Materno-Infantil.

Para este estudo foram considerados 1.240 casos de infecção cujos isolados foram recuperados de espécimes clínicos como: sangue, urina, lavado bronco alveolar (LBA), ponta de cateter vascular, e secreção traqueobrônquica, no período de 2005 a 2010, sendo que 142 isolados pertenciam à espécie *P. aeruginosa*.

A identificação bacteriana foi realizado a partir do uso do sistema Vitek 2 (Vitek 2 software, version R02.03; Advanced Expert System [AES] software, version R02.00N [bioMerieux, Marcy l'Etoile, France]). O mesmo foi utilizado junto aos cartões ID-GNB e AST-N020 compondo a identificação e teste de suscetibilidade antimicrobiana, respectivamente. Foi avaliada a suscetibilidade da *P. aeruginosa* a amicacina (AM), aztreonam (AZT), cefepima (CPM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GN), imipenem (IMP), meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PTZ), com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

As hemoculturas foram realizadas a partir do sistema de

detecção de fungos e bactérias Hemobac trifásico adulto e pediátrico, composto de caldo suplementado (TSB, Piridoxina, L-Cisteína, Extrato de Leveduras).

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), com a utilização dos testes do Qui-Quadrado, teste Exato de Fisher e teste G, considerando o valor de $p < 0,05$.

O desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia, CAAE 0086.0.440.000-10.

RESULTADOS

No período do estudo foram realizados 7.818 exames microbiológicos no laboratório de microbiologia da FSCMPa em amostras provenientes das UTI adulto, pediátrica e neonatal. Destes, 1.240 (15,8%) foram culturas positivas. Identificou-se 18 espécies de micro-organismos com 10 ou mais isolados encontrados e 31 espécies denominadas como “outros”, por apresentarem entre um e oito isolados durante o período estudado. Entre os patógenos identificados, destacaram-se os *Staphylococcus* sp coagulase negativo seguido por *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, o que caracterizou a microbiota circulante no hospital (tabelas 1 e 2).

A densidade de incidência no período de 2005 a 2010 por UTI é demonstrada na tabela 3. Na UTI adulto observa-se elevação da densidade de incidência, sugerindo situação epidêmica em 2008, no entanto na UTI pediátrica não houve variação no mesmo período. Ao avaliar o número de

ocorrências de infecções por *P. aeruginosa* nas UTI estudadas, é possível constatar que não houve variação significativa no número de casos de infecção no período. Observa-se que após a intensificação das atividades de vigilância, prevenção e controle realizadas pela CCIH do hospital, ocorreram períodos de redução de casos de infecção, como é possível observar na pediatria e na UTI adulto, o que justifica a necessidade de vigilância contínua desse patógeno nessas UTI, tabela 03.

As amostras clínicas de maior ocorrência foram sangue, urina e ponta de cateter vascular central, dados demonstrados na tabela 4.

No geral foram registradas 142 culturas positivas para *P. aeruginosa* nas unidades de terapia intensiva do hospital. A UTI adulto apresentou o maior número de infecções, contribuindo com 77 casos (54,2%), seguida da UTI neonatal e pediátrica com 37 (26,0%) e 28 (19,7%) casos respectivamente. Todas as 142 infecções estudadas foram confirmadas e relacionadas à infecção hospitalar.

Em relação aos espécimes clínicos estudados, houve predominância de infecção respiratória na UTI adulto e na UTI Neonatal e pediátrica a infecção de corrente sanguínea (tabela 5).

Neste trabalho foram observados valores elevados de resistência da *P. aeruginosa* à gentamicina, imipenem, meropenem, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, aztreonam e à piperacilina-tazobactam, dados observados na tabela 6.

Tabela 1: Prevalência de agentes associados as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde no período de 2005- 2010 na Unidade de Terapia Intensiva da FSCMPa.

Micro-organismos	Nº	%
<i>Staphylococcus</i> sp coagulase negativo	506	40,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	142	11,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	92	7,4
<i>Candida albicans</i>	53	4,3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	51	4,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	3,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	36	2,9
<i>Escherichia coli</i>	36	2,9
<i>Serratia marcescens</i>	30	2,4
<i>Candida tropicalis</i>	26	2,1
<i>Candida spp</i>	22	1,8
<i>Candida parapsilosis</i>	18	1,5
<i>Burkholderia cepacea</i>	15	1,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	1,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14	1,1
Bacilo Gram negativo	12	0,9
<i>Proteus mirabilis</i>	10	0,8
<i>Klebsiella spp</i>	10	0,8
Outros	113	9,1
	1240	

Legenda: FSCMPa, Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

Tabela 2: Distribuição percentual de micro-organismos no período de 2005 a 2010 na Unidade de Terapia Intensiva da FSCMPa.

ANO	NÚMERO DE CULTURAS POSITIVAS POR ANO													
	2005		2006		2007		2008		2009		2010		Total	
Micro-organismo	N	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	4	3,1	7	4,9	9	4,1	16	5,0	15	4,4	51	4,1
BGN*	3	3,3	9	7,0	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0,9
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	-	4	2,7	7	3,2	1	0,3	3	0,8	15	1,2
<i>Candida albicans</i>	-	-	7	5,5	7	4,8	13	5,9	18	5,6	8	2,3	53	4,2
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	1	0,6	4	1,8	7	2,1	6	1,7	18	1,4
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	1	0,7	3	2,0	4	1,8	7	2,1	11	3,2	26	2,1
<i>Candida spp</i>	-	-	-	-	5	3,4	1	0,4	5	1,5	11	3,2	22	1,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	7,6	1	0,7	2	1,3	-	-	-	-	5	1,4	15	1,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	5	2,3	14	4,3	17	4,9	36	2,9
<i>Escherichia coli</i>	4	4,3	11	8,6	13	9,0	-	-	-	-	8	2,3	36	2,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	5,4	7	5,5	1	0,6	-	-	-	-	1	0,2	14	1,1
<i>Klebsiella spp</i>	6	6,5	3	2,3	1	0,6	-	-	-	-	-	-	10	0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4,3	5	3,9	11	7,6	1	0,4	1	0,3	17	4,9	39	3,1
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	1	0,7	1	0,6	2	0,9	4	1,2	2	0,5	10	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	19,6	25	19,6	22	15,2	29	13,3	26	8,1	22	6,4	142	11,4
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	1	0,7	5	3,4	1	0,4	3	0,9	20	5,8	30	2,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	14,1	11	8,6	6	4,1	24	11,0	26	8,1	12	3,5	92	7,4
SCN**	27	29,3	32	25,2	30	20,8	89	41,0	172	53,9	156	45,7	506	40,8
Outros***	5	5,4	9	7,0	25	17,3	28	12,9	19	5,9	27	7,9	113	9,1
Total de culturas positivas	92		127		144		217		319		341		1240	

*BGN: Bacilo Gram negativo. **SCN: *Staphylococcus* sp coagulase negativo. ***Outros: 31 espécies denominadas como "outros", por apresentarem entre um e oito isolados durante todo o período estudado. FSCMPa, Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. Sinal convencional utilizado: - dado numérico igual a zero.

Tabela 3: Densidade de incidência de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde por *P. aeruginosa* no período de 2005 a 2010, na Unidade de Terapia Intensiva da FSCMPa.

ANO	NºUTI	%UTI	NºUTI	%UTI	NºUTI	%UTI	<i>p</i>
	ADULTO	ADULTO	PED	PED	NEO	NEO	
2005	13	2,2	3	16,7	2	3,2	0.0269
2006	8	20,8	8	53,7	9	14,4	0.4997
2007	10	27,9	4	33,8	8	12,5	0.1450
2008	19	77,2	1	7,5	9	13,1	0.1527
2009	14	38,5	5	44,2	7	6,0	0.2668
2010	15	42,6	5	40,9	2	2,1	0.2119

Legenda: NºUTI, Número na Unidade de tratamento intensiva. FSCMPa, Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. PED, pediátrica. NEO, neonatal

Tabela 4- Prevalência de *P. aeruginosa* nos diferentes espécimes clínicos período de 2005 a 2010 na unidade de terapia intensiva da FSCMPa.

MATERIAL BIOLÓGICO	Nº	%
Sangue	45	31,7
Urina	37	26,1
Ponta de Cateter Vascular Central	27	19,0
Lavado Bronco Alveolar	20	14,1
Aspirado traqueal	8	5,6
Outros	5	3,5
Total	142	100,0

Tabela 5- Distribuição percentual de espécimes clínicos com isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, por Unidade de Terapia Intensiva no período de 2005 a 2010, na FSCMPa

MATERIAL BIOLÓGICO	Adulto	%	Pediátrica	%	Neonatal	%
Secreção Traqueal e LBA	22	28,5	4	14,3	3	8,1
Sangue	17	22,1	11	39,3	16	43,3
Urina	19	24,7	8	28,6	11	29,7
Ponta de Cateter Vascular Central	18	23,4	4	14,2	6	16,2
Outros	1	1,3	1	3,6	1	2,7
Total	77	100,0	28	100,0	37	100,0

Legenda: FSCMPa, Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, LBA: Lavado broncoalveolar

Tabela 6 – Perfil de resistência de *P. aeruginosa* no período de 2005 a 2010 nas Unidade de tratamento intensivo da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

ANTIMICROBIAOS	NºS	%S	NºR	%R	Nº DE TESTADOS
Amicacina	53	38,4	85	61,6	138
Gentamicina	11	10,6	93	89,4	104
Imipenem	3	3,3	88	96,7	91
Meropenem	3	12,5	21	87,5	24
Cefepime	2	7,7	24	92,3	26
Ceftazidima	111	92,5	9	7,5	120
Ciprofloxacina	11	39,3	17	60,7	28
Levofloxacina	0	0,0	20	100,0	20
Aztreonam	21	29,2	51	70,8	72
Piperacilina/tazobactam	37	34,9	69	65,1	106

NºS: número de casos sensíveis, %S: porcentagem de sensibilidade, NºR: número de casos resistentes, %R: porcentagem de resistência,

DISCUSSÃO

O perfil de infecções da FSCMCPa faz referência ao cenário encontrado por outros autores que identificaram o *Staphylococcus* sp coagulase negativo como o micro-organismo mais isolado nas infecções em UTI, sendo constantemente relatado em bacteremias relacionadas ao cateter intravascular^{1,7}. Esse fato chama a atenção aos cuidados em procedimentos de inserção de cateteres, uma vez que a própria pele é a fonte mais comum deste micro-organismo. O segundo patógeno mais isolado foi a *P. aeruginosa*, a qual chamou a atenção por sua crescente resistência aos antimicrobianos.

A espécie *P. aeruginosa* pode ser encontrada na pele, em superfícies de bancadas, pias, respiradores, desinfetantes, nos alimentos e na água o que evidencia boa capacidade de adaptação dessa espécie ao ambiente. Este patógeno apresenta grande relevância clínica, principalmente quando encontrado em pacientes sondados, cateterizados, em uso de ventilação mecânica que são considerados fatores de risco para infecção por este agente. A prevalência de infecção do trato respiratório foi maior na UTI adulto correspondendo ao da literatura. Os dados deste estudo mostram a maior prevalência de infecção de corrente sanguínea na UTI pediátrica e neonatal e como segunda ocorrência à infecção urinária em todas as unidades.^{11, 12, 13, 14, 16, 18}

Considera-se que as infecções do trato urinário estão no grupo das quatro infecções hospitalares mais frequentes, principalmente na população adulta. Cerca de 70% a 88% dos casos diagnosticados em indivíduos internados em UTI ocorrem em

pacientes submetidos ao cateterismo urinário de curta e longa duração^{9, 15, 16, 17, 19}.

Nos hospitais brasileiros, a resistência em UTI é preocupante e alarmante, sendo que alguns estudos multicentros como o SENTRY e MISTYC, têm demonstrado estes perfis de resistência nas infecções por *P. aeruginosa*. O aumento da ocorrência de linhagens resistentes aos antimicrobianos é um problema que deve ser trabalhado na prática clínica, justificando o perfil contínuo da resistência da *P. aeruginosa* nas instituições de saúde^{11, 13, 18, 20, 21}. Há um número limitado de agentes antimicrobianos com atividade contra a *P. aeruginosa*, incluindo penicilinas antipseudomonas, cefalosporinas, carbapenens, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Tal resistência é um problema clínico crescente e reconhecido pelos serviços de saúde^{6, 9}. Este micro-organismo apresenta uma particular propensão para o desenvolvimento de resistência e esta situação está associada ao aumento da taxa de mortalidade, morbidade e dos custos do tratamento^{3, 6, 10}.

A resistência bacteriana é considerada, aos efeitos dos agentes antimicrobianos, um fenômeno natural que se pode verificar espontaneamente. Observa-se que há grandes variações do tipo de resistência que ocorre e a frequência com que acontece. Essa resistência não deixa de ser consequência do uso indevido destes medicamentos, que devem ser utilizados de acordo com as recomendações descritas no rótulo, como a escolha do produto adequado, a administração no tempo certo e na dose correta^{4, 14, 21}. Há também uma constante discussão a respeito do uso de fármacos nos alimentos de animais com finalidade de

engorda, o que contribui para a resistência bacteriana⁴. Esses são aspectos importantes que devem ser revistos, de modo a promover ações que incentivem a população ao uso controlado destes medicamentos e esta realidade deverá ser mudada com as ações educativas dos profissionais para a prescrição e dispensação dos antimicrobianos, além da orientação para a população sobre a sua utilidade^{4, 8, 21}. De qualquer modo, para a efetiva vigilância e monitoramento destas ações, ressaltamos o fato de se considerar as notificações de infecções hospitalares como critério de investigação e identificação completa do patógeno envolvido. As informações obtidas a partir deste estudo são necessárias para orientar a terapia empírica no tratamento de infecções humanas, assim como na prevenção e controle dessas patologias causadas por estes micro-organismos.

CONCLUSÕES

A prevalência dos agentes descritos da microbiota do hospital mostrou-se composta por 49 micro-organismos, sendo o *Staphylococcus* sp coagulase negativo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* os mais predominantes

A ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* foi maior na UTI adulto, embora a mesma tenha sido encontrada em isolados na UTI neonatal e pediátrica. Na distribuição geral, a infecção de corrente sanguínea foi a mais frequente, seguida da infecção do trato urinário, dado estatisticamente significativo para o período analisado. A análise separada por UTI evidenciou a infecção respiratória como

predominante na UTI adulto e a infecção de corrente sanguínea predominante nas UTI pediátrica e neonatal. A *P. aeruginosa* apresentou elevada resistência aos antibióticos tradicionais, gerando preocupação com a falência terapêutica relacionada ao uso desses medicamentos. Os resultados obtidos neste trabalho destacam a importância de estudos epidemiológicos contínuos de detecção de alteração na microbiota local, com a finalidade de se evitar a instalação de surtos e expressão de novos mecanismos de resistência bacteriana às drogas.

AGRADECIMENTOS

Às equipes da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, do Arquivo Médico, Estatística e do Laboratório de Microbiologia da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

APOIO FINANCEIRO

PIBIC/CNPq/UEPA/2011.

PREVALENCE OF MICROBIAL AGENTS AND SENSITIVITY *Pseudomonas aeruginosa*

Eliseth Costa Oliveira de MATOS², Núbia dos Santos MODESTO³, Wana Lailan Oliveira da COSTA⁴, Irna Carla do Rosário Souza CARNEIRO⁵, Karla Valéria Batista LIMA⁵

ABSTRACT

Objective: to describe the occurrence of microbial agents and evaluate the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* from patients hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU) of sentinel hospital in Belém (Pará), on the period 2005-2010. Methods: retrospective and quantitative approach - with descriptive data from the query of patient records, the files of the hospital infection control committee. Results: Among the isolated microorganisms got 40,8% of coagulase-negative staphylococci, 11,4% of *P. aeruginosa* 7,4% of *Staphylococcus aureus*. The occurrence of *P. aeruginosa* infections was higher in the adult ICU. The respiratory infection was predominant in the adult ICU and bloodstream infection prevalent in pediatric and neonatal ICU. Conclusions: 49 groups of microorganisms were found in the population studied, coagulase negative *Staphylococcus* spp, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *A. baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* the most prevalent. *P. aeruginosa* was highly resistant to traditional antibiotics. The results of this study highlight the importance of ongoing epidemiological studies in order to avoid the installation of outbreaks .

KEYWORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; Intensive Care Unit ; Nosocomial Infection.

REFERÊNCIAS

- 1 FILHO VCB, RESCHKE CR, HÖRNER R. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na Unidade de terapia intensiva infantil do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 38(4): 267-270, 2006
- 2 CORDEIRO EJVP, SILVA JR VV, LOPES ACS, VERAS DL, LEITE LE, MACIEL MAV. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an university hospital. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 21(4): 384-390, 2009
- 3 FIGUEIREDO EAP; RAMOS H; MACIEL MAV; VILAR MCM; LOUREIRO NG; PEREIRA RG. *P. aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 19(4): 421-427, 2007
- 4 TAVARES W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 33(3): 281-301, 2000.
- 5 FERREIRA E; PERES LER. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**. 12(2): 44-50,2010
- 6 GALES AC; JONES RN; TURNIDGE J; RENNIE R; RAMPHAL R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates: Occurrence Rates, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Molecular Typing in

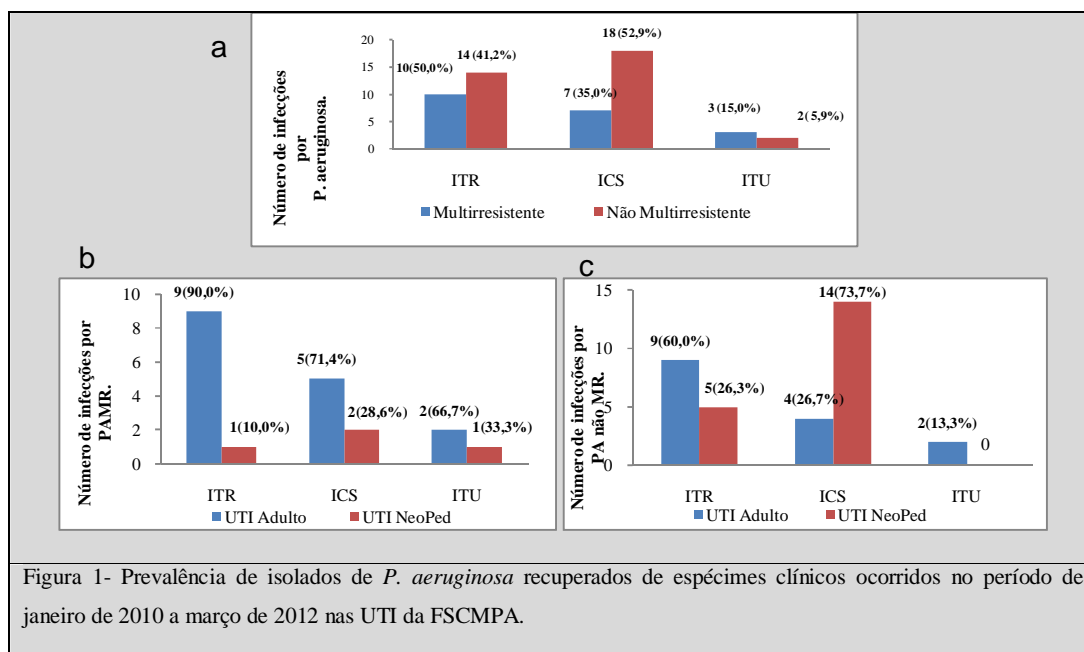
- the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Diseases**, (Suppl 2): 32, 2001
7. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. **Higienização das mãos em serviços de saúde**. 2004.
 8. FIGUEIREDO-MENDES CM, SINTO S, MELLO SJL, CARDOSO-LEÃO S, OPLUSTIL CP, TURNER P. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 23(7): 402-405, 2005.
 9. JÚNIOR J, DAVID CD, HATUM R, SOUZA PCSP; JAPIASSÚ A; PINHEIRO CTS et al., Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB, Ronir Raggio Luiz. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 18 (1): 9-17,2006
 10. JUNCAL VR, NETO LAB, CAMELIER AA, MESSEDER OHC, FARIAS AMC. Impacto clínico do diagnóstico de sepse à admissão em UTI de um hospital privado em Salvador-Bahia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 37(1):85-92,2011
 11. KIFFER C, HSIUNG A, OPLUSTIL C, SAMPAIO J, SAKAGAMI E, TURNER P et al; MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. 9(3): 216-24, 2005
 12. MARTINS F, TEIXEIRA T, LOPES V, COSTA C, RAMOS H. Avaliação do perfil de susceptibilidade estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no serviço de Microbiologia do Hospital Geral de Santo Antônio, EPE num período de 3 anos (2004-2006). **Revista Portuguesa Saúde Pública**. 26(2): 69-76, 2008.
 13. MENDES C, TURNER PJ. Unit differences in pathogen occurrence among European MYSTIC Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. 41: 191-6,2001.
 14. OBRITSCH MD, FISH DN, MACLAREN R, JUNG R. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Intensive Care Unit Patients from 1993 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 48(12): 4606–4610, 2004.
 15. AGUIAR, E. **História natural da sepse**. Brasília Med. 47(1): 69-76, 2010
 16. ALVES LNS, OLIVEIRA CR, SILVA LAP, GERVÁSIO SMD, ALVES SR, SGAVIOLI GM. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em Unidade de Terapia Intensiva. **Journal of the Health Sciences Institute**. 30(1): 44-7,2012
 17. ANGUS DC; WAX RS. Epidemiology of sepsis: an update. **Critical Care Medicine**. 29(Suppl7): S109-S116, 2001.
 18. ESEN S, LEBLEBICIOGLU H. Prevalence of nosocomial infections at intensive care units in Turkey: a multicentre 1-day piont prevalence study, **Scandinavian Journal Infectious Diseases Stockolm**. 6(2): 144-8,2004.
 19. MARTINS P. **Epidemiologia das Infecções em Centro de Terapia Intensiva de adulto** (2006). 78p. (Dissertação) Faculdade de Medicina. Belo Horizonte (MG): Universidade de Minas Gerais, 2006.
 20. KNOBEL E. **Terapia intensiva: infectologia e oxigenoterapia hiberbárica**. 1ª ed, São Paulo, Ed. Atheneu. 2003; 265 pp. CDD-616-028.
 21. MOURA MEB, CAMPELO SMA, BRITO FCP, BATISTA OMA, ARAÚJO TME, OLIVEIRA ADS. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Rev Bras de Enferm**, Brasília. 60(4): 416-2,2007.

7.2 ARTIGO 2 - PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM UTI DE UM HOSPITAL DE BELÉM-PARÁ.

O presente artigo em fase de redação apresenta os aspectos epidemiológicos e moleculares das infecções por *P. aeruginosa* em pacientes internados na UTI de um hospital de ensino de Belém do Pará. Foram selecionados 54 pacientes com infecção por *P. aeruginosa* respeitando os critérios de inclusão, com 55,6% (30/54) internados na UTI adulto e 44,4% (24/54) na UTI NeoPed. Dos pacientes analisados 51,9% (28/54) eram do sexo feminino e 48,1% (26/54) masculino.

A densidade de incidência dos episódios de IRAS por *P. aeruginosa* em 2011 foi de 5,2 episódios de infecção por 1.000 pacientes/dia na UTI adulto e 0,7 episódios na UTI Neoped. Nos anos anteriores foi relatado período de elevação da densidade de incidência com possível ocorrência de surto epidêmico em 2008 (77,2 episódios de infecção na UTI adulto), no entanto na UTI NeoPed não houve variação significativa na densidade, conforme dados do artigo 1 (seção 8.1).

Os isolados bacterianos foram procedentes de ITU, ITR e ICS, separados por multirresistência (figura 6a) e por unidade de internação (Figura 6b e 6c). Nesta análise, observa-se a predominância da ITR na UTI adulto, e ICS na UTI NeoPed, (figuras 6b e 6c).



Legenda: a) *P. aeruginosa* Multirresistentes e não Multirresistentes; b) PAMR: *P. aeruginosa* Multirresistente; c) PA não MR: *P. aeruginosa* não multirresistente; ITR: infecção do trato respiratório; ICS: infecção de corrente sanguínea; ITU: Infecção do trato urinário.

A taxa de mortalidade geral, para os casos de infecção por *P. aeruginosa* foi de 64,8% (35/54), sendo que os isolados produtores de M β L não apresentaram associação com o óbito.

A frequência de cepas multirresistentes (PaMR) e não multirresistentes (Pa não MR) é apresentada na figura 2a que segue.

Quanto à detecção de produção da enzima metalo-beta-lactamases (M β L) foram identificadas 20% (4/20) de isolados produtores de blaSPM-1 like, e não houve produção de M β L para as variantes blaIMP like e blaVIM like (figura 2b).

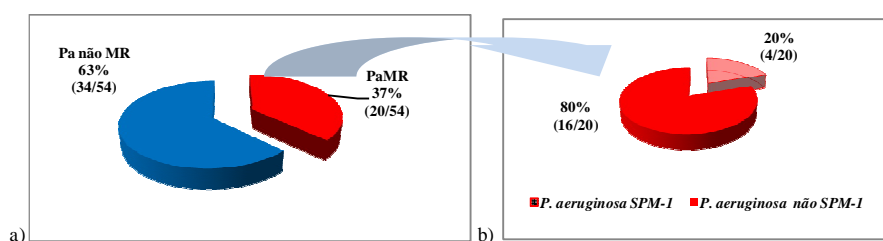


Figura 2- Distribuição de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes e produção de blaSPM-1 like recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

Legenda: a) Pa não MR: *P. aeruginosa* não multirresistentes, PaMR: *P. aeruginosa* multirresistentes b) *P. aeruginosa* blaSPM-1 like.

A análise retrospectiva dos registros médicos evidenciou que dos 20 pacientes com infecção por PaMR, a faixa etária com maior ocorrência foi a partir de ≥ 60 anos de idade, e o menor perfil de MR predominou entre os pacientes no grupo etário de 0 a 1 ano e de 11 a 20 anos (figura 3).

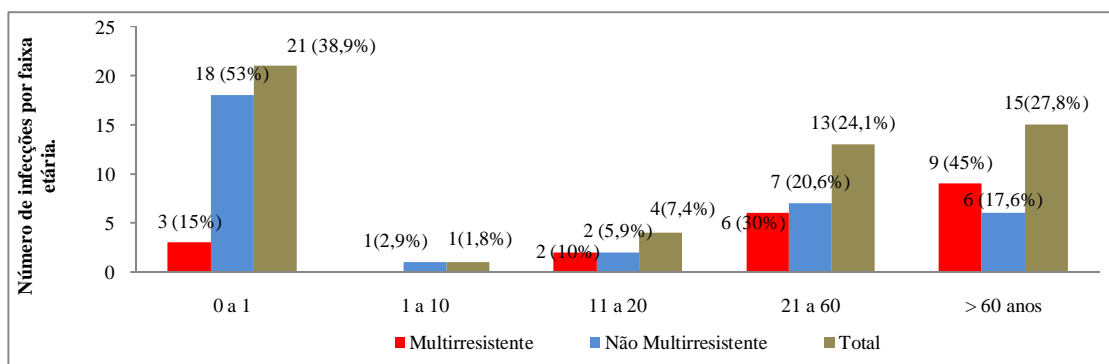


Figura 3- Proporção de infecção por *P. aeruginosa* segundo grupos etários, ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

A seguir são apresentados em tópicos e nas tabelas 1 e 2 os resultados consolidados das análises bivariadas, comparando expostos e não expostos:

i. Tipo de Unidade de Internação

Predominou a ocorrência de multirresistência na UTI adulto quando comparada as UTIs NeoPed (RC 5.7143, $p=0.0128$);

ii. Faixa etária/multirresistência

A média de idade ficou em 28 anos com variação entre 0 a 84 anos de idade, e no grupo etário de 0 a 1 ano foi maior a ocorrência de não MR (RC 0.157, $p=0.0139$);

iii. Tempo de internação

A média de internação foi de 87,1 dias com mediana de 62 dias de internação geral. O tempo de internação por UTI foi de 67,8 dias (mediana 64,5 dias) na UTI adulto e 111,3 dias (mediana 58.5 dias) nas UTIs NeoPed;

iv. Escore MacCabe Jackson

Neste escore predominou as doenças classificadas como potencialmente fatais (RC 3.8831, $p=0.0405$), como podemos observar na tabela 1;

v. APACHE II (Sistema de pontuação de mortalidade estimada).

O escore APACHE II não apresentou associação estatisticamente significativa com relação a multirresistência para a gravidade da infecção nos >20 pontos na UTI adulto.

vi. Procedimentos invasivos

Ao analisar o uso de procedimentos invasivos, considerados fatores de risco externo para aquisição da infecção por *P. aeruginosa*, as infecções foram favorecidas pelo uso de ventilação mecânica (X^2 6.3529 $p=0.0098$) e sonda vesical (RC 3.6000, $p=0.0273$);

vii. Sítios de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde

Todos os isolados foram confirmados com IRAS, e relacionados com os fatores de riscos externos nas infecções pulmonares (RC 7.9167, $p=0.0314$) e infecção do trato urinário (RC 6.0357, $p=0.0025$), conforme podemos verificar na tabela 2;

viii. Óbito

Não houve associação de óbito e multirresistência neste estudo. Este desfecho é discutido no artigo 3 (apêndice 3);

ix. Terapia inadequada

Neste caso todos os pacientes com infecção por PaMR receberam terapia inadequada no momento da suspeita diagnóstica. (X^2 12.2172, $p=0.0004$);

x. Uso de Antimicrobianos

Quando observado o uso de antimicrobianos percebe-se o menor fator de risco de infecção em relação ao uso da gentamicina com (RC 0.0752, $p= 0.00343$), para o Imipenem com relação significativa para MR (RC 6.3750, $p=0.00556$) e Meropenem (RC 0.2813, $p= 0.02631$). Foi ressaltado que o uso de mais de três classes de antimicrobianos predominou no estudo.

Tabela 1- Análise bivariada das características clínicas dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistente, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

VARIÁVEIS	MR (n=20)	Não MR (n=34)	Razão de Chances (IC95%)	P
UTI adulto	16 (53,3%)	14 (41,2%)	5.7143 (1.5712 - 20.7820)	0.0128
UTI Neoped	4 (16,7%)	20 (83,3%)	0.1750 (0.0481 - 0.6364)	0.0128
Faixa etária				
0 a 1	3 (14,3%)	18 (85,7%)	0.1569 (0.0387 - 0.6381)	0.0134
1 a 10	0	1 (2,9%)	X2 0.0734	0.7864
11 a 20	2 (10,0%)	2 (5,9%)	1.7778 (0.2304 - 13.7174)	0.9841
21 a 60	6 (30,0%)	7 (20,5%)	1.6531 (0.4655 - 5.8697)	0.6515
>60anos	9 (45,0%)	6 (17,6%)	3.8152 (0.0979 - 13.2791)	0.0639
Tempo de internação				
Tempo de internação (≤ 30 dias)	2 (10,0%)	9 (26,5%)	0.3086 (0.0594 - 1.6033)	0.2707
Tempo de internação (≥ 30 dias)	18 (90,0%)	25 (73,5%)	0.6237 (0.6237 - 16.8309)	0.2707
Escore McCabe Jackson				
Doença potencialmente fatal	13 (65,0%)	11 (32,3%)	3.8831 (1.2095 - 12.4668)	0.0405
Doença de base não fatal	3(15,0%)	3 (8,8%)	1.8235 (0.3311 - 10.0435)	0.4855
Comorbidades				
Doença Cardiovascular	6 (30,0%)	4 (12,1%)	3.2143 (0.7806 - 13.2357)	0.1925
Doença gastrointestinal	3 (15,0%)	6 (17,6%)	0.8235 (0.1817 - 1.6033)	0.8997
Neuropatia	3 (15,0%)	1 (3,0%)	5.8235 (0.5623 - 60.3124)	0.2731
Diabete	3 (15,0%)	1 (3,0%)	5.8235 (0.5623 - 60.3124)	0.2731
Doença hepática	1 (5,0%)	1 (3,0%)	1.7368 (0.1026 - 29.3947)	0.7194
Doença do Sistema Nervoso Central	4 (19,0%)	4 (12,1%)	1.8750 (0.4130 - 8.5125)	0.6701
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	3 (15,0%)	1 (3,0%)	5.8235 (0.5623 - 60.3124)	0.2731
AIDS	1 (5,0%)	1(3,0%)	1. 7368 (0.1026 - 29.3947)	0.7194
Doença Renal Aguda e Crônica	6 (50,0%)	6 (50,0%)	2.000 (0.5446 - 7.3446)	0.4743
Nº de antimicrobianos usados por classe.				
2	0	3 (8,6%)	-	0.1319
3	2 (10,5%)	6 (17,1%)	0.5185 (0.0941 - 2.8565)	0.7134
>3	13 (68,4%)	30 (85,7%)	0.2476 (0.0617 - 0.9944)	0.0896

*: Em NeoPed não foi utilizado Score de gravidade (APACHE II e CHALSON).

Tabela 2-Análise bivariada das características clínicas dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistente, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

VARIÁVEIS	MR (n=20)	Não MR (n=34)	Razão de Chances (IC95%)	P
Corticoterapia	2(25,0%)	6 (75,0%)	0.5185 (0.0941 - 2.8565)	0.7134
Procedimentos invasivos				
Cateter Venoso Central	20 (39,2%)	31 (60,8%)	X ² 0.5052	0.4521
Ventilação Mecânica	20 (100,0%)	25 (73,5%)	X² 4.5900	0.0321
Sonda Vesical	12 (60,0%)	10 (29,4%)	3.6000 (1.1291 - 11.4786)	0.0273
Hemodiálise	4 (20,0%)	1 (2,9%)	8.2500 (0.8513 - 79.9538)	0.1090
Gastrostomia	2 (10,0%)	1 (2,9%)	3.6667 (0.3107 - 43.2730)	0.6323
Sítios de IRAS				
Pulmonar	19 (95,0%)	22 (70,5%)	10.3636 (1.2311 - 87.2422)	0.0288
Corrente Sanguínea	18 (90,0%)	30 (88,24%)	1.2000 (0.1993 - 7.2247)	0.8033
Trato Urinário	13 (65,0%)	8 (25,8%)	6.0357 (1.7938 - 20.3090)	0.0063
Pele e Partes Moles	0	3 (9,1%)	X ² 05652	0.4521
Óbito				
	14 (70,0%)	20 (58,9%)	1,6333 (0.5043 - 5.2901)	0.5964
Óbito na UTI adulto	13 (81,3%)	10 (71,4%)	4.4571 (1.3718 - 14.4815)	0.0233
Óbito na UTI NeoPed	1 (25,0%)	11 (55,0%)	0.1100 (0.0130 - 0.9311)	0.0459
Terapia inadequada				
	20 (100%)	19 (55,8%)	X² 10.1171	0.0014
Uso de Antibióticos				
Amicacina	4 (25,0%)	22 (57,8%)	0.1364 (0.0371 - 0.5014)	0.0038
Gentamicina	1 (6,7%)	14 (93,3%)	0.0752 (0.0090 - 0.6287)	0.0107
Cefepime	13 (40,6%)	19 (59,3%)	1.4662 (0.4683 - 4.5904)	0.7100
Ciprofloxacina	5 (26,3%)	14 (73,7%)	0.4762 (0.1404 - 1.6146)	0.3644
Imipenem	17 (51,5%)	16 (48,4%)	6.3750 (1.5720 - 25.8522)	0.0134
Meropenem	4 (20,0%)	16 (80,0%)	0.2813 (0.0777 - 1.0177)	0.0897
Piperacilina-Tazobactam	10 (33,3%)	20 (66,7%)	0.7000 (0.2304 - 2.1266)	0.7289
Nº de Antimicrobianos usados por classe.				
2	0	3 (8,6%)	-	0.1319
3	2 (10,5%)	6 (17,1%)	0.5185 (0.0941 - 2.8565)	0.7134
>3	13 (68,4%)	30 (85,7%)	0.2476 (0.0617-0.9944)	0.0896

Legenda: Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), (ITR) Infecção Trato Respiratório, (ITU) Infecção do Trato Urinário, (ICS) Infecção de Corrente Sanguínea, (MR) Multirresistentes (RC): Razão de Chances, (IC): Intervalo de Confiança a 95%.

Na análise bivariada dos índices de gravidade, figura a não relação com a multirresistência, como é visto na tabela 3.

Tabela 3- Análise bivariada dos *scores* de gravidade dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa*, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 na UTI adulto da FSCMPA.

APACHE II (Média 21pontos)	NºUTI Adulto MR	NºUTI Adulto Não MR	Razão de Chances (IC95%)	P
APACHE ≤20 pontos	5	9	0.9259 (0.2608 - 3.2868)	0.8395
APACHE >20 pontos	11	5	7.0889 (1.9417 - 25.8800)	0.00476
Escore de Chalon (Escala 0-2pontos)	15	13	4.8462 (1.4223 – 16.5122)	0.0198
(Escala 3-6pontos)	1	1	0.7368 (0.1026 – 29.3947)	0.7194

A análise multivariável do estudo demonstrou que sepse (RC 16.3252/ $p=0.0122$) está associada com o óbito, e a exposição à ventilação mecânica não alcançou significância estatística nesse modelo, tabela 4, que segue.

Tabela 4- Análise multivariada com variável dependente óbito, das características clínicas dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multirresistente, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

VARIÁVEL	Razão de Chances (IC95%)	P
Ventilação Mecânica	2, 2303 (0.3630 – 13.7034)	0.3865
Sepse	16.3252 (1.8383 – 144.9798)	0.0122
APACHE II >20pontos	2.0879 (0.49.0244)831 -	0.3243

A multivariada que segue demonstrou que a exposição ao imipenem, é estatisticamente significativo para multiresistência neste modelo (tabela 5).

Tabela 5- Análise multivariada com variável depende a multiresistência, dos pacientes com infecção por *P. aeruginosa* multiresistente, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

VARIÁVEL	Razão de Chances (IC95%)	P
Imipenem	4.9378 (1.1350 – 21.4818)	0.0333
Meropenem	0.4782 (0.1169 – 1.9560)	0.3047
Gentamicina	1.3942 (0.4051 – 4.7984)	0.5982

O perfil de sensibilidade é apresentado na tabela 6, com valores percentuais e a CIM50% e CIM90% para cada droga. É importante destacar que 100% das amostras foram sensíveis à Polimixina B.

Tabela 6 - Perfil de sensibilidade de 54 isolados de *P. aeruginosa* frente a seis antimicrobianos, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

ANTIBIÓTICOS	S	%S	R	%R	TOTAL	CIM50%	CIM90%
Cefepime	28	51,9	26	48,1	54	16	128
Imipenem	19	35,2	35	64,8	54	8	16
Meropenem	19	35,2	35	64,8	54	2	8
Piperacilina-tazobactam	29	53,7	25	46,3	54	8	32
Gentamicina	29	53,7	25	46,3	54	4	64
Ciprofloxacina	32	59,3	22	40,7	54	4	64
Amicacina	46	85,2	8	14,8	54	4	32
Ceftazidima	20	37,0	34	63,0	54	32	64
Polimixina b	54	100,0	0	0	54	0,5	1

Legenda: (S) Sensível (R) Resistente (I) Intermediário, (CIM) Concentração Inibitória Mínima.

A figura 4 que segue, destaca a CIM dos antibióticos e a distribuição das concentrações em CIM50% e CIM90%.

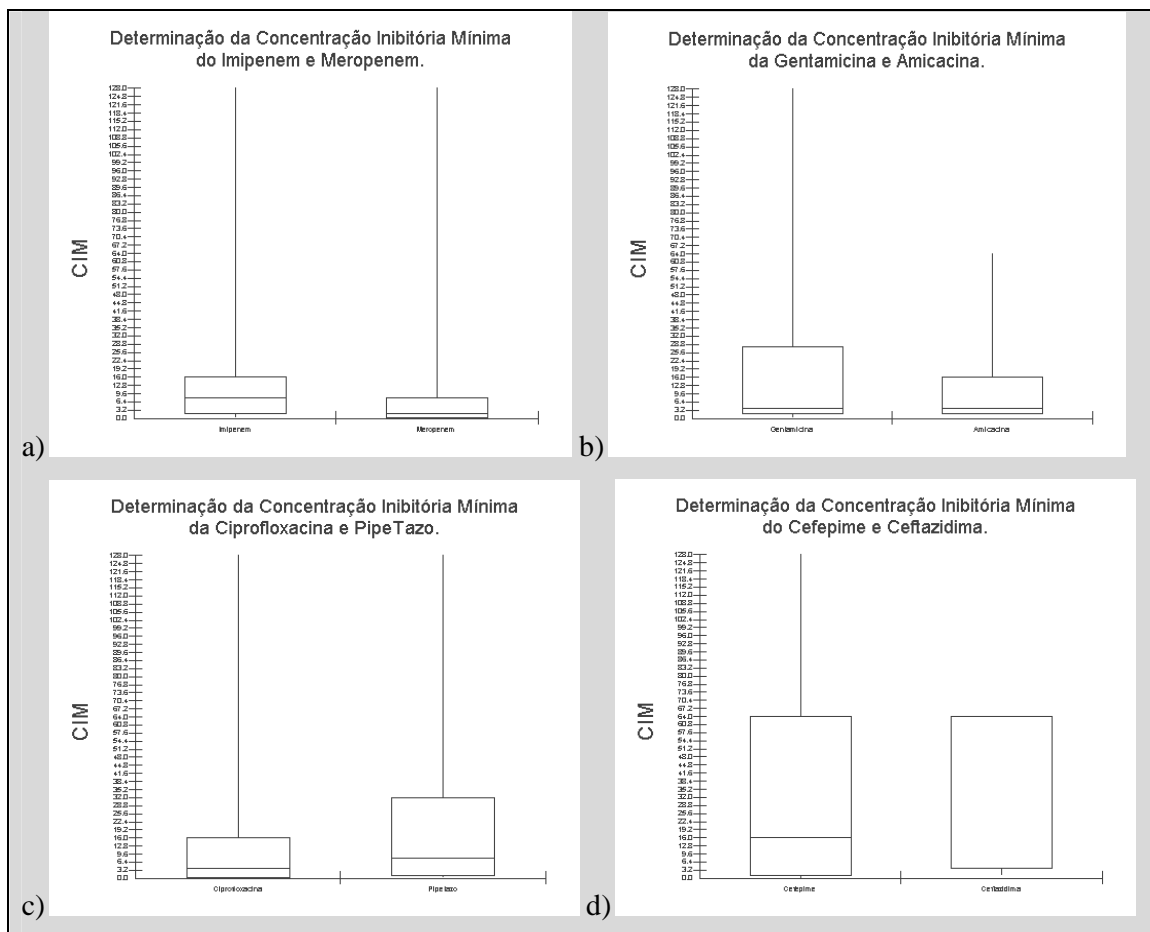


Figura 4- Box Plot da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos: imipenem, meropenem, gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam, cefepime e ceftazidima, testados em isolados de *P. aeruginosa*, recuperados de espécimes clínicos ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI da FSCMPA.

Quanto à produção de M β L, do total de isolados, quatro amostras foram positivas para o gene *bla*SPM-1, sendo negativas para *bla*IMP-1 e *bla*VIM-1 (figura 5). Com estes dados, registra-se o primeiro relato na literatura de detecção do gene *bla*SPM-1 na região Norte do Brasil, muito embora já tenha sido identificado nas regiões Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Todas as amostras apresentaram perfil fenotípico de resistência com as características dos já relatados na literatura.

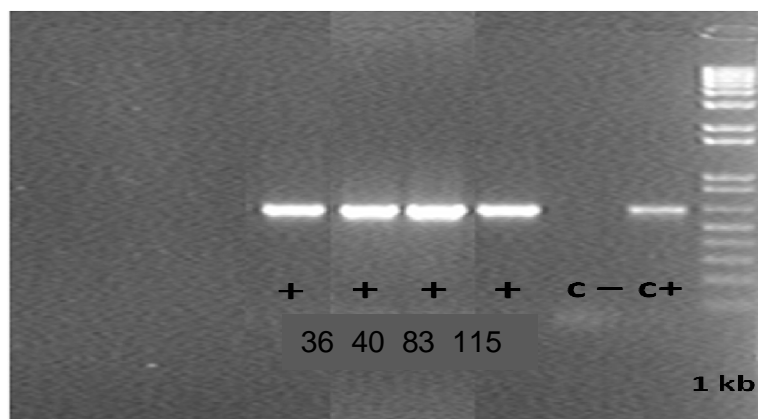


Figura 5 - Isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1.

Legenda: (+) amostra positiva, (-) controle negativo, (+) controle positivo, (1kb) marcador.

Dos 54 isolados de *P. aeruginosa*, 44 foram submetidos à genotipagem por REP-PCR (Sistema Diversilab) por ter-se perdido dez amostras no descongelamento, sendo que obtivemos 35 padrões considerando índice de similaridade maior ou igual a 97%, conforme a figura 6. Dos isolados positivos para SPM e genotipados pelo Diversilab (SC083, SC036, SC040, SC115), dois compartilharam padrão único (SC036, SC040) provenientes de UTI pediátrico e adulto respectivamente. Os isolados SC083 e SC016 apesar de apresentarem mais de 97% de similaridade, diferenciam-se quanto à presença do gene SPM, o que sugere a possibilidade de transferência veiculada por plasmídeo (Figura 6).

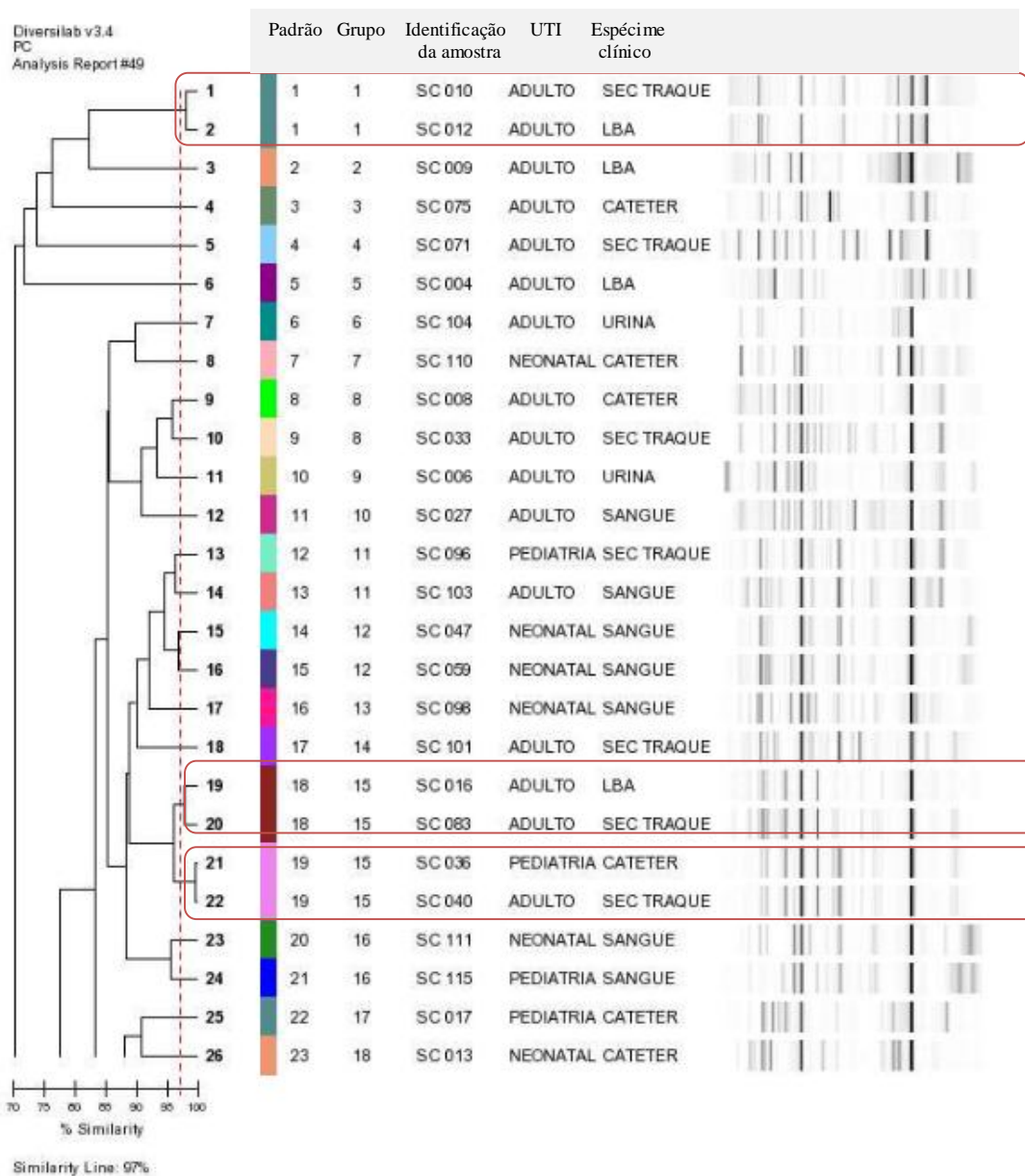


Figura 6 - Dendrograma da relação clonal das cepas de *P. aeruginosa*. Os isolados destacados são os casos que apresentaram 97% de semelhança.

Legenda: UTI- Unidade de Terapia Intensiva; NEO- Neonatal; e PED- Pediátrica.

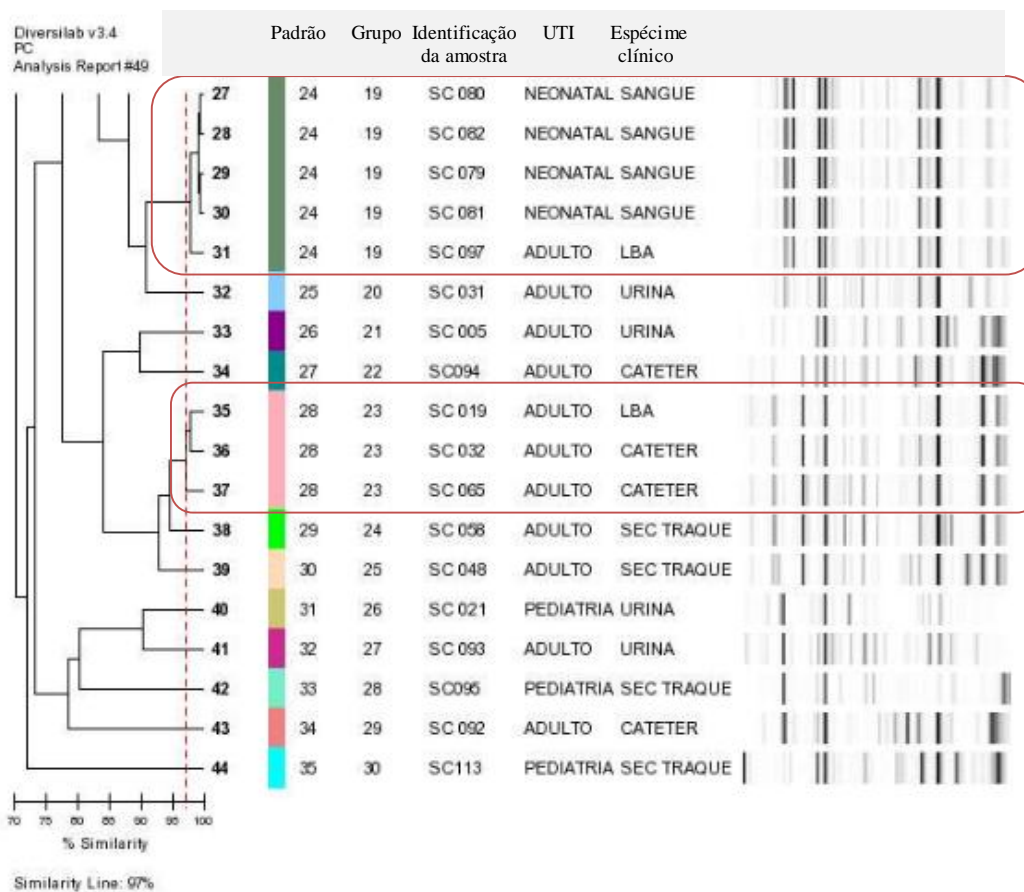


Figura 6–Continuação.

Legenda: UTI- Unidade de Terapia Intensiva; NEO- Neonatal; e PED- Pediátrica.

Os quadros 1 e 2 destacam a distribuição fenotípica das amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes com seu padrão genotípico do diversilab, produção de metalobetalactamases blaSPM-1, desfecho de alta e óbito e a transferência de outro hospital, para observação da variação dos perfis existentes entre as amostras analisadas. Reforçando o fato de que a UTI Neonatal não apresentou multirresistência.

Quadro 1- Perfil fenotípico de multirresistência, óbito e padrão do Diversilab de *P. aeruginosa* ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI adulto, pediátrica.

Identificação No Projeto	UTI	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	AM	CTZ	MBL	Padrão Diversilab	Óbito
SC036	PED	CPM	IMI	MER	S	GN	CIP	AM	CTZ	SPM	19	Não
SC040	PED	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	AM	CTZ	SPM	19	Não
SC083	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	S	SPM	18	Não
SC115	PED	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	SPM	21	Não
SC021	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	AM	CTZ	não	31	Sim
SC033	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	AM	CTZ	não	9	Sim
SC048	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	30	Sim
SC055	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	(-)	Não
SC057	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	(-)	Sim
SC070	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	(-)	Sim
SC071	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	4	Sim
SC094	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	27	Sim
SC18	ADULTO	CPM	IMI	MER	S	GN	CIP	S	CTZ	não	(-)	Sim
SC065	ADULTO	CPM	IMI	MER	S	GN	CIP	S	CTZ	não	28	Não
SC19	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	S	CTZ	não	28	Sim
SC032	ADULTO	CPM	IMI	MER	S	GN	CIP	S	CTZ	não	28	Não
SC058	ADULTO	CPM	IMI	MER	S	GN	CIP	S	CTZ	não	29	Não
SC06	ADULTO	CPM	IMI	MER	PTZ	S	S	AM	CTZ	não	(-)	Sim
SC027	ADULTO	S	IMI	MER	S	GN	CIP	S	CTZ	não	11	Não
SC10	ADULTO	S	IMI	MER	S	S	CIP	S	CTZ	não	6	Não

Legenda: UTI: Unidade de Terapia Intensiva, COM: Cefepime, IMI: Imipenem, MER: Meropenem, PTZ: Piperacilina-Tazobactam, GN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, AM: Amicacina, CTZ: Ceftazidima, MβL: MetalobetaLactamase.

Quadro 2- Perfil fenotípico de multiresistência, óbito e padrão do Diversilab de *P. aeruginosa* ocorridos no período de janeiro de 2010 a março de 2012 nas UTI neonatal.

Identificação do Projeto	UTI	CPM	IMI	MER	PTZ	GN	CIP	AM	CTZ	Padrão Diversilab	Óbito
SC13	NEO	S	S	S	S	GN	S	S	CTZ	23	Sim
SC049	NEO	COM	S	S	S	S	CIP	S	S	(-)	Sim
SC050	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	(-)	Sim
SC053	NEO	S	S	MER	S	S	S	S	CTZ	(-)	Sim
SC054	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	(-)	Não
SC047	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	14	Não
SC059	NEO	S	IMI	S	S	GN	S	S	S	15	Sim
SC073	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	(-)	Não
SC074	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	(-)	Sim
SC078	NEO	S	IMI	MER	S	S	S	S	S	(-)	Não
SC079	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	24	Sim
SC080	NEO	S	S	S	S	S	CIP	S	S	24	Sim
SC081	NEO	S	S	S	S	S	S	S	S	24	Sim
SC082	NEO	S	IMI	S	S	S	S	S	S	24	Não
SC110	NEO	S	IMI	S	S	S	CIP	S	S	7	Não
SC111	NEO	S	IMI	S	S	S	S	S	S	20	Não

Legenda: UTI: Unidade de Terapia Intensiva, COM: Cefepime, IMI: Imipenem, MER: Meropenem, PTZ: Piperacilina-Tazobactam, GN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, AM: Amicacina, CTZ: Ceftazidima, MBL: MetalloBeta-Lactama

8 DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro da região que descreve os aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes infectados com *P. aeruginosa* produtora de SPM-1, variante amplamente disseminada nos hospitais brasileiros. Não obstante a escassez de dados sobre a biologia e epidemiologia da aquisição do gene blaSPM like. O desenvolvimento de medidas para prevenir a disseminação de *P. aeruginosa* MR em hospitais brasileiros representa um problema de saúde pública.

Já está bem estabelecido na literatura que as infecções hospitalares representam importante problema de saúde em todo o mundo. No Brasil, de 5 a 15% dos pacientes internados, e aproximadamente de 30 a 35% dos pacientes admitidos em UTI adquirem IRAS, sendo considerada a quarta causa de mortalidade. Os índices de IRAS nas UTIs tendem a serem maiores quando comparado às outras unidades, isto se justifica pela gravidade das doenças de base. Mesmo considerando o número de leitos de um hospital, estima-se que na UTI ocorram aproximadamente 25% de todas as infecções hospitalares (LEISER; TOGNIN; BEDENDO, 2007; CORDEIRO et al., 2009; MACIEL E CÂNDIDO, 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

O hospital em estudo é caracterizado como hospital de ensino, de nível terciário com 395 leitos. Com densidade de incidência elevada nos períodos de 2005 a 2009 na UTI adulto pela maior frequência de ocorrência de infecção por *P. aeruginosa*, apresenta uma redução nos últimos anos em consequência da vigilância e maior controle das infecções por este patógeno.

Os estudos de ocorrências e riscos de doenças infecciosas são fundamentais do ponto de vista epidemiológico por contribuírem como fonte de informação dos principais micro-organismos que circulam pelo hospital e seu comportamento no aspecto de resistência aos antimicrobianos, já que estas infecções são responsáveis por hospitalizações prolongadas e conseqüentemente o óbito. Neste estudo, obteve-se a maior ocorrência de infecção por *P. aeruginosa* na UTI adulto seguida da UTI NeoPed (Neonatal e Pediátrica).

As infecções envolveram particularmente os extremos de idade e entre os grupos de participantes com maior risco de adquirir infecção por PaMR está o grupo

etário acima de 30 anos. Quando analisamos o grupo etário de 0 a 1 ano predominaram as infecções por *P. aeruginosa* não MR.

A faixa etária acima dos 30 anos se destacou por ser o grupo em que se enquadram as maiores ocorrências de infecção, a população adulta, sobretudo o idoso está mais sujeita aos processos infecciosos pela característica de imunossenescência e exposição aos agentes antimicrobianos, houve uma frequência maior de infecções por cepas resistentes quando comparada à população dos recém-nascidos. A população acima dos 60 anos é mais susceptíveis a adquirir infecções pelo fato de desenvolverem alterações fisiológicas do envelhecimento, declínio da resposta imunológica e a necessidade de realização de procedimentos terapêuticos invasivos, o que favorece o maior número de casos de MR (VILLAS-BOAS; RUIZ, 2004; MACIEL e CÂNDIDO, 2010).

Na população NeoPed predominaram os casos de infecção com cepas não MR (RC 0.1579, $p=0.0139$). Fatores que favorecem a exposição a qualquer tipo de infecção, são bem descritos neste grupo etário: a) demora na maturação do sistema imunológico, b) desnutrição aguda, prematuridade e a presença de doenças congênitas, assim como as doenças hemato-oncológicas (BRASIL, 2005; ANVISA, 2006).

Somado as questões acima relacionadas diretamente ao paciente, outros fatores podem contribuir para a ocorrência destas infecções, tais como: infecção cruzada através das mãos dos profissionais de saúde, contaminação de nebulizadores, umidificadores, equipamentos de assistência respiratória, incubadoras e superfícies de ambiente nas unidades de terapia intensiva (BRASIL, 2005; ANVISA, 2006).

Na análise da distribuição das infecções relacionadas à assistência à saúde por sítio de infecção, verificou-se maior prevalência nas infecções do trato respiratório inferior ($p=0.0314$), que teve associação às doenças pulmonares na população adulta, destacando como fator de risco o uso de ventilação mecânica.

O paciente com infecção respiratória que necessite de UTI é considerado um paciente grave. No entanto, existe uma variedade de mecanismos de defesa no trato respiratório humano, os quais protegem os pulmões de processos infecciosos. Esses mecanismos incluem as barreiras anatômicas como a glote e a laringe, reflexos da tosse, secreções traqueobrônquica, epitélio mucociliar e imunidade celular e humoral, além do sistema fagocitário envolvendo macrófagos alveolares e neutrófilos. Todas as infecções

respiratórias traduzem diminuição por determinado período ou permanente das defesas pulmonares à penetração de micro-organismos na intimidade alveolar. Portanto, para que ocorra infecção há necessidade de quebra de equilíbrio de defesa do hospedeiro e a capacidade de invasão bacteriana (BRASIL, 2005; MARSOLLA, 2005).

Considera-se a pneumonia como a segunda causa de infecção mais comum adquirida em paciente hospitalizado. Na UTI, a maior parte das pneumonias hospitalares são, de fato, causada por bacilos Gram negativos não fermentadores, entre eles, a infecção por *P. aeruginosa*, por uso de ventilação mecânica, podendo ocorrer entre 8% e 38% dos pacientes submetidos a este procedimento (AMARAL, CORTÊZ E PIRES, 2009; GUIMARÃES et al., 2006). As taxas de mortalidade dessas infecções podem variar de 24% a 76% dos casos (AMARAL, CORTÊZ e PIRES, 2009; CAVALCANTI, 2012; BARROS et al., 2012).

Neste estudo, a sepse foi fortemente associada à mortalidade, em acordo com estudos prévios sobre bacteremia por *P.aeruginosa* (ROBINSON, KUMAR E CADICHON, 2008; MORRELL, MICEK e KOLLEF, 2009).

A incidência de sepse em pacientes admitidos em UTI fica em torno de 9% a 31% e a mortalidade por sepse varia de acordo com a gravidade do quadro clínico. Entre as razões citadas para esse crescimento está o envelhecimento populacional, maior número de doentes imunocomprometidos, em virtude dos fatores que favoreçam a aquisição de infecção, que podem estar relacionados ao maior uso de medicamentos imunossupressores, maior sobrevivência dos doentes com AIDS ou com câncer, além de maior resistência microbiana (SILVA et al., 2004; BRASIL, 2005).

Como este estudo envolveu populações diferenciadas (adulto, pediátrica e neonatal), verificou-se uma ocorrência de 73,7% de sepse neonatal, caracterizada por atingir principalmente prematuros, com baixo peso ao nascer, e pode estar associada a esta ocorrência, outros fatores como: a infecção da mãe principalmente infecção urinária, a prematuridade, hospitalização prolongada, uso de antimicrobianos de amplo espectro, procedimentos invasivos, como cateter venoso central e ventilação mecânica. (ROBINSON, KUMAR E CADICHON, 2008).

Dados da literatura retratam que nos Estados Unidos a sepse é responsável por 9% dos óbitos e é considerada a décima causa de morte, sendo que cerca de 50% dos casos evoluem para sepse grave (MORRELL, MICEK e KOLLEF, 2009).

As infecções do trato urinário foram o terceiro sitio de infecção mais frequente, que tiveram predominância na UTI adulto, sendo o principal fator de risco o uso de sonda vesical. A infecção do trato urinário (ITU) é responsável por cerca de 35% a 45% das infecções hospitalares (SOUZA NETO et al., 2008). O risco de surgimento de infecções do trato urinário depende da susceptibilidade do paciente e do cuidado com o cateter antes e durante a realização do procedimento. Entretanto, existem fatores independentes para ITU associada a cateteres urinários de longa permanência, como doenças de base (diabetes mellitus, imunodeficiências, dentre outras) (BARROS et al., 2012).

Consideram-se ainda poucos os dados na literatura com investigações nos estudos comparativos relacionados aos aspectos clínico-epidemiológico entre pacientes admitidos com sepse e sem sepse em UTI por *P. aeruginosa*. Essas informações são importantes e poderiam identificar variáveis clínicas relacionadas ao prognóstico destes pacientes quando relacionados à infecção bacteriana. Fundamentado em outros estudos, é esperado que os pacientes com sepse apresentem piores desfechos clínicos, contribuindo para o aumento da mortalidade e do tempo de hospitalização (MURIEL-BOMBIN et al., 2008; JUNCAL et al., 2011).

Constata-se que nas últimas décadas, observou-se um aumento na ocorrência de pacientes hospitalizados, sejam eles infectados ou colonizados por bacilos Gram negativos não fermentadores, principalmente as espécies *P. aeruginosa*, que apresentaram características de multiresistência aos antimicrobianos. Esta problemática tem merecido atenção, em especial nas Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e dos serviços de saúde, principalmente por considerar a diversidade da condição clínica dos pacientes e a variedade de condutas terapêuticas aplicadas nas unidades.

Neste estudo a taxa de mortalidade no hospital foi elevada com 64,8% nas infecções por *P. aeruginosa*, considerando-se a especialidade de cada UTI, por conseguinte a gravidade da doença de base contribuiu para o aumento desta taxa, embora não tenha tido resultado estatisticamente significativo da relação óbito/PaMR na análise geral, porém, o que existe em comum entre muitos estudos é que a taxa de mortalidade chega a ser até seis vezes maior entre pacientes que adquirem infecção por PaMR. (ZAVASCKI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; WILLMANN et al., 2013).

Ao separar por UTI os resultados foram estatisticamente significativos para o óbito, considerando que na UTI adulto foi quatro vezes maior a chance de ocorrer o óbito em MR.

É digno de registro que em nossos achados sugerem que esse desfecho, óbito, possa ter sido mediado tanto por uma apresentação mais grave de tais infecções ou consequente doença de base, como também por um pouco frequente adequação da terapia antimicrobiana para tais infecções de forma precoce.

As consequências das infecções causadas por *P. aeruginosa* também refletem no aumento do tempo médio de internação. Nesse estudo o tempo médio de internação foi maior entre os pacientes da pediatria/neonatal.

O presente estudo permitiu determinar a ocorrência de linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa* e a presença dos gene blaSPM-1 like, sendo que é escasso os dados registrados na literatura acerca da detecção deste gene na região Norte, embora já tenha sido identificado nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Não foi detectada nenhuma cepa de *P. aeruginosa* produtora das variantes IMP e VIM entre as amostras analisadas no hospital em estudo. Esse resultado sugere a necessidade de continuidade desta investigação no hospital e na região, para termos um perfil mais concreto desta enzima na comunidade hospitalar e sua contribuição na resistência bacteriana e na elevação das taxas de mortalidade.

Interessante destacar que entre as amostras produtoras de metalo beta lactamases blaSPM-1 like, a ocorrência por sítio de infecção foi de dois (2) casos de ICS, um (1) caso de ITR, e um (1) caso de ITU, de modo que todos evoluíram bem com alta hospitalar. Esta descrição pode caracterizar que a presença de expressão do gene não esteja necessariamente associada à gravidade/mortalidade do paciente com infecção por *P. aeruginosa* produtoras da enzima.

Na tipagem molecular analisada nos resultados do Diversilab, observa-se a presença de cepas com similaridade genética maior que 97% e que apresentaram variações em relação ao fenótipo de resistência, como figura nos Quadros 7 e 8. Essa variação dos perfís pode ser justificada pela pressão seletiva existente na UTI adulto associada à terapia empírica inadequada, embora na UTI seja utilizada grande quantidade de antimicrobianos, o estudo mostra a pequena variação ocorrida na UTI neonatal, unidade que apresentou melhor controle no uso de antimicrobianos.

A genotipagem demonstrou concordância nos agrupamentos de clones restritos nas UTI (figura 6: P₁,P₁₈,P₁₉,P₂₄,P₂₈) e revelou a distribuição de clones em diferentes ambientes, no período proposto (figura 6: P₂₀, P₂₈, P₂₉, P₄₆). O dado de grande relevância é a ampla diversidade genética entre os grupos resistentes e que apresentavam genes relacionados. Tal fato sugere transmissão de genes entre diferentes cepas nos dois anos investigados nas UTI e possivelmente em outras alas de Hospitais de Belém.

A diferença genética entre os isolados blaSPM-1 positivos pode ser indicativo da presença do gene em elementos móveis. Da mesma forma, o agrupamento observado, entre isolados positivos ou não para o gene blaSPM-1 sugere aquisição horizontal do gene, podendo ser levantada a hipótese de que estes genes estejam sendo carregados por plasmídeos de resistência. O sequenciamento do plasmídeo responderia o contexto genético de blaSPM-1, até o momento são conhecidos apenas algumas sequências adjacentes ao gene (POIREL et al., 2004).

Desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até os mais recentes, vem se registrando uma pressão seletiva dos micro-organismos, causada principalmente, pelo uso indiscriminado dos antibióticos, o que resulta no desenvolvimento de espécies resistentes aos diferentes antimicrobianos lançados pela indústria farmacêutica associados às complicações do quadro clínico dos pacientes hospitalizados.

Os carbapenêmicos continuam a ser os principais antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* MR, mas o desenvolvimento de resistência aos carbapenemas podem significativamente comprometer a sua eficácia. Na ausência de enzimas hidrolizantes (principalmente metalo- β -lactamases), a resistência aos carbapenemas geralmente é multifatorial, tais como: a) maior produção de cefalosporinas e cromossomo codificado por AmpC; b) redução da membrana externa porina expressão OprD; e c) factores associados conhecidos por contribuir para carbapenemas resistência (CAVALCANTI et al., 2012).

A super expressão do sistema de efluxo MexAB-OprM é conhecido por atingir a eficácia de ação do meropenem, mas não atinge o imipenem. Além disso, os sistemas de efluxo MexCD-OprJ e MexXY-OprM também podem estar envolvidos na redução da sensibilidade da *P. aeruginosa* ao meropenem. Dessa forma podemos justificar algumas alterações observadas nos antibiogramas, chamando a atenção para o

cuidado ao liberar um resultado de antibiograma duvidoso, o conhecimento destes mecanismos colaboram para melhor interpretar e detectar alterações que podem ocorrer no teste de sensibilidade.

Todas as amostras deste estudo apresentaram perfil fenotípico de resistência característico aos relatados na literatura (XAVIER et al., 2010; ARORA; JINDAL; ROMIT, 2011; XIÃO et al., 2013). Estes dados reforçam a necessidade da investigação epidemiológica deste gene e a análise periódica dos perfis de resistência para este patógeno a nível hospitalar, visando à melhor compreensão nos padrões de evolução desta resistência bacteriana especificamente a esta espécie em questão que é o foco do estudo.

Dada a importância epidemiológica acerca da difusão de β -lactamases, enzimas que dificultam a antibioticoterapia, à utilização da biologia molecular como ferramenta torna-se importante no auxílio diagnóstico, principalmente na identificação de genes de resistência e controle de infecções nosocomiais. Este estudo representa um avanço no conhecimento epidemiológico acerca deste micro-organismo na região Norte, entretanto, mais estudos são necessários para o entendimento da aquisição de mecanismos de resistência em *P. aeruginosa*.

A resposta desse problema é importante na tomada de medidas de controle de transmissão de patógenos no Hospital investigado. O padrão de resistência dentro de um hospital deve ser monitorado continuamente através de rápida detecção para a execução de ajustes consecutivos de regimes de tratamento. Diante da ocorrência de infecção por *P. aeruginosa*, a administração da terapêutica definitiva e apropriada continua a ser fator essencial para melhora dos resultados clínicos e deve ser combinada com medidas de controle de infecção de rotina para reduzir ainda mais a morbidade e os custos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, **Tecnologia em Serviços de Saúde Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos**. Setor de Embaixadas Norte, Lote 19, Brasília-DF março, 2006.

AMARAL, S.M.; CORTÊS, A. Q.; PIRES, F. R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 35(11):1116-1124, 2009

ARORA, D.; JINDAL, N.; KOMAR, R.; ROMIT. Emerging antibiotic resistance in pseudomonas-A challenge. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v 3, issue 2, p. 82-84, 2011.

BARROS, L.M.B. BENTO, J.N.C.; CAETANO, J.C.; MOREIRA, R. A.N.M.; PEREIRA, F.G. F. FROTA, N. M. ARAÚJO, T.M.; SOARES E. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**. 33(3): 429-435, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar** / Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

CAVALCANTI, F.L.S.; ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C.; JUNIOR, M.A.M. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v107, n3, p.420-3, 2012.

GUIMARÃES, M.M.Q. ROCCO, JR. Prevalência e prognóstico dos pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital universitário. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 32 (4):339-46, 2006.

JUNCAL, V.R.; NETO, L. A.B.; CAMELER, A.A.; MESSEDER, O.H.C.; FARIAS, A.M.C. Impacto clínico do diagnóstico de sepse à admissão em UTI de um hospital privado em Salvador, Bahia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. vol.37 n.1 São Paulo, 2011.

LEISER, J.J. TOGNIM, M.C.B; BEDENDO, J. Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino no Norte do Paraná. **Ciência, Cuidado e Saúde**. 6(2):181-6, 2007.

MACIEL, C.C.S. E CÂNDIDO, H.R.L.F. Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas. veredas FAVIP - **Revista Eletrônica de Ciências** - v. 3, n. 1 – 2010.

MARSOLA, L.R. **Fatores de risco para pneumonia associada a ventilação mecânica: estudo de caso controle**. Núcleo de Medicina Tropical-UFPA, Mestrado em Doenças Tropicais. 105f, 2005.

MORRELL M.R.; MICEK S.T.; KOLLEF M.H. The management of severe sepsis and septic shock. **Infectious Diseases Clinic of North American**. 23:485–501, 2009.

MOURA, A. H.I.; RIBEIRO, R.; CORREIA, A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p. 1243-1250, 2007.

OLIVEIRA, O.A.; OLIVEIRA, A.L.L.; PONTES, E.R.J.C.; OLIVEIRA, S.M.V.L.; CUNHA, R.V. Epidemiologia da infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva. Epidemiology of nosocomial infection in a intensive care unit. **Revista Panamericana de Infectologia**. V 11, n 2, p.32-37, 2009.

OLIVEIRA A.C, CARDOSO C.S, MASCARENHAS D. Precauções de contato em Unidade de Terapia Intensiva: fatores facilitadores e dificultadores para adesão dos profissionais. **Revista da Escola de Enfermagem USP**. 44(1):161-5, 2010.

ROBINSON, D.; KUMAR, P.; CADICHON, S.B. Sepsis neonatal no Departamento de emergência. **Clinica Pediátrica Medicina e Emergência**. 9 (3):160-168, 2008.

SOUZA NETO J.L.; OVEIRA F.V.; KOBASZ AK.; SILVA M.N.P.; LIMA A.R.; MACIEL L.C. Infecção do trato urinário relacionada com a utilização do cateter vesical de demora: resultados da bacteriúria e da microbiota estudadas. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgia**. 35 (1):28-33, 2008.

XAVIER, D. E. **Avaliação da expressão de sistemas de efluxo para resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa***. Universidade Federal de São Paulo, Dissertação de Mestrado, 2008.

XAVIER, D.E.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L.C.C.; GALES, A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *P.aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v.10, p.2, 2010.

XIAO, H.; YE, X.; LIU, Q.; LI, L. Antibiotic susceptibility and genotype patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from mechanical ventilation-associated pneumonia in intensive care units. **Biomedical Reports**. 1: 589-593, 2013.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, Z.; LI, J.; NATION, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.60,p.1206-1215, 2007.

7.3 ARTIGO 3: ALTAS TAXAS DE ERROS EM SISTEMA AUTOMATIZADO NA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

Altas taxas de erros em sistema automatizado na determinação da sensibilidade antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*.

Rates High of errors in automated system for the determination of antimicrobial susceptibility in Pseudomonas aeruginosa.

Eliseth Costa Oliveira de Matos¹; Ana Judith Garcia Quaresma²; Ana Cristina Gales³;
Irna Carla do Rosário Souza Carneiro⁴; Karla Valéria Batista Lima⁵

RESUMO

Numerosos estudos têm reportado variada acurácia de sistemas automatizados para o teste de sensibilidade em *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, o uso destes é mantido em muitos hospitais. Neste estudo foram avaliados os tipos e taxa de erro em sistema Vitek 2 na determinação da sensibilidade antimicrobiana em *P aeruginosa*. A concordância geral e categoria foi abaixo de 90% para todos os antibióticos. Erro muito grave foi detectado para ciprofloxacina, imipenem, cefepime, gentamicina. Foi observado taxas de erro elevadas para falsas sensibilidades aos antimicrobianos.

PALAVRAS CHAVE: Antimicrobianos; Automação; *Pseudomonas aeruginosa*.

¹Biomédica, Profa Assistente IV de Microbiologia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UEPA, Belém, Pará, Brasil, Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical/ UFPA, Belém, Pará, Brasil.

² Farmacêutica-Bioquímica, Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/ SVS/ MS.

³Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias - Coordenadora o Laboratório Alerta e é co-diretora do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, ambos pertencentes à Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo

⁴Médica Infectologista Graduada pela Universidade Federal do Pará. Doutora e Docente da Universidade do Estado do Pará-UEPA e Universidade Federal do Pará-UFPA.

⁵ Farmacêutica, Profa. Adjunto III/ UEPA, Belém, Pará, Brasil.

Introdução

Vários sistemas automatizados estão disponíveis para a identificação e teste de sensibilidade (TS) para a maioria das bactérias de importância clínica. Tais sistemas apresentam várias vantagens como praticidade, menor risco e redução do tempo para liberação dos resultados quando comparado as culturas microbiológicas convencionais. O TS contribui diretamente para o estabelecimento da terapêutica apropriada, o que resulta em melhor prognóstico do paciente e menor possibilidade de transmissão do patógeno. No entanto, a ocorrência de erros, em alguns sistemas pode ter sérias implicações para os pacientes.

Numerosos estudos têm reportado variada acurácia de sistemas automatizados para o teste de sensibilidade em *Pseudomonas aeruginosa*(2,7,9). No entanto, o uso destes é mantido em muitos hospitais. A proposta deste estudo é avaliar os tipos e taxas de erro do sistema Vitek para determinação do TS em culturas de *P. aeruginosa*.

Materiais e métodos

Foram selecionados 63 isolados de *P. aeruginosa*, obtidos de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) de hospital de referência de Belém/Pará com nível terciário de atenção à saúde.

Identificação e teste de sensibilidade bacteriana

Foram realizados por meio do Vitek2 (BioMerieux, *version* R02.03) e teste de microdiluição em caldo (8). Para garantir controle de qualidade foram utilizadas amostras de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Foram considerados nos testes os seguintes antibióticos: gentamicina (GN) e piperacilina-tazobactam (PTZ) e cefepima (CPM), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM).

Critérios interpretativos do teste de sensibilidade e de erros

Atribuiu-se a cada antimicrobiano a categoria: sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) pelo sistema Vitek-2, e a mesma categoria para a microdiluição em caldo de acordo com os critérios de interpretação do CLSI (8).

Foi considerada concordância geral (CA) quando as CIM não diferiam pelas duas metodologias, e concordância categórica (EA) quando apresentavam CIM

diferentes e concordava na mesma categoria. A categorização de erros foi aplicada com as denominações erro muito grave (EMG): a mudança da categoria de resistente (R) pelo método referência para resultado sensível (S) na categoria testada (interpretação de falsa sensibilidade pela categoria testada); erro grave (EG): quando ocorre mudança da categoria sensível (S) pela metodologia referência para resistentes (R) na categoria testada (interpretação de falsa resistência pela metodologia testada) e erro leve (EL): quando houver relação com valores intermediários. As taxas de erro foram consideradas aceitáveis quando EMG for menor que 1,5%; EG menor que 3,0% e EL menor que 10,0%(3).

Análise estatística

Os resultados da CIM obtidas pelas metodologias de microdiluição em caldo e Vitek-2 foram comparados pelo teste Qui-quadrado considerando o valor de $p < 0,05$.

O desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, CAAE 0086.0.440.000-10, Protocolo nº072/2010.

Resultados

A tabela ilustra as concordâncias nos resultados com valores percentuais das taxas de erro, valores CA, EA e tipos de erro. Percebe-se grande variação nos resultados em relação aos parâmetros de avaliação da técnica em questão. Os valores de concordância abaixo de 90% para cefepima, meropenem, piperacilina-tazobactam, gentamicina e ciprofloxacina, refletem a baixa acurácia do sistema de automação em estudo.

As taxas de EMG foram consideradas acima do aceitável para CIP, IPM, CPM e GN, enquanto o EG foi considerado elevado para PTZ, MER, e CPM

As taxas de EL se relacionam às variações nos resultados intermediários com taxa aceitável de erro menor que 10,0%. Foi observado EL para MER, CPM, PTZ e GN.

Tabela 1: Resultado da comparação entre os a Determinação da CIM do Vitek e da Microdiluição em caldo dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* frente aos seis antimicrobianos testados, isolados de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva em hospital de ensino de Belém-Pará, no período de janeiro de 2010 a março de 2012.

ANTIBIÓTICOS	Nº	%	EMG	EG	EL	EA(%)	CA(%)
	Discordância	Discordância					
CEFEPIMA	19	30,2	6,3	7,9	15,8	85,7	69,8
IMIPENEM	8	22,8	7,9	0,0	4,8	92,6	87,3
MEROPENEM	21	33,3	1,6	15,9	15,9	82,5	66,7
PIPERACILINA-TAZOBACTAM	22	34,9	1,6	19,0	14,2	79,3	65,1
GENTAMICINA	13	20,6	4,8	1,6	14,2	93,6	79,4
CIPROFLOXACINA	12	19,0	12,7	0,0	6,3	87,3	81,0

Legenda: **EMG:** Erro Muito Grave (falsa sensibilidade); **EG:** Erro Grave (falsa resistência); **EL:** Erro Leve; **EA:** Concordância categórica; **CA:** Concordância geral.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo possibilitaram identificar a baixa concordância nos dados obtidos no sistema Vitek-2, quando comparado à técnica de microdiluição em caldo. As taxas de erros obtidas estão acima do nível aceitável em um teste de sensibilidade antimicrobiana, evidenciando EMG (aceitável <1,5%) graves (aceitável <3,0%) e erro leve (aceitável <10%) na maioria dos antibióticos testados. Dados de impacto significativo para a clínica no uso de agentes antipseudomonas, interferindo na orientação da terapia empírica adequada. Seria prudente para reduzir ou eliminar a ocorrência destes erros o uso de metodologia de referência para testes de sensibilidade para este patógeno.

Joyanes et al.(6), ao analisarem 146 amostras de *P. aeruginosa*, relataram taxa de EL (13,7%), quando comparado aos outros não fermentadores. Sader et al.(9), analisando *P. aeruginosa* de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos e no Brasil, demonstrou que os sistemas automatizados Vitek 2 e Vitek apresentaram taxas elevadas de EMG 27 e 21% respectivamente, para o antibiótico PTZ, embora tenha predominado no geral erros leves nas análises observadas.

Juretschko et al.(7) compararam os dados de TS de quatro sistemas automatizados, utilizando 30 isolados de *P. aeruginosa* frente a seis antimicrobianos e

obtiveram para o Vitek-2 EL para cefepima (13,3%) e imipenem (25,0%) e EMG para piperacilina-tazobactam (21,7%). A PTZ tem sido relatada como o antimicrobiano que apresenta maiores erros na literatura.

O estudo de Torres, Villanueva, Bou (2009) (10) aplicado em 101 isolados de *P. aeruginosa*, evidenciou concordância categórica entre os métodos empregados (E-test, Disco difusão, Vitek-2) >90% e menor taxa de CA para o imipenem de 89,1%. Cabe ressaltar que na maior parte dos resultados houve concordância de 98% no Vitek-2 para PTZ com taxas de EG de 11,8%. A falta de concordância foi observada na categoria intermediária, sugerindo que seja utilizado para controle do teste, metodologia de referência para validação dos resultados.

Doern et al.(1) ao analisarem 158 amostras da espécie *P. aeruginosa* originadas de quatro laboratórios clínicos, recomendaram que os testes de sensibilidade sejam realizados com maior exatidão no momento da preparação do inóculo seguindo protocolos já existentes e padronizados(4), para obter maior precisão nos resultados do Vitek-2 quando utilizada a cartela GNS-F6. A falha no inóculo tem sido observada como uma das causas da falsa resistência aos agentes imipenem, aztreonam, piperacilina, ticarcilina e ticarcilina-clavulanato.

As principais causas de falhas podem ser atribuídas à deficiente qualificação e/ou empenho do profissional que executa os exames; má qualidade dos kits e reagentes empregados; falta de calibragem periódica dos equipamentos; erros de procedimentos na preparação do TSA, além da falta de controle e validação dos resultados da CIM(5,7,9,10). Para dirimir a ocorrência de erros, existem os critérios de controle, tais como: a qualidade de armazenamento das cartelas de antimicrobianos e tempo de validade das mesmas, preparação do inóculo bacteriano (tubo 0,5 da escala de McFarland) e as características de incubação para cada micro-organismos. Tudo complementado com atenção nos critérios de interpretação dos valores da CIM equivalentes, que representam os pontos de corte da CIM aproximados. As informações descritas nos manuais de desempenho para teste de sensibilidade antimicrobiana, estas estratégias são fundamentais no trabalho no laboratório de microbiologia para garantir a redução dos erros nos diagnósticos (4).

Há grande expectativa em melhorar a qualidade dos diagnósticos microbiológicos, tornando-os realmente mais eficientes e acurados, o que certamente continuará sendo

um dos principais desafios para o futuro. Por serem fundamentais ao diagnóstico, prognóstico e decisões terapêuticas, erros podem ocasionar danos irreversíveis.

CONCLUSÃO

Os resultados da concordância geral e categórica apresentaram valores abaixo do aceitável, destacando-se as taxas de erro elevadas para falsas sensibilidades aos antimicrobianos.

REFERENCIA

1. DOERN, G. V et al. Multicenter laboratory evaluation of the bioMérieux Vitek antimicrobial susceptibility testing system with 11 antimicrobial agents versus members of the family Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2115–9, ago. 1997.
2. GAGLIOTTI, C. et al. Accuracy of automated and manual systems for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* to piperacillin and piperacillin-tazobactam. **The new microbiologica : official journal of the Italian Society for Medical, Odontoiatric, and Clinical Microbiology (SIMMOC)**, v. 34, p. 97–99, 2011.
3. HENRY, D. A.; SMITH, J. A.; JONES, M. A. Comparison of the AMS gram-negative susceptibility flex panel GNS-V and agar disk diffusion for testing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, p. 586–587, 1987.
4. INSTITUTE, C. AND L. S. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana : 15 o Suplemento Informativo**. [s.l: s.n.]. v. 25p. M100–S15, v25, n1
5. JORGENSEN, J. H. et al. Direct Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing by the BD Phoenix , bioMérieux Vitek 2 , and Disk Diffusion Test Methods as Compared to Results Generated by the CLSI Broth Microdilution Test. **American Society for Microbiology**, p. 2–5, 2006.
6. JOYANES, P. et al. Evaluation of the VITEK 2 System for the Identification and Susceptibility Testing of Three Species of Nonfermenting Gram-Negative Rods Frequently Isolated from Clinical Samples Evaluation of the VITEK 2 System for the Identification and Susceptibility Te. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3247, 2001.
7. JURETSCHKO, S. et al. Accuracies of beta-lactam susceptibility test results for *Pseudomonas aeruginosa* with four automated systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1339–42, abr. 2007.
8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-Second Informational Supplement**. [s.l: s.n.]. v. 32p. M100–S22, v 32, n3
9. SADER, H. S.; FRITSCHKE, T. R.; JONES, R. N. Accuracy of three automated systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for susceptibility

- testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, p. 1101–1104, 2006.
10. TORRES, E.; VILLANUEVA, R.; BOU, G. Comparison of different methods of determining beta-lactam susceptibility in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. Pt 5, p. 625–9, maio 2009.

7.4 ARTIGO 4: MORTALIDADE POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
MULTIRESISTENTES: ESTUDO COMPARATIVO COM METANÁLISE.

**Mortalidade por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes: estudo
comparativo com metanálise.**

Mortality by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparative study with meta-
analysis

Título resumido: Mortalidade por *P aeruginosa* multiresistentes

Eliseth Costa Oliveira de Matos

Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de
Pós-graduação em Medicina Tropical.

Rua Bartolomeu de Gusmão 36. Bairro: Souza
Fone: (091)32762596, Celular (091) 81213375
e-mail: elisethcosta@yahoo.com.br

Regis Bruni Andriolo

Universidade do Estado do Pará. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na
Amazônia.

e-mail: regis.andriolo@gmail.com

Marília Lima da Conceição

Universidade do Estado do Pará. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na
Amazônia.

e-mail: marilimadc@msn.com

Karla Valéria Batista Lima

Universidade do Estado do Pará. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na
Amazônia.

e-mail: karlavaléria_2007@hotmail.com

Irna Carla do Rosário Souza Carneiro

Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de
Pós-graduação em Medicina Tropical.

e-mail: irnajula@gmail.com

RESUMO

OBJETIVO: Analisar a ocorrência da mortalidade associada à infecção por *P. aeruginosa* multirresistentes (PAMR) e presença do gene blaSPM-1.

METODOLOGIA: Estudo coorte retrospectivo, com isolados de *P. aeruginosa* (PA) proveniente de pacientes internados no hospital de ensino de Belém-Pará, dados comparados à metanálise.

RESULTADOS: Foram analisados 54 isolados de *P. aeruginosa* distribuídos em 20 (37,0%) PAMR e 34 (63,0%) PA não multirresistente (MR), nos diferentes sítios de infecção. Na metanálise o total de 2.407 isolados de *P. aeruginosa*, com taxa de mortalidade de 70% para MR e 58,9 para não MR, mostra maior percentual de óbito entre os pacientes com infecção por PAMR (41,5%) quando comparado aos PA não MR (23,6%) com OR de 2,16 e intervalo de confiança (IC) de 1,54 a 3,03 ($p < 0,00001$).

CONCLUSÃO: As cepas MR apresentaram taxa de mortalidade maior, com duas vezes mais chances de ter óbito, sendo a multirresistência um fator de mau prognóstico em pacientes com infecção por PAMR. A ausência de dados de PA produtora de M β L gene blaSPM-1 e sua associação com o óbito, não foram suficientes para a análise por falta de dados de caracterização molecular do gene em questão.

Descritores: *Pseudomonas aeruginosa*. Unidade de Terapia Intensiva. Coeficiente de mortalidade.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze the mortality occurrence associated with infection by multi-resistant *P. aeruginosa* (MRPA) and presence of the SPM-1 gene.

METHODS: Retrospective cohort study, using isolates of *P. aeruginosa* (PA) obtained from infected inpatients in a teaching hospital located in Belém-PA-Brazil, data were compared by meta-analysis.

RESULTS: There were analysed 54 *P. aeruginosa* distributed into 20 (37,0%) MRPA and 34 (63,0%) PA non MR in the different infection sites. The meta-analysis showed that from the 2.407 total of *P. aeruginosa* isolates there is a higher death percentage among patients infected by multi-resistant *P. aeruginosa* (41,5%) than when compared with the PA non multi-resistant (MR) (23,6%), with a 2,16 odds ratio (OR) and confidence interval (CI) 1.54 to 3.03 (p<0,00001).

CONCLUSION: The multi-resistant *P. aeruginosa* strains showed higher mortality rate, with two times higher chances of death, this is a risk factor that contributes to the increase of hospital mortality among patients with *P. aeruginosa* infection.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Intensive Care Units, Mortality Rate.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno versátil, amplamente isolado nos hospitais em todo o mundo e associado a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). É responsável por causar infecções hospitalares com elevadas taxas de mortalidade em pacientes graves incluindo também pacientes de enfermarias gerais e ambulatorios¹⁻³. Nas últimas décadas tem sido muito discutido a resistência deste micro-organismo aos antimicrobianos. Publicações em âmbito mundial destacam o aumento da resistência aos carbapenêmicos e as cefalosporinas anti-*pseudomonas* de amplo espectro de uso hospitalar^{5,6,11}.

Tem-se observado que a resistência bacteriana esta diretamente relacionada à gravidade da infecção e da doença de base, assim como à terapêutica antibiótica empregada. Ademais, a complexidade associada aos mecanismos de resistência da bactéria aos antimicrobianos, contribui para elevação gradativa da taxa de resistência, hoje alarmante no ambiente hospitalar^{9,16,19}.

São múltiplos os mecanismos de resistência utilizados por *P. aeruginosa* que têm contribuído para o aumento da mortalidade, entre eles tem-se, a produção de beta-lactamases (metalo- β -lactamases) e enzimas de relevância clínica. Geralmente ocorrem associadas com maior tempo de hospitalização, infecções polimicrobianas e uso prévio de antimicrobianos. A ativação dos sistemas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana externa, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e alteração do alvo de fluoroquinolonas também contribuem para o fenótipo de resistência bacteriana^{2,19}.

Nos últimos tempos, as metalo- β -lactamases (M β Ls) emergiram como um dos mecanismos de resistência mais temidos devido a sua capacidade para hidrolisar praticamente todos os agentes β -lactâmicos, com exceção do aztreonam, aspecto relevante, pelo fato deste genótipo ser transferido por elementos genéticos móveis, favorecendo a rápida disseminação entre as bactérias Gram negativas. Até o momento já foram identificados seis grandes grupos clinicamente importantes de M β Ls: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, KHM, TMB, DIM e recentemente descoberto a variante FIM-1, em isolado clínico na Itália. Tais variantes de MBLs se espalharam rapidamente por toda a Europa, seguida da América Latina e Estados Unidos^{3,11,19}.

Recentemente, as M β Ls têm sido descritas na América do Norte e Oceania, enquanto que a sua prevalência continuou aumentando em muitos países de outros continentes, refletindo um problema com dimensão mundial. A propagação destas enzimas nas infecções por bacilos Gram negativos não fermentadores, de origem hospitalar, em particular a espécie *P. aeruginosa*, tem limitado severamente as opções terapêuticas. Alguns estudos têm demonstrado mortalidade significativa quando comparadas infecções por cepas de *P. aeruginosa* produtoras de M β L^{3,19}. A emergência de cepas multiresistentes produtoras de M β L, mostra a necessidade de mudanças no diagnóstico laboratorial com a investigação da produção desta enzima na rotina do laboratório, e de suas variantes como a SPM-1, por ser a mais isolada no Brasil e investigar sua relação com o óbito. A proposta do estudo foi analisar a ocorrência de mortalidade associada à infecção por *P. aeruginosa* multiresistentes (PAMR), o impacto clínico da MR e presença do gene blaSPM.

2 MÉTODOS

O trabalho realizado no hospital de ensino consiste em um estudo do tipo Coorte retrospectivo. Além disto, foi aplicada a metanálise dos estudos da mesma natureza, para avaliar a concordância do cenário desta investigação regional realizado em Belém do Pará, com os dados dos demais trabalhos selecionados. Na expectativa de maior certeza de que a infecção por PAMR, quando comparado com o outro tipo PA não MR, contribuem como um dos fatores determinantes para o óbito.

Foram analisados neste estudo, pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com infecção relacionada a assistência à saúde (IRAS) por *P. aeruginosa*, no período de janeiro de 2010 a março de 2012 em hospital de ensino de Belém-Pará. O grupo de “expostos” foi constituído por pacientes com infecção por PAMR produtoras ou não de M β L gene blaSPM-1 e os “não expostos” constituídos de pacientes com infecção por PA não MR.

Foi considerado como MR a ocorrência de resistência a pelo menos três antimicrobianos de diferentes classes como: carbapenemas (imipenem, meropenem) cefalosporinas anti-pseudomonas (ceftazidima e cefepime), fluoroquinolona (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina e ampicacina), β -lactâmicos com inibidor (piperacilina-tazobactam).

Para este artigo foram analisados estudos originais, publicados em inglês e que apresentavam os termos utilizados para pesquisa: *P. aeruginosa* MR (*multiresistance*), gene blaSPM-1, mortalidade (*mortality*). Os estudos foram analisados com base nas normas de

metanálise constantes no *Cochrane Handbook for Systematic Review of Intervention section*, editado por HIGGINS e GREEN, 2001⁴. Os resumos foram examinados pelo autor e por mais um revisor. Foram consultadas as bases de dados PUBMED, MEDLINE, BIREME, EMBASE. Foram incluídos prioritariamente artigos publicados no período de 2006 a 2013.

Os dados extraídos dos artigos foram por número de pacientes com infecção por PAMR e não MR, número de óbitos respectivamente, número de cepas produtoras do gene blaSPM-1 e número de óbitos relacionados. Foram extraídos de cada estudo: autor, período do estudo, desenho do estudo, país, unidade de internação, população estudada, definições sobre óbito e sítio de infecção.

Nos casos em que não houve concordância entre os revisores, foram realizadas discussões específicas, até o consenso. Os revisores não estavam cegos para os autores, instituições e jornais de publicação. Não foram incluídos estudos não publicados ou de comunicação pessoal.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do cálculo do *odds ratio*, com teste de Mantel-Haenszel e intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para comparar os pacientes com infecção por PAMR com PA não MR. O Gráfico de floresta (*forestplot*) foi produzido pelo Review Manager 5.0.

O desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CAAE 0086.0.440.000-10 Protocolo nº072/2010.

3 RESULTADOS

Entre os pacientes analisados na coorte retrospectivo, 31/54 (57,4%) foram provenientes da UTI adulto, 15/54 (27,8%) da UTI neonatal e 8/54 (14,8%) da UTI pediátrica. A distribuição dos isolados de PAMR e PA não MR por espécimes clínicos e por UTI analisados são apresentados na tabela 1.

Obteve-se um total de expostos a infecção por PAMR de 20/54 (37,0%) e de não expostos de 34/54 (63,0%), com taxa de mortalidade de 14/20 (70,0%) para PAMR e 20/34 (58,9%) para PA não MR.

A UTI neonatal não apresentou casos de infecção por PAMR, apresentando 100% dos casos com isolados sensíveis. Um aspecto importante foi a maior ocorrência de infecção de corrente sanguínea, com 13/15 (86,7%) entre os recém-nascidos, com taxa de mortalidade de 9/34 (26,5 %) (tabela 1).

Tabela 1- Distribuição dos 54 casos de IRAS por *P. aeruginosa* em UTI e evolução para o óbito no hospital de ensino de Belém-Pará.

Sítios de IRAS	UTI Adulto PAMR N (%)	UTI Ped PAMR N (%)	Total PAMR N (%)	UTI Adulto PA não MR N (%)	UTI Ped PA não MR N (%)	UTI Neo PA não MR N (%)	Total PA não MR N (%)
ITU	2 (12,5)	1 (25,0)	3 (15,0)	2 (13,3)	0	0	2 (5,9)
ITR	9 (56,2)	1(25,0)	10 (50,0)	9 (60,0)	3 (75,0)	2 (13,3)	14 (41,2)
ICS	5 31,3)	2 (50,0)	7 (35,0)	4 (26,7)	1 (25,0)	13 (86,7)	18 (52,9)
Total	16 (100,0)	4 (100,0)	20 (100,0)	15 (100,0)	4 (100,0)	15 (100,0)	34 (100,0)
Evolução (óbito)	13 (65,0)	1 (5,0)	14/20 (70,0)	10 (29,4)	1 (2,9)	9 (26,5)	20/34 (58,9)

Legenda - ICS: Infecção de Corrente Sanguínea. IRAS: Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. ITR: Infecção do Trato Respiratório. ITU: Infecção do Trato Urinário. MR: Multirresistentes. Neo: neonatal. Ped: Pediátrica. UTI: Unidade de Terapia Intensiva.

Para efeito comparativo pela metanálise, foi realizada pesquisa de banco de dados selecionando 2677 estudos, destes foram excluídos 2667 por ausência de informação sobre mortalidade associada à produção de M β L. Foram selecionados 10 estudos para a análise, apresentados na tabela 2. Os resultados desta investigação foram comparados com os estudos selecionados pela metanálise e analisou-se o número de óbitos nas infecções por *P. aeruginosa* (tabela 2).

1 **Tabela 2 - Descrição dos estudos elegíveis para metanálise.**

Autores	Período do estudo	País	Desenho do estudo	Unidades de internação	População estudada	Definições sobre óbito	Taxa de óbito MR	Taxa de Óbito Não MR
Zawaski 2005	Set2004- jun 2005	Brasil (RS)	PO	Dois Hospitais terciários de Porto Alegre	> 18 anos com fibrose cística.	30 dias	51,2	37,6
Tam 2010	Jan 2005-dez 2008	EUA	CR	Dois hospitais universitários	> 18 anos com bacteremia	30 dias	40,0	11,9
Trecarich 2011	2009	Itália	CP	Nove Centros terciários	adultos com neoplasias hematológicas	30 dias	40,7	9,1
Joo 2011	Out 2006- mar 2009	Coréia do Sul	CP	Hospital terciário universitário	> 16 anos com bacteremia UTI e uso de ventilação mecânica.	30 dias	38,1	21,9
Gomes 2011	Abr 2002- fev 2007	Brasil (RJ)	CP	Hospital universitário	Adultos, HIV positivo. UTI e enfermaria	30 dias	73,3	3,8
Tumbarello 2011	Jan 2006-dez 2007	Itália	CR	Dois Hospitais Universitários	Adultos, bacteremia síndrome de resposta inflamatória sistêmica	21 dias	50,0	39,4
Peña 2012	Jan 2008- dez 2009	Espanha	CR	Estudo multicentro 10 hospitais	> 18 anos com bacteremia	30 dias	35,2	27,1
Morata 2012	Jan 2000- dez 2008	Espanha	CR	Hospital universitário	Adulto com Bacteremia.	30 dias	32,3	17,2
Peña 2013	Jan.2006 - dez 2011	Espanha	CR	Hospital Universitário, terciário	Adultos com ventilação mecânica	30 dias	50,0	54,8
Caselli 2012	Jan 2000 - out 2008	Itália	CR	12 Centros hospitalares (AIEOP)	Pediátricos, que receberam antineoplásicos, quimioterapia e TCHT.	30 dias	35,9	12,5
Matos 2014	Jan 2010 - mar 2012	Brasil (Pará)	CCA	Hospital de ensino do Estado do Pará	UTI Adulto, pediátrica e neonatal	30 dias	70,0	58,9

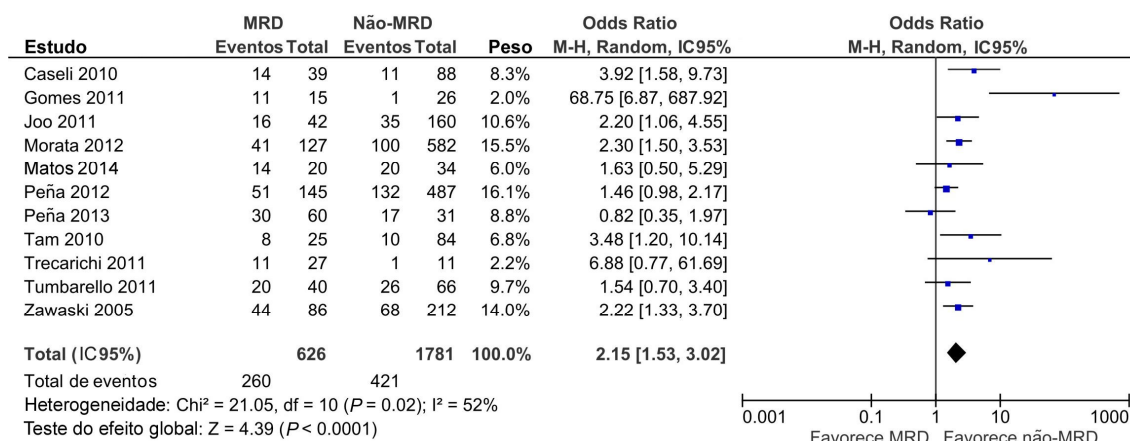
Tabela 3 – Total de pacientes com infecção por PAMR e PA não MR produtores de M β L gene blaSPM-1 e respectivos números absolutos de óbitos.

Autores	Isolados PAMR	Óbitos por PAMR	Isolados PA não MR	Óbitos por PA não MR	Isolados blaSPM-1	Óbitos por blaSPM-1
Zawaski 2005	86	44	212	68	DI	DI
Caseli 2010	39	14	88	11	DI	DI
Tam 2010	25	8	84	10	DI	DI
Gomes 2011	15	11	26	1	7	5
Joo 2011	42	16	160	35	DI	DI
Tumbarello 2011	40	20	66	26	DI	DI
Trecarichi 2011	27	11	11	1	DI	DI
Peña 2012	145	51	487	132	DI	DI
Morata 2012	127	41	582	100	DI	DI
Peña 2013	60	30	31	17	DI	DI
Matos 2014	20	14	34	20	4	0
Total	626	260	1781	420	11	5

Legenda - DI: dados indisponíveis. PAMR: *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. PASPM-1: *Pseudomonas aeruginosa* gene blaSPM-1.

A metanálise, ilustrada em um gráfico de floresta (*forestplot*), demonstra maior proporção de óbitos entre pacientes com PAMR (41,5%, 260/626), quando comparados aqueles PA não MR (23,6%, 420/1781), conforme demonstrado pela razão de chance (OR, *oddsratio*) de 2,16 e intervalo de confiança a 95% de 1,54 a 3,03 ($p < 0,00001$). As ausências de diferenças estatísticas significativas entre os grupos, para os estudos individuais, são demonstradas pelos intervalos de confiança (linhas horizontais) que incluem a linha da hipótese nula (linha vertical). Apesar da substancial heterogeneidade estatística ($I^2 > 52\%$), somente Peña (2013)¹⁰ apresenta estudo com dados em direção de efeito em favor do grupo sem PAMR (com maior proporção de óbito neste grupo), mas sem significâncias estatísticas em suas estimativa (OR 0,82 -IC 95% 0,35-1,97) figura 1.

Figura 1 – Razões de chance para mortalidade entre pacientes com infecção por *P. aeruginosa* com fenótipo de PAMR comparado aos PA não MR.

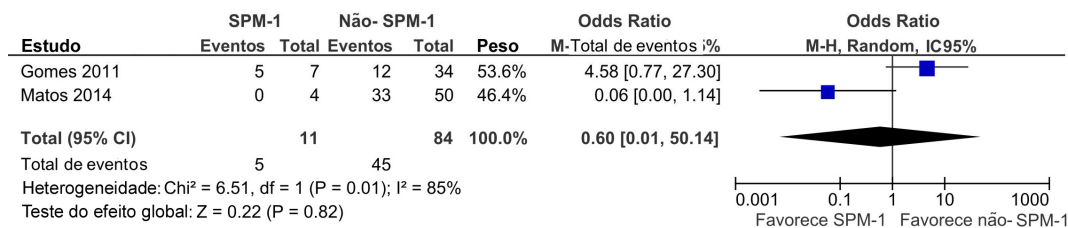


Legenda- MRD: multirresistencia as drogas, M-H: Mantel-Haenszel, CI: Intervalo de confiança,

A figura 2 demonstra menor e maior probabilidade de morte entre pacientes não-SPM em (Gomes 2011) 3 e Oliveira (2013), respectivamente, quando comparados aos pacientes SPM. Entretanto, em nenhum estudo houve diferença estatística significativa entre os grupos de comparação, conforme observado pelas linhas horizontais (intervalos de confiança), que interceptam a linha da hipótese nula.

As direções de efeito contrárias e teste de inconsistência demonstram grande heterogeneidade entre os estudos ($I^2=85\%$), como resultado das prováveis heterogeneidades clínicas e metodológicas entre as investigações.

Figura 2 – Razões de chance para mortalidade entre pacientes com infecção por *P. aeruginosa* com fenótipo de MR produtor de M β L, SPM-1 comparado aos não MR não produtores da enzima.



Legenda- CI: intervalo de confiança M-H: Mantel-Haenszel. MR: multirresistentes. M β L: metalo- β -lactamase. SPM: São Paulo metalo- β -lactamase.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo selecionou um número de artigos originais para análise, combinando e realizando uma síntese dos resultados baseados nas variáveis de PAMR relacionando-os com a mortalidade. Na metanálise dos dados observamos que as infecções por *P. aeruginosa* resultaram em taxas de mortalidade elevadas nos casos com infecção por PAMR quando comparadas as infecções por PA não MR. As infecções por *P. aeruginosa* são de natureza oportunista, consideradas entre as que apresentam elevada mortalidade num contexto mundial. Este patógeno apresenta estreita relação com infecções hospitalar em pacientes graves, considerando que atinge também indivíduos imunocompetentes.^{10,14,16}

No estudo do hospital de ensino as infecções de corrente sanguínea foram identificadas como a de maior frequência entre os pacientes de UTI neonatal. Entre os trabalhos selecionados, nenhum avaliou esta faixa etária (neonatal). No entanto, um estudo realizado na Itália em 12 centros hospitalares de hematologia e oncologia, descreveu uma série retrospectiva de nove anos de infecções de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* em crianças, que apresentavam diagnóstico de câncer na oncologia pediátrica, e teve como taxa de mortalidade 35,8% dos casos de infecção com MR. Nesta investigação foi enfatizado que a infecção por este patógeno é uma grande preocupação em pacientes submetidos a quimioterapia, mesmo tendo na antibioticoterapia empírica pelo menos um fármaco ativo, e a multiresistência representa maior fator de risco para um desfecho fatal¹.

Entre os pacientes neonatos no hospital de ensino, o óbito ocorreu com maior frequência nos casos de bacteremia por PA não MR, com taxa de mortalidade de 86,7% (13/15). Pela peculiaridade da característica da população da UTI neonatal, observaram-se poucos registros na literatura, quanto ao comportamento destes micro-organismos resistentes. O suporte de vida destes pacientes requer cuidados especiais, tanto direto como indireto, embora apresente um quadro de imunodepressão crítico e algumas vezes tempo de permanência prolongado¹⁵. Mesmo com todas as características citadas de imunodepressão, observou-se que nesta população não ocorreu casos de MR, aspecto importante do ponto de vista clínico, com taxa de mortalidade total de 26,5% (9/34) entre os não MR, indicando que o fator mortalidade está associado a outros indicadores que não diretamente a multirresistência bacteriana.

Ao contrário do estudo acima, uma investigação realizada na Índia em 2006, obteve em 593 hemoculturas positivas, destes 286/593 (48,22%) foi isolado *P. aeruginosa*, com 63,6% MR. O estudo também destacou o aumento da ocorrência de MβL na região

representando um grande problema terapêutico²⁰. Nos dados regionais foi reportada a maior ocorrência de infecção na UTI adulto, predominando as infecções do trato respiratório (ITR) e urinárias (ITU), classicamente reconhecidos como sítios de infecções prevalentes no cenário das unidades críticas na população adulta com taxa de mortalidade de 65,0% (13/20). No entanto, a maioria dos estudos selecionados elegeu no desenho a corrente sanguínea como sítio de infecção. As ICS elevam muito os custos para o hospital, pela complexidade dos casos e tempo de internação prolongado e são agravados pelo desfecho muitas vezes desfavorável. As elevadas taxas de mortalidade relatadas nos artigos selecionados consideram como preditores a imunodeficiência grave, idade > 80 anos, terapia antimicrobiana nos 30 dias anteriores, terapia empírica inadequada, presença de cateter vascular central^{3,7,8,16,18}.

Corroborando com dados da literatura foi reportado no hospital de ensino, o total de infecções do trato respiratório 44,4% (24/54) sendo 41,7% (10/24) causadas por cepas MR. A infecção do trato respiratório inferior está entre os principais sítios de infecção por *P. aeruginosa* em pacientes adultos. Este micro-organismo está associado à patogênese da infecção em pacientes submetidos à ventilação mecânica, e é importante fator de risco da infecção. A taxa de mortalidade entre os casos de pneumonia, fica em torno de 30 a 70%^{10,18}. Os estudos evidenciam a relação da infecção com a terapia inadequada como fator determinante no processo saúde-doença. Os pacientes com terapêutica adequada apresentaram melhor prognóstico^{9,10,16,17,18}.

Embora heterogênea, as populações estudadas apresentaram aspectos em comuns como a imunodepressão favorecida pela característica clínica do paciente, doença de base, uso de imunossuppressores, terapia antimicrobiana, terapia empírica inadequada, uso de procedimentos invasivos e a faixa etária^{3,8,11}. Além da infecção por *P. aeruginosa* multiresistentes, as principais características clínicas observadas nos estudos, foram os pacientes HIV positivo com diversas complicações, neoplasia hematológica, fibrose cística, em uso de ventilação mecânica e pacientes neonatos, justificando o teste de inconsistência (I2=85%) mostrando grande heterogeneidade entre os estudos^{1,3,8,10}.

Zavascki et al, (2005)¹⁸ relata que os pacientes com infecções por PA produtora de enzima MβLs apresentam maior mortalidade quando comparados aqueles com infecção por não produtores da enzima, frisando a importância da adequada terapia antimicrobiana inicial para reduzir o índice de mortalidade. Na realização da metanálise foi possível constatar a limitação de alguns estudos por não delinear de forma completa o conceito de MR e nem detectar as cepas produtoras da enzima MβL variante SPM-1, dados que impossibilitaram a análise específica da relação de produção da enzima com relação à mortalidade.

Os dados demonstrados no gráfico *florestplot* mostram resultado de menor e maior probabilidade de óbito entre os pacientes com infecção por PAMR produtora de M β L variante SPM-1 como visto pelos dois estudos que investigaram neste aspecto^{3,12}. São dados insuficientes para uma análise mais concreta, em relação a taxa de mortalidade associada a produção da enzima M β L, por ser um dos mecanismos de resistência do patógeno em questão, demonstrando a necessidade de investigações a cerca da produção da enzima e sua relação com o óbito na literatura, considerando que está disseminada no Brasil e analisar com uma amostragem maior o efeito sobre o óbito. É notório que a exposição aos antimicrobianos predispõe os pacientes à infecção com cepas de PAMR produtoras da enzima, a pressão seletiva tem contribuído para o aumento e disseminação deste patógeno e expressão de diferentes genes de resistência^{1,7,16,18}.

Mesmo com o aumento da prevalência de *P. aeruginosa* produtora de M β L em diferentes regiões, ainda é pouco conhecido o comportamento clínico das infecções por este patógeno. A relevância deste conhecimento se dá na hipótese de que a produção desta enzima esteja relacionada aos desfechos de óbito, aumentando a taxa de mortalidade hospitalar. Neste estudo não houve significância estatística na produção desta enzima versus mortalidade, justificado pelo pequeno número dos estudos que realizaram a detecção do gene. O que reforça a necessidade de mais investigação neste contexto com detecção da M β L gene blaSPM-1, com número amostral representativo para análise.

Um outro aspecto relevante é a elucidação dos fatores de risco associados com a aquisição de infecção por *P. aeruginosa* resistentes. O Tempo de internação, a doença de base, procedimento de hemodiálise, ventilação mecânica, uso de antimicrobianos e intervenções terapêuticas invasivas são todos os riscos conhecidos para a aquisição desta infecção e tem contribuído para a gravidade do paciente à adquirir infecção por *P. aeruginosa*.

A prevalência de PAMR foi elevada entre as populações estudadas, a metanálise, revelou alta proporção de óbito entre os isolados MR quando comparado aos não MR. O total de óbito nos pacientes do hospital regional foi elevada entre os pacientes com infecção por PAMR com taxa de mortalidade de 70%, em contra partida, na UTI neonatal o óbito ocorreu nos casos de infecção por PA não MR com taxa de mortalidade de 58,9%, sem casos de multirresistência nesta população.

Foi observada a heterogeneidade da população estudada na metanálise, evidenciando as características particulares de cada estudo pela condição de imunodepressão por diferentes situações de co-morbidades, com taxas de mortalidade elevadas entre os MR, com

necessidade nesta linha de pesquisa, na população de neonatos, pela particularidade da população e freqüentes infecções hospitalares por este patógeno.

A análise das amostras por produção da enzima M β L variante SPM-1 versus mortalidade, não permitiu obter dados suficientes a partir dos estudos primários. A falta da investigação das características moleculares do patógeno, nos estudos publicados limita a análise da associação da expressão do gene SPM-1 com a mortalidade.

5 CONCLUSÕES

A prevalência de PAMR foi elevada entre as populações estudadas, sendo a multirresistência um fator de mau prognóstico para pacientes com infecção por *P. aeruginosa*. Foi observada heterogeneidade da população estudada na metanálise, que mostrou as características particulares de cada estudo pela condição de imunodepressão por diferentes situações de co-morbidades, com taxas de mortalidade elevadas entre os MR, com necessidade de mais estudos, na população de neonatos, pela particularidade da população e freqüentes infecções hospitalares por este patógeno.

A análise das amostras por produção da enzima M β L gene blaSPM-1 versus mortalidade, não permitiu obter dados suficientes a partir dos estudos primários. A falta da investigação das características moleculares do patógeno, nos estudos publicados limitaram a análise da associação da expressão do gene blaSPM-1 com a mortalidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Caselli D; Cesaro S; Ziino O, Zanazzo G; Maniconne R.; LIVADIOTTI S, et al., Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in children undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010;95(9):1612- doi:10.3324/haematol.2009.020867.
2. Furtado GHC, Bergamasco MD, Menezes FG, Marques D, Silva A, Perdiz LB, et al., Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: Risk factors and mortality. *J Crit Care*. 2009;24:625.e9–625.e14. doi:10.1016/j.jcrc.2009.03.006.
3. Gomes MZR, Machado CR, Conceição MS, Ortega JA, Neves SMFM, Lourenço MCS, Asensi MD. Outbreaks, persistence, and high mortality rates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a hospital with AIDS-predominant admissions. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(4):312-322. doi.1413-86702011000400003.
4. Higgins JPT, Green S. Cochrane Handbook for Systematic Review of Intervention section. 2011, Versão 5.1.0
5. Hirsch EB, Cottreau JM, Chang K, Caeiro J-P, Johnson ML, Tam VH. A model to predict mortality following *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72:97-102. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.018.
6. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2010;10(4):441-451. doi:10.1586/erp.10.49.
7. Joo E, Kang C, Há YE, Kang SJ, Park SY, Chung DR et al., Risk factors for Mortality in Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Clinical Impact of Antimicrobial Resistance on Outcome. *Microbial Drug Resistance*. 2011;17(2). DOI: 10.1089/mdr.2010.0170.
8. Morata L, Cobos-Trigueros N, Martínez JA, Soriano A, Almela M, Marco F. et al., Influence of Multidrug Resistance and Appropriate Empirical Therapy on the 30-Day Mortality Rate of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;56(9):4833-4837. doi:10.1128/AAC.00750-12.
9. Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V. et al., Prospective Multicenter Study of the Impact of Carbapenem Resistance on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012:1265-1272. doi:10.1128/AAC.05991-11.

10. Peña C, Gómez-Zorrilla S, Oriol I, Tubau F, Dominguez MA, Pujol M, Ariza J. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:413-420. doi 10.1007/s10096-012-1758-8.
11. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolinia M. FIM-1, a New Acquired Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*.2013;57(1): 410-416.doi:10.1128/AAC.01953-12.
12. Sharma M, Yadav S, Chaudhary U. Metallo-beta-lactamase producing *P. aeruginosa* in Neonatal Septicemia. *J Lab Physicians*. 2010; 2 (1):14-16. doi:10.4103/0974-2727.66701.
13. Suárez C, Peña C, Gavalda L, Tubau F, Manzur A, Dominguez MA, et al., Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis*. 2010;14S:e73-78. doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.019.
14. Tam VH, Rogers CA, Chang K-T, Weston JS, Caeiro J-P, Garey KW. Impact of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia on Patient Outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(9):3717–3722. doi:10.1128/AAC.00207.
15. Trecarichi EM, Tumbarello M, Caira M, Candoni A, Cattaneo C, Pastore D. et al., Multidrug resistant *P. aeruginosa* bloodstream infection in adult patients with hematologic malignancies. *Hematologica*. 2011;96(1):e1-3. doi:10.3324/haematol.2010.036640.
16. Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, et al., Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. *Epidemiol Infect*. 2011;139:1740–1749. doi:10.1017/S0950268810003055.
17. Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Macas A, Sakalauskas R. *Pseudomonasaeruginosa*bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality.*Medicina (Kaunas)*.2010;46(7):490-5. doi:10.1086/377200.
18. Zavascki AP. Influência da produção de metalo- β -lactamases na mortalidade de pacientes com infecções nosocomiais por *Pseudomonas aeruginosa*. Tese Doutorado, UFRS, 2005.
19. Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro ALD, Gonçalves ALS, et al., The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial

Pseudomonas aeruginosa infections. **JAntimicrob** Chemother. 2006;58:387-392. doi:10.1186/cc5006.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo retrospectivo de 2005 a 2010, foram encontrados 49 grupos de micro-organismos no período estudado, sendo o *Staphylococcus* sp. coagulase negativo o primeiro mais isolado nas UTIs adulto, pediátrica e neonatal, seguido da espécie *P. aeruginosa* que foi considerado o segundo agente responsável por infecção na UTI do hospital, com elevada resistência aos antibióticos. Nesta descrição foi possível identificar a maior ocorrência de IRAS na UTI adulto. A infecção de corrente sanguínea foi a mais frequente na UTI NeoPed e na UTI adulto predominou a infecção respiratória.

A avaliação comparativa dos resultados do sistema Vitek-2 permitiu observar dados de concordância geral e categórica com valores abaixo do aceitável, e taxas de erro elevada para falsa sensibilidade, implicando na necessidade de reavaliar os procedimentos na preparação da amostra, o controle de qualidade do aparelho, uso de cepas padrões para garantia de qualidade dos resultados periodicamente,

Na metanálise foi observada a heterogeneidade da população estudada, que mostrou as características particulares de cada estudo pela condição clínica. No entanto a análise das amostras produtoras de MBL gene blaSPM-1 versus mortalidade, não permitiu obter dados suficientes a partir dos estudos primários. A falta da investigação das características moleculares do patógeno, nos estudos publicados limitaram-se na análise da associação da expressão do gene blaSPM-1.

O registro das amostras produtoras de metalobetalactamases blaSPM-1 na Região Norte do Brasil, merece uma atenção especial no tocante à possibilidade de surgimento de novos casos em um futuro próximo, alterando a conduta terapêutica nestas infecções e servindo, ainda, de alerta para motivar ações necessárias à prevenção da disseminação destes microrganismos. Da mesma forma, com que configura a necessidade da utilização, em rotina de laboratórios clínicos, de testes para a detecção preliminar de linhagens produtoras de MBL que sejam práticos e aplicáveis.

Os resultados obtidos neste trabalho, destacam a importância de estudos epidemiológicos contínuos desse patógeno, com a finalidade de se evitar a instalação de surtos e expressão de novos mecanismos de resistência às drogas.

9 REFERÊNCIAS

AL-MARJANI, M.F.; KHALIL, M.A.; JAZAR, Z.H.; HASSEN, Z.N. Detection of Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates producing IMP-1 Metallo- β -Lactamase in some Baghdad hospitals. **Tikrit Journal of Pure Science**. v15, n (1), 2010.

AMATO NETO V.; NICODEMOS A.C.; LOPES, H.V. **Antibiótico na Prática Clínica**. 6ª Edição, São Paulo, Editora Sarvier, 2007.

ANZAI, Y; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonas based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**. v.50, p. 1563-89, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Modelo1: **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico**, 2007. (Pesquisado em: 10/05/2014) Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/penicilinas.htm.

ARORA, D.; JINDAL, N.; KOMAR, R.; ROMIT. Emerging antibiotic resistance in pseudomonas-A challenge. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v 3, issue 2, p. 82-84, 2011.

APPLEGREN, P.; HELLSTROM, I.; WEITZBERG, E.; SODERLUND, V.; BINDSLEV, L.; RANSJO, U. Risk factors for nosocomial intensive care infection: a long-term prospective analysis. **Acta Anaesthesiology Scandinavian** v.45, p.710-719, 2001.

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient Test for Screening Metallo- β -lactamase-Producing Gram-negative Bacteria By Using Thiol Compounds. **Journal Clinical Microbiology**. v.38, n.1, p.40-43, 2000.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Bio-Médicas. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá/ MCT/CNPq- Belém-Pará-Brasil, 2007.

BARROS, L.M.B. BENTO, J.N.C.; CAETANO, J.C.; MOREIRA, R. A.N.M.; PEREIRA, F.G. F. FROTA, N. M. ARAÚJO, T.M.; SOARES E. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**. 33(3): 429-435, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº 2616/GM Em, 12 de maio de 1998. **Que dispõe da obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do país, de Programa de Controle de Infecções Hospitalares**, 1998.

BURJANADZE, I.; KURTSIKASHVILI, G.; TSERETELI, D.; TSERTSVADZE, E.; KEKELIDZE, M.; IMNADZE, P.; BESSER, J.; RHAME, F. *Pseudomonas aeruginosa* infection in an intensive care unit. **International Journal of Infectious Control**. v.3, n.1, p.1-3, 2007.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.39, n.6, p. 1211-1233, 1995.

CARMELI, Y.; TROILLET, N.; ELIOPOULOS, G.M.; SAMORE, M.H. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 43 (6): 1379-82, 1999.

CASTANHEIRA, M. **Caracterização de genes que codificam beta-lactamases mediadas por integrons de classe 1 em amostras de *Pseudomonas aeruginosa***. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 87 f. Tese (Doutorado), 2005.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; JONES, RN.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new

subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.48, n.12, p.4654-61, 2004.

CAVALCANTI, F.L.S.; ALMEIDA, A.C.S.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C.; JUNIOR, M.A.M. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v107, n3, p.420-3, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats** - Meeting the Challenges of Drug-Resistant Diseases in Developing Countries Committee on Foreign Affairs Subcommittee on Africa, Global Health, Human Rights, and International Organizations. United States House of Representatives. 23, 201 in the United States, 2012.

CLIMACO, E.C. **Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2011.76f. Tese (Doutorado).

CORNELLIS, P. ***Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology***. Vrije Universiteit, Brussel, Belgic, Craiser Academic. Copyright, Caiser Academic Press, Norfolk, UK, 2008.

CORNAGLIA, G.E.; ROSSOLINI, G.M. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens. **Clinical Microbiology Infectious**. 16:99-101, 2010.

CRIVARO, V.; POPOLO, A.D.; CAPRIO, A.; LAMBIASE, A.; RESTA, M.D.; BORRIELLO, T.; SCARCELLA, A.; TRIASSI, A.; ZARRILLI, R. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 9, n.70, p.1-7, 2009.

CHIAVONE PA, SENS YAS. Evaluation of APACHE II system among intensive care patients at as teaching hospital. **Sao Paulo Med J**.121(2):53-7, 2003.

CHALSON, M.C.; POMPEI, P; ALES, K.L; MACKENZIE. C.R.A. new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. **Journal Chronic Diseases**. v40, n 5, p.373-383, 1987.

DALTOÉ, T.; KUCHENBECKER, R.S.; WAGNER, M.B. **Métodos de vigilância epidemiológica de infecções hospitalares utilizados pelos hospitais de Porto Alegre**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 107.f. Dissertação (Mestrado).

DEPLANO, A.; DENIS,O.; POIREL, L.; HOCQUET, D.; NONHOFF, C.; BYL, B.; NORDMANN, P.; VINCENT, J.L.; STRUELENS, M.J. Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic- Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Clinical Microbiology** v.43, n.3, p.1198-1204, 2005.

DIAS, D. J. A. **Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram negativo**. Universidade Nova Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dissertação de Mestrado, 2009

DRAWZ, S.M.; BONOMO, R.A. Three Decades of β -Lactamases Inhibitors. 23(1):160-201, 2010 DRAWZ, S.M.; BONOMO, R.A. Three Decades of β -Lactamases Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p.160-201, 2010.

EGUCHI, H.; MIYAMOTO, T.; KUWAHARA, T.; MITAMURA, S.; MITAMURA, Y. Infectious conjunctivitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a bathroom. **BMC research notes**. v 6, n 1, 245, 2013.

EL SALABI, A. *et al.*, Novel subclass of a group B1 metallo-beta-lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. **49th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**. San Francisco, CA, USA, n. C1-1365. 2009.

FEHLBERG, L.C.C.; XAVIER, D.E.; PERARO, P.P.; MANA, A.R.; EDMOND, M.B.; GALES, A.C. Beta-lactam Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: Comparative results between Brazilian and American Isolates. **Microbial Drug Resistance**. vol 18, nº4, 2, 2012.

FERNANDES, T.A.; PEREIRA, C.A.P.; PETRILI, A.S.; PIGNATARI, A.C.C. Caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e produtoras de metalo-beta-lactamase isoladas em hemocultura de crianças e adolescentes com câncer. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 4, p.372-376, 2010.

FERREIRA, H.; PERES LALA, E.R. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**. v.12, n.2, p.44-50, 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas aeruginosa* : Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife / PE. **Revista brasileira de Terapia Intensiva**, v19,n4, 2007.

FLAHERTY, J.P. STOPOR, V. **Nonfermentative Gram-negative bacilli**. MYHALL, C.G. **Hospital epidemiology and infection control**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,p. 575-602, 2004.

FORTALEZA, C. **Fatores de Risco de para aquisição de P.aeruginosa resistente ao imipenem e à ceftazidima em pacientes internados no Hospital de Clinicas da Universidade Estadual de Campinas (HC. UNICAMP)**. Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Médicas. p.113, 2005.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; MACHADO, A.M.O.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Clinical culture surveillance of carbapenem-resistant *P.aeruginosa* and Acinetobacter species in a teaching hospital in São Paulo, Brazil: A 7-Year study. **Infection Control Hospital Epidemiology**. v.27, n.11, p.1270-1273, 2006.

GALES, A.C. ; MENEZES, L.C. ; SILBERT, S. ; SADER, H. Dissemination in distincti Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. In: **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 699-702, 2003.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURRIDGE, J.; RENNIE, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence and antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32, Suppl. 2, p.S146-S155, 2001.

GARNER JS, JARVIS WR, EMORI TG, HORANTC, HUGHES JM. CDC definitions for nosocomial infections. 1988. **American Journal Infectious Control**. 16 (3):128-140,1988.

GARZA-RAMOS, U.; MORFIM-OTERO, R.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; HERNANDEZ, E.; RODRIGUES-NORIEGA, E.; SANCHEZ, A.; CARRILLO, B.; ESPARZA-AHUMADA, S.; SILVA-SANCHEZ, J. Metallo- β -Lactamase Gene blaIMP-15 in a Class 1 Integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital in Mexico **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 52(8):2943-2946, 2008.

GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L. Occurrence of blaSPM-1 and blaIMP-1 genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *P.aeruginosa* from three University hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 38, p.108-109, 2007.

GOMES, M.Z.R.; MACHADO, C.R.; CONCEIÇÃO, M.S.; ORTEGA, J.A.; NEVES, S.M.F.M.; LOURENÇO, M.C.S.; ASENSI, M.D. Outbreaks, persistence, and high mortality rates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a hospital with AIDS-predominant admissions. **Brazilian Infectious Diseases**. 15(4); 312-322, 2011

GONÇALVES, D.C.P.S.; LIMA, A.B.M.; ; FILHO, JRC; PIMENTA, F.C; VIEIRA, J.O.G. Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, v.4, p.411-414, 2009.

GOODMAN & GILMAN'S - **The Pharmacological Basis of Therapeutics** - 12th Edition, Associate editors, p.2021, 2006.

GRAF, T.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase blaSPM-1 em amostras

clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.41, n.3, p. 306-308, 2008.

GUTIERREZ, O; JUAN, C.; CERCENADO, E; NAVARRO, F.; BOUZA, E; COLL, P.; PEREZ, J.L.; OLIVER, A. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.51, n.12, p.4329-4335, 2007.

KOH, T.H. BABINI, G.S.; WOOD FORD, N.; SNG^a, L-H.; HALL,L.; LIVERMORE, D.M. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. **Lancet**, v.353, p. 2162-4, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; SOMMERS, H.M. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2009.

LAURETTI, L.; RICCIO, ML.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.43, n.7, p.1584-90, 1999.

LEE, K; YUM, J.H.; YONG, D.;LEE,H.M.;KIM, H.D.; DOCQUIER, J-D.; DOCQUIER, J-D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacterbaumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 49, n. 11, p. 4485-91, 2005.

LISBOA, T.; FARIA, M; HOHER, J. A.; BORGES, L. A.A.; GOMEZ, J.; SCHIFEKBAIN, L.; DIAS, F. S.; LISBOA, J.; FRIEDMAN, G. Prevalência de Infecção Nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 19: 4:414-420, 2007.

MA, L. CONOVER, M. LU, H. PARSEK,M,R.BAYLES,K. WOZNIAK,D.J. Assembly and development of the *P.aeruginosa* biofilm matrix. **Plos Pathogens**. vol5, nº3, 2009.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CAMELI,Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH,S.; HINDLER,J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.;

VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infections**, vol 18, nº3, p.268-281, 2011.

MAGALHÃES, V.; LINS, A.K.; MAGALHÃES, M. Metallo- β -lactamase producing *P.aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**. v.36, p.123-125, 2005.

MARTINS, A.F.; ZAVASKI, A.P.; GASPARETTO, P.B.; BARTH, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 like and IMP-1-like metallo- β -lactamase in hospitals from Southern Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, p.457-460, 2007.

MEDEIROS, E. A. S. Hospital-Acquired Pneumonia Etiology and Antimicrobial Therapy. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. N.2, p.29-38, 2008.

MENDES, R.E.; GARCIA, P.; GUZMAN, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N. First isolation of blaVIM-2 in Latin American: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.48, n.4, p.1433-1434, 2004.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MENDES, R.E.; KIYOTA, K.A.; MONTEIRO, J.; CASTANHEIRA, M.; ANDRADE, S.S.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.C.; TUFIK, S. Rapid Detection and Identification of Metallo- β -lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. **Journal Clinical Microbiology**. v.45, n.2, p.544-547, 2007.

MOLINA, A. L.; TOBO, P.R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico: Biologia molecular Atualização. **Einstein**, v.2, n.2, p.139, 2004.

MORIYAMA, A.S. HOFLING-LIMA, A.L. Contact lens-associated microbial keratitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. 71(6supl):32-6, 2008.

- MORRELL M.R.; MICEK S.T.; KOLLEF M.H. The management of severe sepsis and septic shock. **Infectious Diseases Clinic of North American**. 23:485–501, 2009.
- MOURA, A. H.I.; RIBEIRO, R.; CORREIA, A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p. 1243-1250, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement**. USA: NCCLS document M100-S22, v. 100, n.3, 2012.
- NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS). System Report, data summary from January 1992 through, 2. **American Journal Infectious Control**. v.32, p. 470-485, 2004.
- NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.
- OLIVEIRA, O.A.; OLIVEIRA, A.L.L.; PONTES, E.R.J.C.; OLIVEIRA, S.M.V.L.; CUNHA, R.V. Epidemiologia da infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva
Epidemiology of nosocomial infection in a intensive care unit. **Revista Panamericana de Infectologia**. V 11, n 2, p.32-37, 2009.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 18, p. 657-686, 2005.
- PAVIANI, E.R.; STANDNIK, C.B.; HEINEK, I. **Estudos da epidemiologia e perfil de sensibilidade da Pseudomonas aeruginosa**. INFARMA, v15,n11-12, 2004.
- PEARSON, S. A practical approach to ensuring safe water. **Health estate**. v.66, issue 7, p.7-41, 2012.
- PELLEGRINO, F.L.P.C.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; NOUER, 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. Occurrence of a multidrug-

resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**. v.40, n.7, p.2420-2424, 2002.

PEREZ, F.; HUJER, A. M.; HUJER, K.M., DECKER, B.; RATHER, P. N.; BONOMO, R.A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 51, n. 10, p. 3471-84, 2007.

PICÃO, R.C.; GALES, A.C. β -lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática hospitalar**, v.9, n. 49, 2007.

PIER, G.B AND RAMPHAL, R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell DB, editor. Principles and practice of Infectious Diseases. 7 Ed. Philadelphia Elsevier; p.2835-10, 2010.

PICÃO, R.C.; POIREL, L.; GALES, A.C.; NORDMANN, P. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *P.aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 53, n. 9, p.3908-3913, 2009.

PICÃO, R.C.; CARRARA-MARRONI, E.; GALES, A.C.; VENÂNCIO, E.J.; XAVIER, D.E.; TOGNIM, M.C.B. Metallo- β -lactamases-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolats risk for silent spread. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v.107(6): 747-751, 2012.

PICOLI, S.U. Metallo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.4, p.273-277, 2008.

PINHEIRO M.S.B, N. C, BOSZCZOWSK I, P. RAMOS S.R.T.S. Infecção hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: há influência do local de nascimento? **Revista Paulista de pediatria** 27(1):6-14, 2009

PIRES, E.J.V.C.; JUNIOR, V.V.S.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.V. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospitais universitários. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 21(4):384-390, 2009.

POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. Characterization of blaDIM-1, a novel integronlocated metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. 19th **European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** (ECCMID). Helsinki, Finland, v. O309, 2009.

POOLE, K. efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**. 39(3): 162-176, 2007.

RANGEL, C. T; SOUZA, N. L.S; OLIVEIRA, C. O. P. Caracterização dos óbitos neonatais por infecção relacionada à assistência à saúde em uma maternidade escola. **Cogitare Enfermagem**. 17(3):531-6, 2012.

RODRIGUES A.C.S. **Resistência microbiana e tipagem molecular de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de dois hospitais de Campo Grande**. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Dissertação (Mestrado), p.1-99, 2010.

ROSSOLINI, G.M.; MANTENGOLI, E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 11, supplement 4, p.17-32, 2005.

ROSENTHAL, S.L. A simplified method for single carbon source tests with *Pseudomonas* species. **Journal of Applied Bacteriology**. v.37, issue 3, p.437-441, 1974.

SACHA P.; WIECZOREK, P.; HAUSCHILD, T.; ZORAWSKI, M.; OLSZANSKA, D.; TRYNISZEWSKA, E. Metallo- β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* – a novel mechanism resistance to β -lactam antibiotics. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.46, n.2, p.137-142, 2008.

SADER, H.S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; Zoccoli, C; Barth, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S. REIS, A.O. SILBERT, S. GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *P.aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Infectious Microbiology**, v.11, p.63-82, 2004.

SANTOS FILHO, L.; SANTOS, I.B.; ASSIS, A.M.L.; XAVIER, D.E. Determinação da produção de metalo-b-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.38 n.4, 2002.

SCHEFFER, M.C; BAZZO, M.L.; STEINDEL,M.; DARINI,A.L.; CLIMACO, E.; DALLA-COSTA, L.M. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n.4, p.367-371, 2010.

SEKIGUCHI, J. I.MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KANAMORI, M.; KIRIKALE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 52, n. 11, p. 4194 -7, 2008.

SILVA , K. C.; LINCOPAN , N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SOARES, M.C.S.T. **Estudos da resistência aos antimicrobianos em amostras de *P.aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ**. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2005. Tese (Doutorado).

STRATEVA, T.; OUZOUNOVA-RAYKOVA,V.; MARKOVA,B.; TODOROVA.A; MARTEVA-PROEVSKA,Y.; MITOV, I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgária: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. **Journal of Medical Microbiology**. v.56, p.956-963, 2007.

TAHERI, Z. M.; SHAHBAZI, N.; KHODDAMI, M. Genetic Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Hospitalized Patients. **National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n.1, p. 32-39, 2008.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

TORRES, J. C. N.; MENEZES, E. A.; ÂNGELO, M. R. F.; OLIVEIRA, I. R. N.; SALVIANO, M. N. C. S.; XAVIER, D.E.; FILHO, L.S. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 5, p. 313-19, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia** . 8ªed. Porto Alegre, Artmed, 2005

VAHABOGLU, H.; COSKUKAN, F.; TANSEL,O.; OZTURK, R.; SAHIN, N.; KOKSAL, I.; KOCAZEYBEK, B.; TATMAN-OTKUN.; LEBLEBICIOGLU, H.; OZINEL, M.A.; AKALIN, H.; KOCAGOZ, S.; KORTEN, V. Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of Medical Microbiology**. v.50, p.642-645, 2001.

WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.W.; SCRENCKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. Ed Guanabara-Koogan, Edição 6ª, p.1760, 2008.

WILLMANN, M.; KUEBART, I.; MARSCHAL, M.; SCHROPPEL, K.; VOGEL, N.; FLESCHE, I.; MARKERT, U.; AUTENRIETH, I.B.; HOLZL, F.; PETER, S. Effect of metallo- β -lactamase production and multidrug resistance on clinical outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection a retrospective cohort study. **BMC Infections Diseases**. 13:515, p. 1 a 9, 2013.

YOUNG, D., BELL, J.M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, MA.; WALSH, T.R. A novel sub-group metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. In: 47th. **Interscience Conference in**

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC).Chicago, IL, USA, n. C1-539, 2007.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, 2009.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; GONÇALVES, A.L.S.; MARTINS, A.F. High prevalence of metallo- β -lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. **Epidemiology Infectious**. v.135, p.343-345, 2006.

ZILBERBEG, M.D.; CHEN, J.; MODY,S.H.; RAMSEY, A.M.; SHORR, A.F. Imipenem resistance of *Pseudomonas* in pneumonia: a systematic literature review.In: **BMC PulmonaryMedicine**. v10, n45, 2010.

ZIMAKOFF, J.; HOIBY, N.; ROSENDAL, K.; GILBERT, J.P. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection and the role of contamination of the environment in a cystic fibrosis clinic. **Journal Hospital Infectious**. 4: 31-40, 1983.

11 APÊNDICES

APÊNDICE - A

PROTOCOLO DE PESQUISA DE INFECÇÃO HOSPITALAR

Identificação do paciente: Nome: _____ Idade: ____ Sexo: () F () M				
Data da internação: ____/____/____ Clínica: _____		Data da saída: ____/____/____ Enfermaria e leito: _____		
Tipo de infecção: () Hospitalar () Hospitalar de outro hospital (nome do Hospital): _____				
Motivo ou doença de base que levou o paciente à internação:				
Local principal da infecção:				
Urinário ()		Cardiovascular ()		
Corrente sanguínea ()		Respiratório inferior ()		
Sistema nervoso central ()		Sítio cirúrgico ()		
Osteoarticular ()				
Mencionar local específico:				
Infecção adquirida em UTI () Não () Sim Mencionar local principal da infecção:				
Cirurgia				
Nome da cirurgia:				
Tipo de cirurgia	Limpa ()	P.Contaminada ()	Contaminada ()	Infectada ()
Estudo Microbiológico				
Hemocultura:	() Positiva	() Negativa	() Não realizada	
Micro-organismo (s) isolado(s):				
Outros materiais: Bacterioscopia Positiva () Negativa () Não realizada ()				
() Cultura: Positiva () Negativa () Não realizada ()				
Micro-organismo isolado:				
Fatores de procedimento de risco: MATERIAL COLETADO:				
CI= cirurgia ()	SV=Sonda vesical ()	VR=Ventilação respiratória ()	CV=Cateter vascular ()	
HD= Hemodiálise ()	QT=Quimioterapia ()	DP=Diálise peritoneal ()	OP=outros procedimentos ()	
RT= radioterapia ()	NP=Nutrição parenteral ()	SN=Sonda nasogástrica ()		
UA=Uso de antimicrobiano ()	IC=Infecção comunitária ()	UP=Úlcera de pressão ()		

Outros (especificar):		
Isolamento:	Sim ()	Não ()
Tipo de isolamento: Precauções com gotículas () Precauções com o ar () Precauções com o contato ()		
Notificação compulsória (nome da doença ou agravo):		
Resultado do tratamento		
Tipo de alta: Curado () Melhorado () Inalterado () Transferência () Óbito ()		
Óbito associado à infecção hospitalar:	Sim ()	Não ()

APÊNDICE B

PROTOCOLO DE PESQUISA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM INFEÇÃO POR *P.aeruginosa*.

- 1- Nº da ficha ()
- 2- Nome do Paciente: _____
- 3- RH: _____
- 4- Data da IRAS: ____/____/____
- 5- Data de Nascimento: ____/____/____
- 6- Data da internação hospitalar: ____/____/____
- 7- Sexo: Feminino Masculino

8- **Local da aquisição da infecção (se hospitalar)** _____

a) UTI: UTI adulto, UTI pediátrica , UTI Neonatal
b) Enfermarias e clínica médica
c) Enfermaria cirúrgica
d) Enfermaria pediátrica

Dispositivos invasivos (até 48hs das IRAS)
a) Cateter venoso central () Sim () Não
b) Sonda vesical de demora () Sim () Não
c) Ventilação mecânica () Sim () Não

Diagnóstico de base:
a) Neoplasias (tumores sólidos)
b) Neoplasias (Leucemias ou Linfomas)
c) Doença renal
d) Doença cardíaca
e) Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)
e) Doença do Sistema Nervoso Central
f) Doença Hepática
g) Doença gastrointestinal
h) Prematuridade
i) Malformação congênita
j) Infecção congênita

Classificação de McCabe, Jackson:
a) Grupo 1 – Doenças rapidamente fatais
b) Grupo 2 – Doença potencialmente fatais
c) Grupo 3 – Doenças não fatais

Neutropenia (<500): () Sim () Não
Uso prévio de antimicrobianos (nos últimos 15 dias, durante no mínimo 48horas) () Sim () Não
Se sim quais os antimicrobianos?
a) Penicilina
b) Cefalosporinas de primeira geração
c) Cefalosporinas de segunda geração
d) Cefalosporinas de terceira geração
e) Cefalosporinas de quarta geração
f) Glicopeptídeos
g) Carbapenêmicos
h) Betalactâmicos com inibidores de betalactamases

i) Metronidazol
j) Monobactâmicos
k) Aminoglicosídeos
l) Macrolídeos
m) Quinolonas
n) Oxazolidinona
o) Clindamicina
p) Antifúngicos
p) Polimixina B
r) Sulfametoxazol-trimetropim
t) Outros
Precedendo a bacteremia
a) Cirurgia prévia nos últimos 30 dias ou 1 ano de colocação de próteses () Sim () Não
b) Uso de drogas imunossupressoras () Sim () Não Se sim?
- Corticóides (dose superior a 20mg/dia de prednisona por menos duas semanas precedendo a bacteremia ou >30mg/dia durante uma semana precedendo a bacteremia.
c) Quimioterapia (nos últimos 15 dias)
d) Imunossupressão após transplante.

9- Presença de sepse? Sim Não

10- Presença de sepse severa? Sim Não

11- Presença de choque séptico? Sim Não

12- Se não, qual sítio?

- a) Infecção do trato urinário;
- b) Infecção do sítio cirúrgico;
- c) Pneumonia;
- d) Infecção osteoarticulares;
- e) Infecção do SNC
- f) Infecção do Sistema cardiovascular;
- g) Infecção do trato gastrointestinal;
- h) Infecção do trato respiratório inferior que não pneumonia;
- i) Infecção de pele e tecidos moles;
- j) Infecção de corrente sanguínea primária (associada a cateter).

19- Avaliação da terapia empírica utilizada (no momento da coleta da cultura e até 24 horas após):

Adequada Inadequada

20- Avaliação da terapia definitiva, após recebimento dos resultados da cultura:

Adequada Inadequada.

21- Evolução:

Alta Óbito

22- Data da Alta: ____/____/____

23- Data do Óbito: ____/____/____

24- Confirmação laboratorial de *Pseudomonas* spp. Sim Não

25- Espécie: _____ -

26- Perfil de sensibilidade:

APÊNDICE - C

UNIVERSIDADE DO FEDERAL DO PARÁ-UFFPA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL-NMT-PA
TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO SERVIÇO MÉDICO E ESTATÍSTICO

Prezado(a) Sr(a) Responsável pelo SAME,

Dirijo-me à V.Sa. para solicitar a colaboração na pesquisa que tem como título: “Perfil Epidemiológico e Molecular de *Pseudomonas aeruginosa* isolado de amostras clínicas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Sentinela de Belém – Pará. cujo objetivo é realizar a caracterização epidemiológicos e de resistência de *P. aeruginosa* por Metallo-beta-lactamases *blaSPM-1* e *bla IMP-1* isolados de amostras clínicas de pacientes internados em UTI com infecção hospitalar em um hospital sentinela em Belém/Pará.

Será utilizado o material biológico (urina, sangue, líquidos orgânicos) dos pacientes para realização de isolamento de bactérias dos pacientes com infecção. Este estudo não oferecerá riscos de qualquer natureza, possibilitando dessa forma identificar qual bactéria está causando prejuízo ao paciente e que não respondem ao tratamento, possibilitando dessa forma direcionar o tratamento para a bactéria específica e detectar casos de infecção adquirida no hospital com micro-organismos resistentes. Garantimos ainda que haverá o sigilo das informações obtidas, e que a Instituição terá o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Em caso da sua desistência serão excluídos os dados dos pacientes e devolvidos todas as informações ao diretor do hospital. Informo-lhe que os resultados obtidos na pesquisa serão divulgados em eventos científicos nacionais e/ou internacionais e publicados em revistas, anais, jornais científicos.

Para atender a Resolução que trata da pesquisa com seres humanos necessito de autorização para a consulta dos prontuários, assinando este termo de consentimento livre e esclarecido emitindo uma declaração de aceite da Gerência de Informação do Paciente (Arquivo Médico) do hospital.

Declaro que li as informações sobre a pesquisa, e estou perfeitamente esclarecido (a) sobre o conteúdo do mesmo. Declaro ainda que, estaremos liberando para consulta o prontuário do paciente.

Período de consulta de prontuários: Janeiro a Novembro de 2011

Belém, _____ de _____ de _____

Dr. Benedito da Costa Maués
Gerência de Informação do Paciente.
(Arquivo Médico)

Pesquisadora: Eliseth Costa Oliveira de Matos, celular 8121.3375 , Rua Bartolomeu de Gusmão, 36, Souza e-mail: elisethcosta2@yahoo.com.br
Orientadora: Dra Karla Valéria Batista Lima – Instituto Evandro ChagasContato:81832080
Co-Orientadora: Dra Irna Carla do Rosário Souza Carneiro
Pós- Graduação Núcleo de Medicina Tropical da UFPA Coordenação do Mestrado Profissional Gestão e Saúde na Amazônia da Santa Casa de Misericórdia do Pará

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**TERMO DE APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará analisou no dia 30 de março de 2010 o Projeto de Pesquisa intitulado “**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE *pseudomonas aeruginosa* ISOLADO DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL SENTINELA DE BELÉM - PARÁ**” de CAAE 0030.0.440.000-10 e protocolo nº. **026/2010/CEP**, sob a responsabilidade da Profª. Eliseth Costa Oliveira de Matos, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolvê-lo nesta Instituição.

Belém, 31 de março de 2010.

Informamos ainda, que V. S. deverá apresentar relatório semestral (previsto para 30/05/2010), anual e/ ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto (item VII. 13.d. da Resolução nº 196/96 – CNS / MS).

Dra. Simone Regina Souza da Silva Conde

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa / FSCMPA

CEP /Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Rua Oliveira Belo, 395 –Umarizal – Fone: (091) - 4009.2264, CEP: 66.050-380 – CNPJ: 049.293.45/0001-85 -- Belém – Pa.
E-mail: cep@santacasa.pa.gov.br

