INNEKE MARIE VAN DER HEIJDEN

**Perfil de sensibilidade às polimixinas e padrão molecular de
isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a partir de
amostras de sangue**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Professora Dra. Silvia Figueiredo
Costa

São Paulo

2005

A Anna Laura e Alexandre,

Aos meus pais Ana Elisabeth e Marinus.

Agradecimentos

À Professora Dra. Silvia Figueiredo Costa, pela amizade, apoio, incentivo e orientação na realização deste trabalho.

À Professora Dra. Anna Sara Shaferman Levin, pelo apoio e colaboração para realização deste estudo.

À amiga Sânia, pelo apoio e incentivo.

Ao amigo Robson, pelo apoio e pela colaboração durante todas as etapas da realização deste trabalho.

Ao amigo Mauro, pelo apoio e incentivo.

À amiga Jeane, pelo apoio e incentivo.

Ao amigo Ewerton pelo apoio e colaboração na realização deste estudo.

À amiga Priscila, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

À amiga Liang, pelo apoio e colaboração na realização deste estudo.

Às amigas Rosemeire e Roseli, do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Investigação Médica (LIM-54) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

Ao Professor Dr. Dahir Ramos de Andrade, pelo apoio.

Ao Grupo de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Sueli, pela amizade e colaboração.

À Subcomissão de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade e colaboração.

À Professora Dra. Maria Helena Matté do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, pela colaboração na análise dos resultados.

À Dra. Gisele de Almeida Duboc, pela amizade e colaboração.

À Professora Dra. Flávia Rossi, pela colaboração.

À equipe do Departamento de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Heleni e Roselaine, pela colaboração técnica na realização deste trabalho.

Às professoras Registila, Katya e Viviana da Faculdade de Medicina do ABC, pelo apoio.

À minha família, pelo incentivo, apoio e carinho.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado da *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Aspectos gerais	01
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02
1.2.1 Aspectos morfológicos e microbiológicos	02
1.2.2 Aspectos epidemiológicos	03
1.2.3 Infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	04
1.2.4 Resistência antimicrobiana	04
1.2.4.1 Resistência aos β -lactâmicos	05
1.2.4.2 Resistência às fluoroquinolonas	10
1.2.4.3 Resistência aos aminoglicosídeos	11
1.3 Polimixinas	12
1.3.1 Aspectos estruturais	12
1.3.2. Histórico	13
1.3.3. Mecanismo de ação	15
1.3.4. Perfil de sensibilidade	18
1.3.5. Mecanismos de resistência	21

1.4. Tipagem molecular	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo principal	26
2.2 Objetivos secundários	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Amostras bacterianas	27
3.1.1. Isolamento e identificação	27
3.1.2. Armazenagem e recuperação	28
3.2. Testes de sensibilidade	28
3.2.1. Triagem das amostras bacterianas	28
3.2.2. Antimicrobianos	29
3.2.3. Teste de disco-difusão (método de Kirby-Bauer)	29
3.2.3.1. Preparo da suspensão bacteriana e inoculação nas placas	29
3.2.3.2. Aplicação dos discos e incubação das placas	30
3.2.3.3. Leitura das placas	30
3.2.4. Determinação da CIM (método de microdiluição em caldo)	31
3.2.4.1 Preparo da solução estoque do antimicrobiano	31
3.2.4.2 Número de diluições	31
3.2.4.3 Preparo das diluições na microplaca	32
3.2.4.4 Preparo da suspensão bacteriana	32
3.2.4.5 Inoculação da suspensão bacteriana	33
3.2.4.6 Leitura das CIMs	33
3.2.5 Determinação da CIM (método de Etest®)	33
3.2.5.1. Preparo da suspensão bacteriana e inoculação nas placas	33

3.2.5.2. Leitura das CIMs	34
3.2.6 Interpretação dos resultados	34
3.2.7 Controle de qualidade	35
3.2.8 Análise estatística	35
3.3 Protocolo para caracterização molecular por PFGE	36
3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana	36
3.3.2 Preparo dos blocos de agarose	36
3.3.3 Etapa de extração do DNA bacteriano	37
3.3.4 Etapa de restrição enzimática	37
3.3.5 Preparo do gel	38
3.3.6 Interpretação dos resultados	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Amostras bacterianas	40
4.2 Perfil de sensibilidade	43
4.2.1 Determinação da CIM pelo método de microdiluição	43
4.2.2 Comparação da CIM determinada pela microdiluição e Etest®	46
4.2.3 Comparação entre disco-difusão e microdiluição	51
4.3 Controle de qualidade	53
4.4 Tipagem molecular	53
4.5 Comparação entre perfil de sensibilidade e análise molecular	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	72
7. ANEXOS	74
8. REFERÊNCIAS	82

Lista de siglas

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CO	Colistina
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PB	Polimixina B
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CMHCA	Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura química das moléculas de polimixina B e E	13
Figura 2 – Mecanismo de ação das polimixinas	16
Figura 3 – Regressão linear entre os testes de sensibilidade que determinam a CIM para colistina de isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes	49
Figura 4 – Regressão linear entre os testes de sensibilidade que determinam a CIM para polimixina B de isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes..	49
Figura 5 – Leituras do halo de inibição (disco-difusão) e CIM (método de Etest [®]) para colistina.....	50
Figura 6 – Resultados comparativos entre CIM (microdiluição em caldo) e halos de inibição obtidos com discos de colistina 10µg	52
Figura 7 – Resultados comparativos entre CIM (microdiluição em caldo) e halos de inibição obtidos com discos de polimixina B 300U	52
Figura 8 – Padrão molecular predominante (padrão A) encontrado em isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes dos anos de 1998 a 2002	56

Figura 9 – Padrões moleculares encontrados em isolados dos anos de 1998 a 2002..... 57

Figura 10 – Padrões moleculares encontrados em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes do ano de 2003..... 58

Figura 11 - Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice do perfil de bandas obtido a partir da técnica de PFGE com a utilização de enzima *SpeI* para digestão de DNA genômico de cepas de *P. aeruginosa* 59

Figura 12 – Padrões moleculares identificados por PFGE. Isolados de 10 pacientes obtidos de hemoculturas coletadas em diferentes datas 60

Lista de tabelas

Tabela 1 – Critérios interpretativos para disco-difusão de colistina e polimixina B para isolados de <i>P. aeruginosa</i> (Gales et al., 2001).....	30
Tabela 2 – Tipos de erros de interpretação encontrados nos testes de sensibilidade	35
Tabela 3 – Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular....	39
Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de 109 isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes.....	44
Tabela 5 – Perfil de sensibilidade de isolados sensíveis à ciprofloxacina (CIM $\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$).....	45
Tabela 6 – Perfil de sensibilidade (CIM) de 109 isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes sensíveis à piperacilina-tazobactam (CIM $\leq 16,0$ $\mu\text{g/mL}$)	45
Tabela 7 – Valores das CIMs para colistina obtidos por método de microdiluição em caldo e fitas de Etest® para 109 isolados de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes.....	47

Tabela 8 – Valores das CIMs para polimixina B obtidos por método de microdiluição em caldo e fitas de Etest® para 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes 47

Tabela 9 – Categoria do tipo de erro para polimixina B e colistina de acordo com as metodologias de microdiluição e Etest 48

Tabela 10 – Categoria do tipo de erro para polimixina B e colistina de acordo com as metodologias de microdiluição e disco-difusão 53

Tabela 11 – Análise molecular de 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes de acordo com critérios propostos por Tenover et al. (1995) 56

Tabela 12 – Distribuição dos 51 padrões moleculares identificados de acordo com os critérios de Tenover et al. (1997), no ano de 2003..... 57

Tabela 13 - Perfil de sensibilidade dos 37 isolados pertencentes ao padrão A 61

Lista de quadros

Quadro 1 – Distribuição das 109 amostras bacterianas de *P. aeruginosa* de acordo com ano de isolamento 41

Quadro 2 – Distribuição anual das 109 amostras bacterianas de *P. aeruginosa* de acordo com unidades de internação 41

Quadro 3 - Distribuição anual das 109 amostras bacterianas de *P. aeruginosa* multirresistentes nas clínicas de internação..... 42

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais

Nos últimos anos, as infecções nosocomiais causadas por microorganismos Gram-negativos multirresistentes têm demonstrado grande importância nos hospitais brasileiros. Bactérias Gram-negativas podem ser consideradas multirresistentes quando apresentam resistência aos carbapenems, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e quinolonas. Entretanto, a definição de multirresistência é muito variável dependendo da complexidade de cada centro hospitalar.

Diversos fatores podem contribuir para a emergência de microorganismos multirresistentes, dentre eles a prática inadequada de controle de infecção hospitalar, uso inapropriado de antimicrobianos, procedimentos invasivos e maior sobrevivência de pacientes imunodeprimidos (Flaherty *et al.*, 1996; Hoppe, 1997).

A emergência de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes tem sido um problema de importância mundial. Em nosso hospital, estes microorganismos foram responsáveis por 15% dos casos de infecções por corrente sanguínea (ICS) primária, de 1993 a 1994 (Levin *et al.*, 1999). De acordo com dados obtidos em 2004, da Comissão de Infecção Hospitalar do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, *Pseudomonas aeruginosa* é o terceiro agente etiológico (11,3%) causador de infecção de corrente sanguínea nas unidades de terapia intensiva. Os problemas relacionados à resistência antimicrobiana em

bacilos Gram-negativos aeróbios particularmente *P. aeruginosa* parecem ser mais importante no Brasil e em outros países da América Latina quando comparados com outras regiões do mundo (Sader et al., 1999).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Aspectos morfológicos e microbiológicos

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, móvel, não esporulado, pertencente à família *Pseudomonodaceae*. Mede aproximadamente 1,5 a 3,0µm de comprimento e 0,5 a 0,8µm de largura. É um bacilo móvel com flagelo polar monotríquio, produtor de pigmentos difusíveis como a pioverdina e pigmentos solúveis como a piocianina. Algumas cepas podem produzir pigmentos de coloração vermelha ou preta como a piorrubina e piomelanina, respectivamente. A *P. aeruginosa* é um microorganismo capaz de utilizar carboidratos simples ou complexos, álcoois e aminoácidos como fonte de carbono (Kiska & Gilligan, 2003). É um aeróbio obrigatório exceto na presença de nitrato. Cresce preferencialmente à temperatura de 37°C, mas pode apresentar crescimento em temperaturas que variam de 30°C a 42°C (Kiska & Gilligan, 2003).

A identificação laboratorial deste microorganismo é relativamente simples pois a *P. aeruginosa* cresce facilmente em diversos meios de cultura e as características necessárias para sua identificação baseiam-se em alguns aspectos morfotintoriais e bioquímicos (Pollack, 1995). As principais características envolvidas na identificação microbiológica baseiam-se no

aspecto da colônia, produção de pigmentos e odor de frutas característico (Kiska & Gilligan, 2003). Outras provas bioquímicas como oxidação da glicose em meio basal, crescimento a 42°C, produção de oxidase, hidrólise de acetamida e redução de nitrato a gás nitrogênio (Kiska & Gilligan, 2003).

1.2.2 Aspectos epidemiológicos

P. aeruginosa é um microorganismo de distribuição universal. É isolado a partir de solo, água, plantas e animais, incluindo seres humanos (Pollack, 1995).

Em 1971, Favero et al. demonstraram o crescimento de *P. aeruginosa* em água destilada de hospitais e relacionaram esta evidência com a adaptação deste microorganismo às condições físico-químicas do ambiente aquático.

Os bacilos Gram-negativos não-fermentadores chegam facilmente ao ambiente hospitalar, podendo colonizar pacientes e profissionais da saúde. *P. aeruginosa* pode ser encontrada como parte da microbiota de indivíduos normais, colonizando principalmente o trato intestinal, trato respiratório e pele (Pollack, 1995). Entretanto, as taxas de colonização aumentam em pacientes hospitalizados, particularmente naqueles com longo período de internação (Kiska & Gilligan, 2003).

Nos últimos anos, observou-se um aumento no isolamento destas bactérias em espécimes clínicos e uma elevada importância destes microorganismos em muitas doenças infecciosas (Jones et al., 2003; Rossolini et al., 2005). *P. aeruginosa* é freqüentemente responsável por

infecções nosocomiais, sendo um dos principais agentes de infecção de corrente sanguínea, pneumonias, artrite séptica, infecção do trato urinário, infecções de ferida operatória e conjuntivites (Pollack, 1995; Rossolini et al., 2005). Atualmente, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* representam as principais causas de pneumonias e bacteremias em muitos dos grandes hospitais brasileiros, especialmente em São Paulo (Sader et al., 1998).

1.2.3 Infecções causadas por *P. aeruginosa*

Esta espécie raramente está associada a infecções em pacientes saudáveis. No entanto, tratando-se de infecções hospitalares, a *P. aeruginosa* é considerada como um dos principais agentes etiológicos de infecções respiratórias de pacientes com fibrose cística e infecções urinárias de repetição. Também é um importante patógeno isolado nas infecções de queimaduras e de feridas operatórias, entre outras (Koneman et al., 1997; Pruitt, 1980; Pollack, 1995).

1.2.4 Resistência antimicrobiana

Penicilinas anti-*Pseudomonas*, cefalosporinas, carbapenens, monobactams, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas são antimicrobianos ativos contra a maioria dos isolados de *P. aeruginosa*, sendo amplamente usados em terapia anti-*Pseudomonas*. No entanto, alguns isolados têm desenvolvido múltiplos mecanismos de resistência (Livermore, 2002).

1.2.4.1 Resistência aos β -lactâmicos

Diferentes mecanismos de resistência aos carbapenems têm sido reportados, dentre eles a alteração do sítio alvo devido à alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), degradação da droga pela produção de β -lactamases, alteração da permeabilidade da membrana externa dos Gram-negativos e efluxo do antimicrobiano (Pitout et al., 1997, Koneman et al., 1997; Livermore et al., 2002; Clark et al., 2003).

A alteração de PBPs é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em Gram-positivos e alguns microorganismos Gram-negativos fastidiosos. No entanto, é raramente encontrado em bacilos Gram-negativos (Sanders & Sanders, 1992). As PBPs podem ser alteradas por mutações, passando a apresentar baixa afinidade de ligação aos β -lactâmicos, ou levar a produção de PBPs suplementares que passam a apresentar baixa afinidade por esta classe de antimicrobianos (Maoilin et al., 1986; Livermore et al., 1991).

Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenems podemos destacar a produção de enzimas, como as β -lactamases, que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando assim a atividade do antimicrobiano. De acordo com Bush et al. (1995), as β -lactamases podem ser divididas em quatro grupos:

Grupo 1 – Cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico;

Grupo 2 – β -lactamases que são inibidas pelos inibidores de β -lactamases, subdivididas em classes A até D;

Grupo 3 – Metallo- β -lactamases que são pobremente inibidas pelos inibidores de β -lactamases;

Grupo 4 – Penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico.

Outro mecanismo de resistência descrito para os carbapenens envolve a expressão de enzimas mediadas por plasmídeos. As oxacilinases da classe OXA-31, enzimas presentes em alguns isolados de *P. aeruginosa*, inativam preferencialmente os carbapenens e algumas cefalosporinas, como cefepima, porém não atuam na ceftazidima (Aubert et al., 2001). Estas enzimas possuem menor eficiência quando comparadas à ação das metallo- β -lactamases, IMP, VIM e SPM, que são responsáveis pela hidrólise dos carbapenens, penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (Livermore, 2002; Gales et al., 2003). Outras β -lactamases, principalmente PSE-1 e PSE-2, também conferem resistência aos β -lactâmicos, mas não afetam a sensibilidade aos carbapenens, cefepima, ceftazidima e aztreonam (Livermore, 2002).

Geralmente quando a concentração inibitória mínima dos carbapenens é bastante elevada, vários mecanismos de resistência estão envolvidos (Satake et al., 1991; Trias e Nikaido, 1990; Vurma-Rapp et al., 1990). Dentre estes, podemos destacar também a redução da permeabilidade na membrana externa, que ocorre devido a uma alteração celular estrutural, ocasionando resistência a várias classes de antimicrobianos (Livermore, 1991). Estudos têm demonstrado que diversos isolados de *P. aeruginosa* podem ser resistentes ao imipenem e meropenem devido à perda por mutação de uma porina da membrana externa, a OprD, resultando na

alteração da permeabilidade da parede externa (Troillet et al., 1997; Livermore, 2002). Trata-se de uma proteína específica de 54 kDa que, quando ausente, aliada a atividade de uma β -lactamase cromossomal de classe C, permite a resistência aos carbapenems. Mecanismos que proporcionam diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano podem ocasionar resistência aos carbapenems, como a perda da porina OprD que confere resistência ao imipenem e reduz a susceptibilidade ao meropenem (Livermore, 2002).

Um outro mecanismo de resistência importante em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* é a bomba de efluxo. Este mecanismo, descrito por Nikaido (1994) em isolados de *P. aeruginosa* e outros bacilos Gram-negativos fastidiosos, consiste na eliminação ativa do antibiótico da célula, de tal modo que as concentrações intracelulares nunca alcançam um nível suficiente para ter efeito antimicrobiano eficaz (Koneman et al., 1997). Vários sistemas de efluxo têm sido descrito para os β -lactâmicos, como o sistema MexAB-OprM que é capaz de remover β -lactâmicos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, macrolídeos, sulfonamidas e outros antibióticos. Sua regulação confere resistência ao meropenem porém não atinge o imipenem (Livermore, 2002).

Isolados multirresistentes emergiram por combinações de diversos mecanismos como o efluxo ativo, a alteração da permeabilidade da membrana externa e produção de enzimas inativadoras, como as β -lactamases (Livermore, 2002).

Vários pesquisadores avaliaram os fatores de risco para o aparecimento de infecção por isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem (Troillet et al., 1997; Livermore, 1995). O uso de antimicrobianos foi considerado por diversos estudos como um importante fator de risco para a emergência desta resistência ao imipenem (Troillet et al., 1997; Harris et al., 1999; Carmeli et al., 1999; Harris et al., 2002).

Estudos multi-cêntricos têm colaborado para uma melhor caracterização da resistência aos carbapenens, através da determinação do perfil de sensibilidade para diferentes microorganismos. Em 1998, Chang et al. demonstraram a atividade *in vitro* do meropenem para diversos microorganismos. Um total de setecentos isolados, pertencentes a um grupo de doze microorganismos comumente patogênicos, foram obtidos de diversos materiais clínicos, coletados de um hospital universitário em Taiwan, e selecionados de modo aleatório. A atividade *in vitro* do meropenem foi comparada com outros nove agentes antimicrobianos, como cefalosporinas, aztreonam, imipenem e ciprofloxacina. A CIM₅₀ e CIM₉₀ do meropenem para isolados de *P. aeruginosa* foi igual a 0,25 e 1,0 µg/mL, enquanto para imipenem estes valores foram de 1,0 e 2,0 µg/mL, respectivamente. Neste estudo, todos os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade ao meropenem.

Em estudo realizado por Sader et al. (1998), um total de 556 microorganismos isolados de trato respiratório inferior foram coletados a partir de pacientes hospitalizados com pneumonia em 10 centros médicos de 6 países da América Latina. Os isolados foram testados pelo método da

microdiluição em caldo para mais de 70 antimicrobianos, sendo 35 destes reportados. Os isolados de *P. aeruginosa* demonstraram elevadas taxas de resistência para a maioria dos antimicrobianos testados, sendo o meropenem o mais ativo na inibição deste patógeno (CIM₅₀ de 0,25 µg/mL), com 77,2% de susceptibilidade. Assim, evidências de elevada resistência aos carbapenens foram reportadas nos países latino-americanos para isolados de *P. aeruginosa*.

Em estudo realizado pelo programa MYSTIC, no período de 1997 a 2001, Jones et al. (2003) constataram resultados muito parecidos com os anteriores. A porcentagem de susceptibilidade para o imipenem e meropenem de 11.968 isolados de *P. aeruginosa* foram, respectivamente, 82% (CIM₉₀ 8,0 mg/L) e 86% (CIM₉₀ 8,0mg/L).

Em outro estudo realizado pelo mesmo programa, (Rhombert et al., 2004) outros pesquisadores analisaram o espectro de atividade do meropenem frente a outros antimicrobianos, através da comparação do perfil de sensibilidade de isolados de diferentes microorganismos isolados no ano de 1999 em relação aos isolados em 2001. Um total de 2874 microorganismos foi isolado em 15 centros médicos diferentes nos Estados Unidos. O objetivo secundário deste estudo foi comparar o espectro de atividade do meropenem em relação a outros antimicrobianos. Os resultados demonstraram que os carbapenens continuam com um amplo espectro de atividade para vários microorganismos e possuem melhor eficácia que outros antimicrobianos se compararmos os valores de 1999 com os de 2001. Os resultados ainda mostram que embora exista um aumento do número de

isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*, os carbapenens ainda podem ser considerados com uma das mais ativas opções para o uso terapêutico em muitos países.

Em 2001, Pfaller et al. demonstraram que a susceptibilidade aos carbapenens aumentou entre os anos de 1999 a 2000. De um total de 492 isolados de *P. aeruginosa*, 78% mostraram sensibilidade ao imipenem em 1999 e 81% em 2000. A porcentagem de sensibilidade para o meropenem foi de 78% e 84% em 1999 e 2000, respectivamente. Estes resultados indicam que os carbapenens têm ainda um amplo espectro entre os principais patógenos Gram-negativos, principalmente contra microorganismos resistentes à ceftazidima ou piperacilina-tazobactam.

1.2.4.2 Resistência às fluoroquinolonas

A resistência às fluoroquinolonas é devida a mutações que alteram a enzima DNA-girase das células bacterianas. Estas enzimas são responsáveis pelo espiralamento dos filamentos de DNA bacteriano e sua alteração proporciona resistência às quinolonas.

A ocorrência de mutações em sítios específicos das topoisomerasas II e IV, *gyrA* e *parC* respectivamente, conferem elevada resistência às fluoroquinolonas em isolados de *P. aeruginosa* (Livermore, 2001). Outro importante mecanismo de resistência a esta classe de antimicrobianos é a mutação de sítios específicos nos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM, ocasionando uma desrepressão destes sistemas em isolados de *P. aeruginosa*, capaz de permitir uma

ineficácia clínica com fluoroquinolonas altamente potentes, como ciprofloxacina e ofloxacina (Dupont et al., 2005).

1.2.4.3 Resistência aos aminoglicosídeos

Mutações nos sistemas de efluxo podem comprometer simultaneamente a ação de fluoroquinolonas e a maioria dos β -lactâmicos, deixando somente como opção terapêutica os aminoglicosídeos, os quais não são eficazes quando administrados como monoterapia (Livermore, 2001).

Os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos podem ser mediados por mutação, permitindo alterações de permeabilidade (Poole, 2005) e modificações ribossômicas, e por plasmídios R, resultando na produção de enzimas inativantes (Trabulsi et al., 2002).

As mutações podem afetar tanto o sítio de ação como o transporte dos aminoglicosídeos para o interior da célula bacteriana. A resistência mediada por plasmídios R é decorrente da produção de três grupos de enzimas modificadoras, as fosfo-transferases, adenil-transferases e acetil-transferases. Estas enzimas modificam as moléculas dos aminoglicosídeos, eliminando ou reduzindo sua capacidade de fixação às proteínas ribossômicas bacterianas (Trabulsi et al., 2002; Poole, 2005).

Em estudo realizado por Young et al. (1992) foi evidenciado o que, em condições de deficiência de íons de magnésio, a super-expressão de uma proteína da membrana externa (OprH ou H1) de isolados de *P. aeruginosa* proporcionou resistência à polimixina B, gentamicina e EDTA.

Nenhum mecanismo de resistência pode comprometer isoladamente a eficácia de tratamento com drogas anti-*Pseudomonas*. No entanto, múltiplas mutações genéticas em diferentes sítios bacterianos podem ocasionar o aparecimento de isolados multirresistentes. A combinação de mecanismos de efluxo, perda de porina OprD e impermeabilidade aos aminoglicosídeos comprometem o tratamento das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, restando apenas a opção terapêutica com polimixinas (Livermore, 2001).

1.3 Polimixinas

1.3.1 Aspectos estruturais

As polimixinas são um grupo de peptídeos policatiônicos sintetizados pelo *Bacillus polymyxa*, um bacilo Gram-positivo aeróbio isolado do solo (Hoeprich, 1995). Das cinco polimixinas conhecidas (A, B, C, D e E), somente a polimixina B e E (colistina) tem sido empregadas em tratamentos terapêuticos (Figura 1). Estas duas drogas têm demonstrado boa eficácia no tratamento de algumas infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Levin et al., 1999).

A colistina (ou polimixina E) foi isolada, pela primeira vez, no Japão a partir do *Bacillus polymyxa* subespécie *colistinius* em 1947 (Taylor et al., 1962; Storm et al., 1977) e tornou-se disponível para uso clínico em 1959 (Bannes et al., 1964; Cox & Harrison, 1970).

Figura 1 – Estrutura química das moléculas de polimixina B e E.

Fonte: www.bedfordlabs.com/products/139-01.html

Fonte: AB Biodisk, Solna, Suécia

1.3.2 Histórico

Em 1962, Edgar e Dickson descreveram o uso de um novo agente antimicrobiano, metanosulfonato de colistina, com grande sucesso terapêutico na tentativa de curas de infecções causadas por *Pseudomonas* spp. Em 1964, estudos realizados por Nord e Hoeprich descreveram que uma concentração de 0,01 μ M/mL de sulfato de polimixina B demonstrava ação bactericida contra 88% das cepas de *P. aeruginosa* testadas,

observando esta mesma atividade em relação à colistina somente em concentrações mais elevadas (0,1µM/mL). Assim, Storm et al. (1977) concluíram que as polimixinas possuem atividade bacteriostática em baixas concentrações e atividade bactericida em concentrações mais elevadas.

Desde 1980, o uso terapêutico das polimixinas limita-se a formulações tópicas e aerossol para tratamento de infecções de pele, ouvidos e olhos (Hoeprich, 1995). Entretanto, com o aumento de infecções causadas por isolados multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., o uso terapêutico parenteral das polimixinas tem sido amplamente sugerido e embora seja ainda limitado, devido a sua neurotoxicidade e nefrotoxicidade (Jenson et al., 1987). A polimixina B e a colistina tem sido utilizadas no tratamento de infecções crônicas e agudas em pacientes com fibrose cística por via inalatória (Hoeprich, 1995; Kock-Weser et al., 1970).

Em estudo retrospectivo realizado por Levin et al. (1999), sessenta casos de infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes foram tratados com colistina. Neste estudo, a taxa de sucesso terapêutico ocorreu em 35 dos pacientes (58%). Os piores resultados foram obtidos no tratamento de pneumonia, com falha em 75% dos casos.

Em discordância, num estudo observacional realizado por Markou et al. (2003), um total de 24 pacientes com infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos tratados com colistina (26 cursos de tratamento, sendo vinte casos de *P. aeruginosa* e seis de *A. baumannii*) apresentou bom desempenho da colistina no tratamento de pneumonia. Onze (73%) de

quinze pacientes apresentaram resposta clínica inicial favorável e erradicação bacteriana documentada em 8 casos (53%). Todos os pacientes recebiam antibióticos concomitantes e não houve registro de neurotoxicidade em nenhum dos casos analisados.

1.3.3 Mecanismo de ação

A polimixina B (antibiótico polipeptídico pertencente ao grupo das polimixinas) e a colistina atuam como bactericidas contra bactérias Gram-negativas, através de um mecanismo que interfere na estrutura e função das membranas externa e citoplasmática. Este mecanismo ocorre através de interação com lipopolissacarídeos e fosfolipídios da membrana externa e interferência eletrostática por substituição competitiva de cátions bivalentes (cálcio e magnésio) por grupos fosfatos (carregados negativamente) da membrana lipídica. Conseqüentemente, ocorre um dano na barreira osmótica que acarreta o extravasamento de componentes intracelulares e posterior morte bacteriana (Hancock, 1999) (Figura 2).

Figura 2 – Mecanismo de ação das polimixinas.

Fonte: adaptado de Hancock et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1317-23.

Existem duas formas farmacêuticas diferentes de colistina disponíveis comercialmente, o sulfato de colistina e o metanosulfonato sódico de colistina. O metanosulfonato de colistina é menos tóxico e ocasiona efeitos colaterais menores quando comparados ao sulfato de colistina. Por este motivo, o *FDA (Food and Drug Administration)* aprovou o sulfato de colistina apenas para o uso tópico ou oral e o metanosulfonato de colistina para uso parenteral e inalatório (1960; Goodwin, 1970; Li et al., 2001).

Alguns trabalhos reportaram a baixa potência *in vitro* do metanosulfonato sódico de colistina (Barnett et al., 1964; Beveridge & Martin, 1967; Li et al., 2001). O metanosulfonato de colistina (MSC) tem a capacidade de hidrolisar-se em solução aquosa e formar uma mistura extremamente complexa de derivados sulfometilados e colistina (McMillan &

Pattison, 1969), resultando em uma solução final com alta atividade antibacteriana (Barnett et al., 1964; Beveridge & Martin, 1967).

Embora esta forma farmacêutica da colistina tenha sido amplamente usada nos últimos 40 anos, sua farmacocinética não tem sido amplamente estudada (Beringer, 2001).

Estudos para avaliar a farmacocinética do MSC têm sido propostos por alguns autores (Li et al., 2001; Li et al., 2004). Em estudo realizado com 23 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, as propriedades farmacodinâmicas *in vitro* do sulfato de colistina (SC) e do MSC foram investigadas através da determinação da CIM, cinética de morte bacteriana e efeito pós-antibiótico (EPA) em pacientes com fibrose cística (Li et al., 2001). Neste estudo, 11 isolados eram resistentes à colistina (CIM >128,0 µg/mL) e as CIMs para os isolados susceptíveis variaram de 1,0 a 4,0 µg/mL para SC e de 4,0 a 16,0 µg/mL para MSC. A colistina mostrou-se extremamente rápida na morte bacteriana, resultando numa completa eliminação em elevadas concentrações num período de cinco minutos, enquanto a colistina metanosulfonada promoveu morte celular mais lenta, necessitando de concentrações 16 vezes o valor da CIM para eliminar totalmente o microorganismo em 24 horas. O efeito pós-antibiótico também mostrou-se maior em cepas submetidas a 15 minutos de exposição ao SC (EPA de 2 a 3 horas) do que ao MSC. Assim, dados deste estudo sugerem que doses de MSC maiores que as recomendadas (2-3mg/kg/12h) devem ser administradas para um tratamento eficaz de infecções por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (Li et al., 2001).

Em estudo publicado recentemente por Li et al. (2004), a colistina foi detectada no plasma de ratos logo após a administração intravenosa de metanosulfonato sódico de colistina, indicando uma rápida conversão do MSC em colistina. Este estudo sugere que a alta porcentagem de colistina recuperada da urina destes animais foi provavelmente formada pela hidrólise do MSC nos vasos sanguíneos ou pela conversão do MSC em colistina nos rins.

1.3.4 Perfil de sensibilidade

Algumas pesquisas têm mostrado a importância da padronização de intervalos de concentração inibitória mínima (CIM) de diversos microorganismos para caracterização do perfil de sensibilidade a colistina, uma vez que esta droga tem sido utilizada no tratamento parenteral de infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes (Kock-Weser et al., 1970).

A partir de janeiro de 2005, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) disponibilizou critérios interpretativos padronizados para a polimixina B e colistina para determinação da CIM pelos métodos de diluição em caldo e em agar. No entanto, ainda não há critérios para validar a metodologia baseada na difusão em agar (Etest ou disco-difusão). Os primeiros critérios propostos pelo NCCLS datam de 1979 (ASM2), com atualização em 1981 (M2-A2-S2). Anos depois, estes critérios foram removidos pelo próprio comitê em virtude do uso restrito para as polimixinas.

No atual documento do CLSI, M100-S15 (2005), os pontos de corte propostos para a polimixina B e colistina correspondem aos pontos anteriormente propostos por Gales et al. (2001). Assim caracteriza-se como sensível os isolados com CIM menores ou iguais a 2,0µg por mililitro e resistente aqueles isolados com CIM maiores ou iguais a 4,0µg por mililitro. Atualmente, de acordo os critérios publicados, os resultados de CIM obtidos para polimixina B podem predizer a CIM para colistina, para isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias não-fermentadoras.

Em estudo realizado por Catchpole et al. (1997), a atividade *in vitro* do metanosulfonato sódico de colistina foi comparado com outros agentes antimicrobianos para 377 isolados clínicos de microorganismos Gram-negativos, sendo 94 *P. aeruginosa*. A colistina foi eficaz contra 97% dos isolados de *P. aeruginosa*, apresentando CIM₉₀ de 4,0µg/mL.

Em 1965, pesquisas realizadas por Eickhoff e Finland demonstraram que de 225 cepas de *P. aeruginosa* testadas, a concentração mínima de polimixina B e de colistina que inibiu 90% das cepas (CIM₉₀) foi de 3,1µg/mL e 6,3µg/mL, respectivamente, sendo o CIM₅₀ de 1,6µg/mL para ambos os antimicrobianos.

Entretanto, até hoje, poucos trabalhos foram desenvolvidos para avaliar a resistência a estes antimicrobianos entre microorganismos Gram-negativos. Um estudo comparativo entre diferentes metodologias (Gales et al., 2001) sugeriu que os resultados obtidos pelo método da difusão do disco fossem sempre confirmados pelo método da microdiluição em caldo, uma vez que a difusão demonstrou não ser um método seguro para avaliar a

sensibilidade às polimixinas, especialmente em casos onde polimixina B e colistina foram utilizadas como drogas de escolha no tratamento de infecções sistêmicas graves causadas por espécies de *Pseudomonas* (Gales et al., 2001). Neste mesmo estudo, foram analisados 80 isolados de *P. aeruginosa*, incluindo aqueles resistentes aos carbapenems, os quais tiveram seu crescimento bacteriano inibido em concentrações maiores ou iguais a 2,0 µg/mL de colistina e polimixina B. Assim, foi proposto que cepas com concentrações inibitórias mínimas (CIM) maiores ou iguais a 4,0 µg/mL para colistina e polimixina B deverão ser consideradas resistentes (Gales et al., 2001). Este critério para determinação de CIM foi aceito pelo CLSI (2005) e tem sido aplicado atualmente. Entretanto, não há critérios aceitáveis para o método de disco-difusão para as polimixinas.

Outras pesquisas têm sido desenvolvidas, com o intuito de avaliar a atividade *in vitro* da colistina e da colistina metanosulfonada contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e outros microorganismos Gram-negativos (Catchpole et al., 1997; Turnidge et al., 2001). Estudos avaliaram as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas destes antimicrobianos, bem como o efeito pós-antibiótico (EPA), mostraram que a colistina metanosulfonada possui atividade bactericida e pós-antibiótica inferior a polimixina E e seus valores de CIM foram significativamente maiores, 4,0 a 16,0 µg/mL, quando comparados à colistina, 1,0 a 4,0 µg/mL (Turnidge et al., 2001).

Em estudo realizado por Gales et al. (2001), a atividade antimicrobiana da colistina e polimixina B foram avaliadas contra 200 diferentes patógenos

causadores de infecções de corrente sanguínea obtidos do programa de resistência antimicrobiana SENTRY. A correlação entre a microdiluição, disco-difusão e diluição em ágar foi analisada com o propósito de determinar um critério interpretativo de susceptibilidade às polimixinas. Os resultados encontrados neste estudo comprovaram que tanto a polimixina B como a colistina são eficazes no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Todos os isolados de *P. aeruginosa* (80) mostraram-se sensíveis à polimixina B (CIM₉₀ de 2,0µg/mL) e colistina (CIM₉₀ ≤ 1,0µg/mL).

1.3.5 Mecanismos de resistência

As bactérias Gram-negativas podem desenvolver resistência às polimixinas através de uma mutação ou adaptação molecular. Vários autores demonstraram *in vitro* a resistência às polimixinas em isolados de *Providencia* spp. (CIM₉₀ >128,0 µg/mL), *Serratia* spp. (CIM₉₀ >128,0 µg/mL), *Enterobacter* spp. (CIM₉₀ >128,0 µg/mL), *Burkholderia cepacia* (CIM₉₀ >128,0 µg/mL) e *Stenotrophomonas maltophilia* (CIM₉₀ 8,0 µg/mL) (Catchpole et al., 1997; Gales et al., 2001).

A mutação não requer a presença do antibiótico (Makela et al., 1978), mas a resistência por adaptação pode ser decorrente do crescimento de cepas susceptíveis repetidamente em diferentes concentrações de antibiótico (Brown et al., 1972). Isto pode ocorrer devido a alterações na composição do lipídio do lipopolissacarídeo (Conrad et al., 1989; Vaara et al., 1981) ou por substituição da proteína H1 para íon magnésio (Mg⁺²) na

membrana externa do microorganismo (Brown et al., 1970; Shand et al., 1988).

A resistência em isolados de *Pseudomonas* spp. à colistina é rara e o mecanismo de tal resistência ainda não foi estudado “in vitro”. Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado a existência de resistência as polimixinas (Moore et al., 1984; Groisman et al. 1997; Hancock et al., 1998). Estudos comparativos na determinação de CIM para isolados de *P. aeruginosa* por diferentes metodologias (Etest[®], microdiluição em caldo e diluição em ágar) para a polimixina B e colistina, ainda não foram publicados.

No entanto, a resistência às polimixinas para isolados de *Pseudomonas aeruginosa* ainda é baixa embora já tenha sido descrita previamente em trabalho publicado por Catchpole et al. (1997). Neste estudo, 377 isolados clínicos, incluindo 94 isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística, tiveram suas CIMs determinadas pelo método de diluição em agar. A colistina metanosulfonada mostrou-se ativa contra 97% dos isolados de *P. aeruginosa* (CIM₉₀ de 4,0 mg/L), tendo apenas um isolado CIM igual a 32,0 mg/L para este antimicrobiano. Assim, a colistina continua sendo um importante e potente agente antimicrobiano no tratamento de infecções bacterianas causadas especialmente por microorganismos multirresistentes.

1.4 Tipagem molecular

A tipagem molecular é uma caracterização detalhada do microorganismo, que utiliza técnicas de biologia molecular para evidenciar

uma possível relação genética entre isolados clínicos de uma mesma espécie. A necessidade de avaliar esta relação é muito importante na investigação de surtos e de disseminação clonal de determinado microorganismo em infecções hospitalares (Sader et al., 1995; Olive & Bean, 1999; Pfaller et al., 2001).

O uso de técnicas moleculares em investigação de surtos de infecção hospitalar permite, além da identificação do patógeno, a tipagem ou caracterização de padrões moleculares capazes de distinguir cepas de um mesmo microorganismo. Um clone caracteriza as cepas de uma mesma espécie que possuem as mesmas características genéticas (Sader et al., 1995; Olive & Bean, 1999; Pfaller et al., 2001).

Programas de vigilância epidemiológica requerem o monitoramento da disseminação clonal, pois o acompanhamento e a avaliação do comportamento de determinadas cepas dentro de uma população ao longo do tempo pode ajudar na implementação de estratégias que controlem, determinem ou ao menos monitorem a evolução de cepas bacterianas de importância clínica e o aparecimento de novos clones (Pfaller et al., 2001; Gales et al., 2001).

A eletroforese em gel por campo pulsado (PFGE) é uma das técnicas de tipagem molecular mais conhecida e utilizada universalmente, principalmente pelo alto poder discriminatório e pela sua aplicabilidade à maioria das espécies bacterianas. Esta técnica baseia-se na migração de fragmentos de DNA através do uso de diversos campos elétricos gerados em posições diferentes e alternadamente (Southern & Elder, 1995).

A técnica de PFGE tem sido eficientemente utilizada para a realização de estudos epidemiológicos. No entanto, alguns autores relataram que a tipabilidade desta técnica pode não atingir 100%, em virtude da degradação de DNA bacteriano, principalmente para isolados de *P. aeruginosa* (Sader et al., 1993; Romling et al., 1994; Grundmann et al., 1995; Romling & Tummeler, 2000).

Recentemente alguns autores mostraram que a adição de tiouréia no tampão de corrida eliminava os radicais ativos da solução, resolvendo assim o problema de possível degradação do DNA bacteriano (Silbert et al., 2003; Romling et al., 2000; Liesegang et al., 2002).

Pfaller et al. (1992) estabeleceram os primeiros critérios para analisar os resultados do PFGE. De acordo com este critérios, dois solados clínicos seriam definidos como uma mesma cepa quando apresentarem perfil migratório idêntico (tanto quanto ao número de bandas como ao peso molecular dos fragmentos). Isolados clínicos com perfis migratórios entre 90% e 100% de similaridade (uma a três bandas diferentes) seriam considerados similares (subtipos). Finalmente, isolados clínicos com menos de 90% de similaridade (quatro ou mais bandas diferentes) seriam considerados distintos.

Em 1995, Tenover et al. determinaram critérios de interpretação de análises de tipagem molecular para investigação de surtos hospitalares. De acordo com estes critérios, os microorganismos são considerados indistinguíveis, ou seja, fazendo parte do surto, quando o mesmo padrão molecular for evidenciado. Microorganismos provavelmente relacionados ao

surto, podem diferir em dois ou três fragmentos moleculares. Isolados possivelmente relacionados ao surto podem apresentar quatro a seis bandas distintas, e isolados não pertencentes ao surto, sete ou mais fragmentos de peso molecular diferente.

Em 1993, foi relatado um surto de infecção hospitalar por *Acinetobacter baumannii* multirresistente nas unidades de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Levin et al., 1996). Desde então, a colistina tem sido utilizada como opção terapêutica para o tratamento de infecções graves causadas por microorganismos multirresistentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Levin et al., 1999).

Entretanto, a resistência antimicrobiana dos microorganismos isolados de pacientes com uso parenteral de colistina nunca foi estudada. Um estudo retrospectivo foi proposto com o intuito de avaliar o perfil de sensibilidade de *P. aeruginosa* multirresistentes às polimixinas e verificar a linhagem clonal destes isolados.

2 Objetivos

2.1 Objetivo principal

Avaliar a sensibilidade à colistina e polimixina B por diferentes metodologias de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes obtidos de amostras de sangue de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICHC-FMUSP).

2.2 Objetivos secundários

- Determinar a linhagem clonal dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.
- Determinar a correlação do valor da CIM para colistina de isolados de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes que receberam previamente colistina parenteral.

3. Materiais e métodos

3.1.1 Amostras bacterianas

De um total de 229 cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (resistentes ao imipenem), identificadas como agentes de infecção de corrente sanguínea (Gardner et al., 1988), no período de 1998 a 2003, no banco de dados da Sub-comissão de Infecção Hospitalar do ICHC-FMUSP, foram analisados 109 isolados de acordo com o ano e a unidade de internação.

3.1.1 Isolamento e identificação

As amostras bacterianas foram isoladas a partir de semeadura das amostras de sangue em meio sólido, ágar sangue de carneiro a 5% ou ágar chocolate, e a identificação dos isolados foi feita manualmente e por sistema automatizado Vitek[®] (BioMérieux, EUA) com cartão GNI.

A certificação da pureza das cepas foi realizada com novo subcultivo em meio seletivo. As amostras bacterianas, previamente identificadas por método automatizado, foram confirmadas por realização manual de provas bioquímicas, tais como oxidação da glicose em meio basal de Moeller, crescimento a 42°C, produção de oxidase, crescimento em agar cetrimida, hidrólise de acetamida, redução de nitrato a gás nitrogênio, descarboxilação da arginina e utilização de citrato. As condições de incubação foram realizadas de acordo com Kiska & Gilligan (2003). As cepas com identificação diferente da inicial foram excluídas do estudo.

3.1.2 Armazenagem e recuperação

Após isolamento e identificação dos isolados de *P. aeruginosa*, os mesmos foram inoculados em microtubos contendo caldo BHI-glicerol, homogeneizados e armazenados em freezer -86°C.

Os isolados foram recuperados através da inoculação de uma alçada do caldo BHI-glicerol em placa contendo meio sólido seletivo para bactérias Gram-negativas (agar MacConkey). Estas placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas em atmosfera ambiente e as amostras foram identificadas novamente por técnicas manuais (Kiska & Giligan, 2003).

3.2 Testes de sensibilidade

3.2.1 Triagem das amostras bacterianas

O teste de triagem da resistência ao imipenem foi previamente realizado por método automatizado Vitek[®] no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas. Todos os outros testes de sensibilidade foram realizados no LIM-54. As amostras resistentes ao imipenem tiveram suas CIMs (Concentração Inibitória Mínima) para dez antimicrobianos determinadas pelo método da microdiluição em CMHCA (Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado), conforme normas padronizadas pelo NCCLS (M7-A5, 2002).

3.2.2 Antimicrobianos

Para realização do teste de disco-difusão foram utilizados discos de 10µg de colistina (Oxoid) e discos de 300U de polimixina B (Oxoid).

Os antimicrobianos testados para determinar as CIMs dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes foram imipenem/cilastatina sódica (Merck & Co., Inc., Elkton, EUA), meropenem (Astra Zeneca), sulfato de colistina (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), sulfato de polimixina B (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), ceftazidima pentahidratada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), ciprofloxacina (Fluka Chemie, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), cloridrato de cefepima (Bristol-Myers Squibb, Guayaquil, Equador), aztreonam (Bristol-Myers Squibb S.p.A, Roma, Itália), gentamicina (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) e piperacilina sódica/tazobactama sódica (Lederle Piperacilin, Inc., Porto Rico, EUA).

Para a determinação da CIM pelo método de Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia) foram utilizadas fitas com concentrações de 0,064 a 1024 µg/mL para colistina e polimixina B.

3.2.3 Teste de disco-difusão (método de Kirby-Bauer)

3.2.1 Preparo da suspensão bacteriana e inoculação nas placas

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm. Com auxílio de *swab* de algodão, a

suspensão foi inoculada de maneira homogênea em placa de Petri (150mm de diâmetro) com ágar Mueller-Hinton. Os procedimentos seguidos nesta etapa foram realizados de acordo com as normas padronizadas pelo documento M2-A7 do NCCLS (2000).

3.2.2 Aplicação dos discos e incubação das placas

Após um período de 15 minutos, os discos de colistina e polimixina B foram aplicados nas placas. As mesmas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas, em atmosfera ambiente (CLSI, 2005).

3.2.3 Leitura das placas

Os diâmetros (milímetros) dos halos de inibição foram medidos com auxílio de régua e comparados com os pontos de corte propostos por Gales et al., (2001) (Tabela 1). Os isolados foram, então, caracterizados em sensíveis ou resistentes.

Tabela 1 – Critérios interpretativos para disco-difusão de colistina e polimixina B para isolados de *P. aeruginosa* (Gales et al., 2001)

Antimicrobiano (Concentração do disco)		Halo de inibição (mm)		
		S	I	R
Colistina	(10µg)	≥ 14	-	≤ 10
Polimixina B	(300U)	≥ 14	-	≤ 10

3.2.4 Determinação da CIM (método de microdiluição em caldo)

3.2.4.1 Preparo da solução estoque do antimicrobiano

Os antimicrobianos testados apresentaram em seu rótulo as seguintes informações: número do lote, prazo de validade e a potência expressa em UI/mg ou µg/mg. A solução estoque de antimicrobiano foi preparada a uma concentração final de 10mg/mL. Para cada antimicrobiano foi empregado o solvente adequado, conforme os procedimentos padronizados pelo CLSI (2005). Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/mg)}}$$

3.2.4.2 Número de diluições

As concentrações testadas abrangeram os cortes descritos na Tabela 2B do documento M100-S15 (para uso com M7-A5, 2002) do CLSI, de 0,125µg/mL a 256,0µg/mL. A solução inicial de 256,0µg/mL foi obtida a partir da solução estoque de concentração igual a 10.000µg/mL. Foram realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado para cada antimicrobiano (CLSI, 2005)

3.2.4.3 Preparo das diluições na microplaca

Um volume de 50 μ L de meio de cultura CMHCA foi aplicado em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1. Foi acrescentado 100 μ L da diluição a 256,0 μ g/mL em todos os poços da coluna 1. Com uma pipeta multicanal, realizou-se a diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 μ L do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). A mistura foi bem homogeneizada e em seguida foi pipetado 50 μ L do poço A2 para o A3. Este procedimento foi realizado até o poço A11, tendo este um volume final de 100 μ L, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço, com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A₁₂-H₁₂) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, foram inoculados 50 μ L de meio de cultura CMHCA mais 50 μ L da suspensão bacteriana (diluída 1:100).

3.2.4.4 Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm. Esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ou CMHCA ($\sim 1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

3.2.4.5 Inoculação da suspensão bacteriana

Foi adicionado 50µL da suspensão bacteriana diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). Após o preparo das diluições, a inoculação foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos. Após semeadura, as placas foram homogeneizadas por movimento rotatório e colocadas em saco plástico estéril. Foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas em atmosfera ambiente (CLSI, 2005).

3.2.4.6 Leitura das CIMs

A leitura foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos poços da microplaca por dois pesquisadores e por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 625nm.

3.2.5 Determinação da CIM (método de Etest®)

3.2.5.1 Preparo da suspensão bacteriana e inoculação nas placas

Para realização desta técnica, foi preparada uma suspensão bacteriana, em solução fisiológica estéril, na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria (densidade óptica entre 0,08 a 0,01 em comprimento de onda de 625nm). Com auxílio de *swab* de algodão, a suspensão foi inoculada de maneira homogênea em placa de Petri (150mm

de diâmetro) contendo ágar Mueller-Hinton pH 7,2 e espessura de 4 milímetros. As fitas de Etest[®] de colistina (CO) e polimixina B (PB) foram aplicadas sobre a placa e estas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas, em atmosfera ambiente. Os procedimentos para leitura e interpretação do teste foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.5.2 Leitura das CIMs

A leitura da CIM pelo método de Etest[®] foi feita de acordo com as instruções do fabricante e por dois pesquisadores.

3.2.6 Interpretação dos resultados

Os critérios de interpretação das CIMs foram realizados de acordo com as normas padronizadas pelo CLSI (2005). A CIM determinada pelo método de Etest[®] foi categorizada de acordo com os critérios interpretativos propostos pelo CLSI para o método de microdiluição em caldo, coincidindo com os valores propostos pelo fabricante.

Os erros de sensibilidade foram determinados, de acordo com critérios publicados anteriormente (NCCLS, 2000; Steward et al., 1999). Foram considerados erros muito graves aqueles com falsa susceptibilidade, erros graves aqueles com falsa resistência e erros menores, aqueles com falsa resistência intermediária (Tabela 2).

Tabela 2- Tipos de erros de interpretação encontrados nos testes de sensibilidade.

Tipos de erro	CIM	Disco-difusão
Muito grave	R	S
Grave	S	R
Menor	S ou R	I
Menor	I	S ou R

R= Resistente; S = Sensível; I = Intermediário.

3.2.7 Controle de qualidade

De acordo com os critérios do CLSI (2005), foram utilizadas cepas controles de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922, para todos os testes de sensibilidades realizados.

3.2.8 Análise estatística

O coeficiente de correlação (R^2) para dois métodos aplicados na determinação da CIM para colistina e polimixina B foi estabelecido por uma análise de regressão linear. Valores de R^2 superiores a 50% foram considerados como correlação forte entre os métodos. Valores entre 25 e 50% evidenciaram correlação moderada e valores de R^2 inferiores a 25%, uma correlação fraca entre as variáveis analisadas (Nicodemo et al., 2004). Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 2.01, GraphPad Software, Inc. (Munro, 1997).

3.3 Protocolo para caracterização molecular por PFGE

A análise molecular foi feita pela técnica de eletroforese de campo pulsado, de acordo com os protocolos descritos por Kaufmann (1998) e Ridley (1998).

3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana

As bactérias foram repicadas em meio ágar sangue de carneiro 5% (AS) e incubadas por 18 a 24h, em temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo 3mL de caldo e incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, *overnight*. Foram transferidos aos microtubos, previamente pesados e identificados, cerca de 2mL do caldo com crescimento bacteriano. Os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, o sedimento foi lavado três vezes com 1mL de solução fisiológica estéril. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o microtubo foi pesado em balança analítica. A massa bacteriana foi calculada e, em seguida, adicionou-se um volume adequado de solução de EDTA 25mM pH8,0, obtendo uma suspensão bacteriana de concentração final de $100\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.3.2 Preparo dos blocos de agarose

Os blocos de DNA foram obtidos pela mistura de 225 μL de tampão TEN (Tris 100mM, pH7,5; EDTA 100mM; NaCl 150mM) acrescidos de 25 μL da suspensão bacteriana com 250 μL de agarose *low melting* (Bio-Rad) a 2%, em tampão 0,5XTBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M).

Esta mistura foi colocada em moldes específicos (Bio-Rad) e refrigeradas (4°C) por 30 minutos.

3.3.3 Etapa de extração do DNA bacteriano

Os blocos de agarose foram removidos dos moldes e incubados em 2mL de tampão EC (Tris 6mM, pH7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; Sarcosil 0,5%, Deoxicolato 0,2%) por 5 horas a 37°C, sob agitação suave. Após este período, o tampão foi retirado e foi acrescentado 2,0mL de tampão CHEF-TE (Tris 0,1M, pH7,5; EDTA 0,1M). Foi realizada uma lavagem com este último tampão e, em seguida, os blocos foram tratados *overnight*, a 50°C, com solução de concentração final de 1,0mg/mL de proteinase K (InVitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, 92008) em tampão ES (EDTA 0,4M, pH9,3; Sarcosil 1,0%). Após este período de incubação, os blocos foram lavados cinco vezes com 2,0mL de tampão CHEF-TE, em intervalos de uma hora sob leve agitação. Após a última lavagem, os blocos foram guardados a 4°C.

3.3.4 Etapa de restrição enzimática

Antes de realizar o tratamento enzimático, os blocos de agarose foram lavados cinco vezes com tampão DNS (Tris 0,1M, pH 8,0; Cloreto de magnésio 5mM), em intervalos de uma hora entre as lavagens. A restrição enzimática foi realizada com 5U de enzima de restrição *SpeI* (New England BioLabs, Inc., Beverly, Mass, USA) por amostra, num período de aproximadamente 15 horas, a uma temperatura de incubação de 37°C.

3.3.5 Preparo do gel

Os blocos tratados foram aplicados em gel de agarose a 1% (em TBE 0,5X). a eletroforese foi realizada no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) e o tampão de corrida utilizado (2 litros de TBE0,5X) foi acrescido de 200 μ L de tiouréa 0,5M (Silbert et al., 2003). Os padrões de variação da corrente elétrica (*switch time*) foi estabelecido de acordo com o microorganismo estudado. Para *P. aeruginosa*, as condições de corrida foram de 5 a 90 segundos (*switch time* inicial-final), 6 V/cm (corrente elétrica) e período de corrida de 24 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (1 μ g/mL) por 40 minutos, descorados em água destilada por mais 40 minutos e fotografados sob luz ultravioleta.

3.3.6 Interpretação dos resultados

Os perfis moleculares foram analisados visualmente, seguindo os critérios de Tenover et al. (1997) (Tabela 3).

Para o estudo do polimorfismo das bandas geradas pela eletroforese de campo pulsado, a imagem digitalizada foi analisada pelo programa “GelWorks 1D Advanced – UVP”, versão 4.01 e “GelWorks 1D Database – UVP”, versão 1.12. Os perfis foram agrupados de acordo com os coeficientes de similaridade de Dice e Jaccard e demonstrados graficamente na forma de dendrograma. Os coeficientes empregados utilizam o número de bandas em comum e o número total de possíveis posições das bandas para calcular a porcentagem de similaridade entre os isolados (Kaufmann, 1998).

Tabela 3 – Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular.

Interpretação microbiológica baseada nos resultados de tipagem	Número de diferenças genéticas comparadas com determinado isolado	Número de fragmentos diferentes comparados ao padrão de determinado isolado	Correlação epidemiológica
Indistinguíveis	0	0	Isolado faz parte do surto
Estreitamente relacionados	1	2-3	Isolado provavelmente faz parte do surto
Possivelmente relacionados	2	4-6	Isolado possivelmente faz parte do surto
Diferentes	3	≥ 7	Isolado não faz parte do surto

4. Resultados

4.1 Amostras bacterianas

Foram isoladas 229 amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes de pacientes com infecção de corrente sanguínea no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2003. No entanto, em virtude da viabilidade bacteriana, o presente estudo analisou 109 (47,6%) microorganismos de 93 pacientes, sendo que 51(47,2%) dos microorganismos foram isolados no ano de 2003 (Quadro 1).

Os quadros 2 e 3 representam a distribuição dos isolados de *P. aeruginosa* de acordo com ano de isolamento, unidades e clínicas de internação.

Não houve isolamento de cepas multirresistentes a partir de amostras de pacientes internados em berçário e unidades de terapia intensiva (UTI) neonatal.

Quadro 1 – Distribuição das 109 amostras bacterianas de *P. aeruginosa* de acordo com ano de isolamento.

Quadro 2 – Distribuição anual das 109 amostras bacterianas de *P. aeruginosa* de acordo com unidades de internação.

Quadro 3 – Distribuição anual das 109 amostras bacterianas de *P.*

aeruginosa multirresistentes nas clínicas de internação.

4.2 Perfil de sensibilidade

4.2.1 Determinação da CIM pelo método de microdiluição

Apenas dois isolados (1,7%) mostraram-se sensíveis (CIMs de 2,0 e 4,0µg/mL) ao meropenem e resistentes ao imipenem (CIMs de 64,0 e 32,0µg/mL, respectivamente) pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados das CIMs obtidas para os diferentes antimicrobianos testados encontra-se no Anexo A.

Os resultados obtidos evidenciam resistência à polimixina B (CIM igual a 8,0µg/mL) e sensibilidade à colistina (CIM igual a 0,5µg/mL) em apenas um isolado (0,9%) de *P. aeruginosa* multirresistente, mostrando que tanto a colistina (CIM₅₀, 1,0µg/mL) como a polimixina B (CIM₅₀, 0,5µg/mL) ainda são antimicrobianos altamente potentes contra estes microorganismos em nosso hospital (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Agente antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Intervalo	% Susceptibilidade
Imipenem	64,0	256,0	16,0 – 1024,0	0,0
Meropenem	32,0	256,0	2,0 – 1024,0	1,8
Colistina	1,0	1,0	<0,25 – 2,0	100,0
Polimixina B	0,5	1,0	<0,25 – 8,0	99,1 ^a
Aztreonam	64,0	128,0	1,0 - >128,0	7,4
Ceftazidima	128,0	>128,0	<0,25 - >128,0	8,3
Ciprofloxacina	32,0	64,0	<0,25 – 64,0	6,4 ^b
Cefepime	32,0	128,0	<0,25 - >128,0	7,3
Gentamicina	> 128,0	>128,0	0,5 - >128,0	20,2
Piperacilina/Tazobactam	>128,0	>128,0	1,0 - >128,0	13,8

^a Apenas um isolado considerado resistente (valor de CIM = 4,0µg/mL)

^b Encontrados sete isolados sensíveis, onde dois apresentaram resistência aos outros antimicrobianos, exceto às polimixinas B e E.

Em um total de 7 (6,4%) isolados, foi evidenciado um perfil de sensibilidade distinto, onde ciprofloxacina mostrou-se sensível enquanto os carbapenens foram resistentes (Tabela 5). Dois destes isolados foram resistentes a todos os antimicrobianos testados e os demais mostraram variações quanto à sensibilidade aos outros agentes. Não houve predomínio desses isolados em nenhuma unidade ou ano.

A Tabela 6 mostra outro perfil de sensibilidade evidenciado neste estudo, onde os isolados apresentaram sensibilidade à piperacilina-tazobactam e resistência ao imipenem.

Tabela 5 – Perfil de sensibilidade de isolados sensíveis à ciprofloxacina (CIM $\leq 1,0 \mu\text{g/mL}$).

Agente antimicrobiano	IS 1	IS 2	IS 3	IS4	IS 5	IS 6	IS 7
Imipenem	64,0	16,0	32,0	32,0	64,0	32,0	64,0
Meropenem	16,0	8,0	16,0	16,0	16,0	32,0	16,0
Colistina	1,0	<0,25	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5
Polimixina B	1,0	<0,25	0,5	8,0	1,0	1,0	0,5
Aztreonam	8,0	1,0	>128,0	16,0	8,0	16,0	>128,0
Ceftazidima	32,0	<0,25	>128,0	4,0	16,0	4,0	>128,0
Cefepime	32,0	0,5	64,0	8,0	16,0	8,0	64,0
Gentamicina	3,20	0,5	4,0	1,0	32,0	0,5	4,0
Piperacilina/Tazobactam	32,0	1,0	>128,0	16,0	>128,0	16,0	>128,0

IS: número do isolado; IS1 a IS5: pacientes de unidades Clínicas; IS6 e IS7: pacientes de unidades de terapia intensiva.

Tabela 6 - Perfil de sensibilidade (CIM) de 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes sensíveis à piperacilina-tazobactam (CIM $\leq 16,0 \mu\text{g/mL}$).

Agente	IS 1	IS 2	IS 3	IS4	IS 5	IS 6	IS7	IS 8
Imipenem	16,0	64,0	64,0	64,0	128,0	32,0	32,0	128,0
Meropenem	8,0	2,0	8,0	64,0	32,0	32,0	16,0	16,0
Colistina	<0,25	<0,25	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5
Polimixina B	<0,25	<0,25	0,5	<0,25	0,5	1,0	8,0	0,5
Aztreonam	1,0	4,0	8,0	32,0	16,0	16,0	16,0	32,0
Ceftazidima	<0,25	0,5	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Cefepime	0,5	<0,25	8,0	16,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Gentamicina	0,5	4,0	2,0	2,0	64,0	0,5	1,0	0,5
Ciprofloxacina	<0,25	8,0	8,0	16,0	32,0	<0,25	<0,25	32,0

IS: número do isolado; IS1, IS2, IS3, IS5 e IS7: pacientes de unidades Clínicas; IS4, IS6 e IS8: pacientes de Unidades de Terapia Intensiva

Do total de 109 isolados, 11 (10,1%), obtidos a partir de 9 pacientes, apresentaram CIM de 2,0µg/mL para colistina. O uso de colistina foi avaliado entre estes pacientes e apenas 3 (33,3%) haviam recebido doses de 3 a 6 milhões de unidades por dia, por um período de até 14 dias. Dentre estes 3 pacientes, apenas um teve hemocultura positiva no terceiro dia de tratamento. Os outros dois pacientes tiveram seus isolados obtidos antes do tratamento com colistina parenteral.

4.2.2 Comparação da CIM determinada pela microdiluição e Etest®

O método de Etest® é um teste de fácil realização quando comparado aos procedimentos utilizados para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo (Figura 5). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que as CIMs de colistina e polimixina B determinadas pelo método de Etest® são, em geral, maiores que as obtidas pela microdiluição em caldo (Tabelas 7 e 8). Dois isolados (1,8%) mostraram-se resistentes à colistina pelo método de Etest®, de acordo com os critérios anteriormente propostos (Gales et al., 2001), e sensíveis pela técnica de microdiluição, caracterizando assim um resultado falso resistente (erro grave).

Tabela 7 – Valores das CIMs para colistina obtidos por método de microdiluição em caldo e fitas de Etest® para 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Etest® (µg/mL)	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
Microdiluição (µg/mL)							
<0,25	1	-	5	-	1	2	-
0,5	-	2	6	16	8	-	1
1,0	1	2	6	21	22	3	1
2,0	1	2	3	5	-	-	-

Tabela 8 – Valores das CIMs para polimixina B obtidos por método de microdiluição em caldo e fitas de Etest® para 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Etest® (µg/mL)	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
Microdiluição (µg/mL)							
<0,25	1	-	1	4	6	8	3
0,5	-	-	-	8	16	9	4
1,0	-	-	1	9	13	11	9
2,0	-	-	-	-	1	3	1
4,0	-	-	-	-	-	-	-
8,0	-	-	-	-	-	-	1

Os resultados obtidos mostraram que, para alguns isolados, houve discordância entre os valores de CIM determinados por microdiluição em caldo e Etest[®] tanto para colistina como para polimixina B. Os tipos de erros obtidos neste estudo podem ser evidenciados no Anexo B.

Tabela 9 – Categoria do tipo de erro para polimixina B e colistina de acordo com metodologias de Etest[®] e Microdiluição.

Metodologias comparadas	Etest [®] e Microdiluição		
	Tipo de erro		
Antimicrobiano	MG	G	M
Polimixina B	-	17 (15,6%)	-
Colistina	-	02 (1,8%)	-

(MG = muito grave; G= grave; M= menor)

A comparação dos resultados das CIMs para polimixina B mostrou que 17 de 109 isolados (16,5%) foram sensíveis pela microdiluição em caldo (teste considerado padrão-ouro) e resistentes pelo Etest[®] e apenas um (0,9%) isolado evidenciou concordância entre os métodos, porém exibindo valores maiores de CIM pelo método da microdiluição (isolado 98; Anexo B).

Do total de 109 isolados estudados, apenas um (0,9%) mostrou-se resistente para polimixina B pelos métodos de microdiluição e Etest[®] (CIM de 8,0 µg/mL e 4,0 µg/mL, respectivamente) e sensível por disco-difusão, confirmando resultados previamente descritos em outros estudos (Gales et al., 2001; Nicodemo et al., 2004).

A análise estatística realizada entre os dois métodos capazes de determinar a CIM (microdiluição e Etest®) evidenciou uma correlação fraca ($R^2 < 25\%$) entre eles, tanto para colistina (Figura 3) como para polimixina B (Figura 4).

Figura 3 – Regressão linear entre os testes de sensibilidade que determinam a CIM para colistina de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Figura 4 – Regressão linear entre os testes de sensibilidade que determinam a CIM para polimixina B de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Figura 5 – Leituras do halo de inibição (disco-difusão) e CIM (método de Etest[®]) para colistina.

4.2.3 Comparação entre disco-difusão e microdiluição

As figuras 6 e 7 representam os resultados de sensibilidade encontrados para 109 isolados de *P. aeruginosa* analisados por método qualitativo (difusão em agar) e quantitativo (microdiluição em caldo). Os tipos de erros obtidos para polimixina B e colistina conforme metodologia de disco-difusão e microdiluição estão representados na Tabela 10.

Figura 6 – Resultados comparativos entre CIM (microdiluição em caldo) e halos de inibição obtidos com discos de colistina 10µg. As linhas pontilhadas indicam os valores de corte propostos por Gales et al. (2001).

Figura 7 – Resultados comparativos entre CIM (microdiluição em caldo) e halos de inibição obtidos com discos de polimixina B 300U. As linhas pontilhadas indicam os valores de corte propostos por Gales et al. (2001).

Tabela 10 – Categoria do tipo de erro para polimixina B e colistina de acordo com as metodologias de disco-difusão e microdiluição.

Metodologias comparadas	Disco-Difusão e Microdiluição		
	Tipo de erro		
Antimicrobiano	MG	G	M
Polimixina B	01 (0,9%)	-	48 (44,0%)
Colistina	-	-	07 (6,4%)

4.3 Controle de qualidade

As cepas empregadas como controle de qualidade (CQ) dos testes realizados para caracterizar a resistência às polimixinas mostraram os mesmos resultados previamente descritos por Gales et al. (2001). Os demais antimicrobianos tiveram seus resultados de sensibilidade validados de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2005).

4.4 Tipagem molecular

Todas as amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes foram tipáveis pela técnica de eletroforese em campo pulsado.

Do total de 109 isolados, 37 (33,9%) apresentaram um mesmo padrão molecular, denominado de padrão predominante ou padrão A, durante o período de estudo (Figura 8). Dos 72 (66,1%) padrões distintos ao padrão A, 30 (41,7%) mostraram-se estreitamente relacionados ao padrão predominante e 27 (37,5%) foram classificados como distintos do padrão A pelos critérios propostos por Tenover et al. (1995). (Tabela 11)

A distribuição dos diversos padrões moleculares identificados por PFGE, nas diferentes unidades de internação durante os anos de 1998 a 2002, está representada na Figura 9.

Entre as 51 amostras de *P. aeruginosa*, isoladas no ano de 2003, a técnica de PFGE identificou 36 padrões moleculares diferentes, evidenciando a presença de um padrão predominante em 11 (21,6%) isolados (Tabela 12). Os perfis moleculares evidenciados no ano de 2003 podem ser visualizados na Figura 10.

A análise do polimorfismo das bandas geradas pela PFGE está representada graficamente pelo dendrograma (Figura 11). De acordo com esta análise, observou-se a presença de 7 grupos de isolados, sendo um deles representado pelo padrão A e isolados estreitamente relacionados a ele. Não houve predomínio de genótipos entre estes grupos, quando comparados em relação as unidades e data de coleta das amostras (Anexo C).

O polimorfismo das bandas determinado visualmente mostrou algumas diferenças quando comparado ao analisado pelo dendrograma. Do total de 51 padrões moleculares observados por PFGE, no ano de 2003, apenas 42 foram submetidos à análise por similaridade, pois 9 foram considerados como idênticos ao padrão A. Dos 42 padrões moleculares analisados pelo coeficiente de similaridade, apenas 3 (7,1%) isolados foram categorizados como diferentes pela análise visual e como estreitamente relacionados pelo dendrograma.

Foram analisados, por PFGE, diferentes isolados obtidos a partir do mesmo paciente. Do total de 27 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes obtidos a partir de 11 pacientes, nenhum paciente apresentou diferentes padrões moleculares entre os isolados estudados (Figura 12). Destes 11 pacientes, 8 (72,7%) estavam em uso de colistina parenteral no momento da coleta. Vinte isolados (20/109; 18,4%) destes 8 pacientes foram analisados genotipicamente, não evidenciando diferenças entre os padrões definidos.

Figura 8 – Padrão molecular predominante (padrão A) encontrado em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes dos anos de 1998 a 2002. Colunas 1 e 16: peso molecular 50 a 1000kb (New England, BioLabs); Colunas 2 a 8: isolados em 1998; Coluna 9: isolado em 1999; Coluna 10: isolado em 2000; Colunas 11 a 15 e 17 a 20: isolados em 2001; Colunas 21 e 22: isolados em 2002; Colunas 23 a 28: isolados em 2003.

Tabela 11 – Análise molecular de 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, realizada de acordo com critérios propostos por Tenover et al. (1995).

Padrão Molecular	Número de isolados
Padrão A	37 (33,9%)
Estreitamente relacionados	30 (27,5%)
Possivelmente relacionados	15 (13,8%)
Diferentes	27 (24,8%)

Figura 9 – Padrões moleculares encontrados em isolados dos anos de 1998 a 2002. Coluna 1: peso molecular 50 a 1000kb (New England, BioLabs); Colunas 2 a 6: isolados 1998; Colunas 7 a 9: isolados 1999; Colunas 10 a 13: isolados 2000; Colunas 14 a 16: isolados 2001; Colunas 17 e 18: isolados 2002; Colunas 3, 4, 6, 7, 13 e 14: padrão A.

Tabela 12- Distribuição dos 51 padrões moleculares identificados de acordo com os critérios de Tenover et al. (1997), no ano de 2003.

Padrão Molecular	Número de isolados
Padrão A	11 (21,6%)
Estreitamente relacionados ^a	10 (19,6%)
Possivelmente relacionados	08 (15,7%)
Diferentes ^b	22 (43,1%)

^a Dois isolados com mesmo padrão molecular

^b Quatro isolados com mesmo padrão molecular

Figura 10 – Padrões moleculares encontrados em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes do ano de 2003. PM (peso molecular de 50 a 1000kb (New England, BioLabs)). Dados adicionais sobre cada isolado podem ser encontrados no anexo 1.

Figura 11 – Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice do perfil de bandas obtido a partir da técnica de PFGE com a utilização de enzima de restrição *SpeI* para digestão de DNA genômico de cepas de *P. aeruginosa*.

Figura 12 – Padrões moleculares identificados por PFGE. Isolados de 10 pacientes obtidos de hemoculturas coletadas em diferentes datas. Coluna 1, 15 e 27: peso molecular 50 a 1000kb (New England, BioLabs); Colunas 2 e 3: paciente 1 (sem uso prévio de colistina); Colunas 4 e 5: paciente 2; Colunas 6 e 7: paciente 3; Colunas 8 e 9: paciente 4; Colunas 10 a 12: paciente 5 (sem uso prévio de colistina); Colunas 13 e 14: paciente 6 (sem uso prévio de colistina); Colunas 16 a 18: paciente 7; Colunas 19 e 20: paciente 8 (isolados com padrão molecular estreitamente relacionados); Colunas 21 a 23: paciente 9; Colunas 24 a 26: paciente 10.

4.5 Comparação entre perfil de sensibilidade e análise molecular

A Tabela 13 sumariza os resultados fenotípicos encontrados entre os isolados caracterizados como pertencentes ao padrão A.

Tabela 13 – Perfil de sensibilidade dos 37 isolados pertencentes ao padrão A.

Agente	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Intervalo	% Sensibilidade
Imipenem	64,0	64,0	16,0 – 128,0	0,0
Meropenem	32,0	64,0	16,0 – 64,0	0,0
Colistina	1,0	1,0	<0,25 – 2,0	100,0
Polimixina B	1,0	1,0	<0,25 – 2,0	100,0
Aztreonam ^a	64,0	128,0	16,0 - 128,0	0,0
Ceftazidima	128,0	128,0	4,0 - >128,0	9,7
Ciprofloxacina	32,0	64,0	0,5 – 64,0	0,0
Cefepima ^b	32,0	32,0	8,0 – 32,0	9,7
Piperacilina/Tazobactam	>128,0	>128,0	16,0 - >128,0	9,7

^a 1 isolado foi caracterizado como intermediário e 30 foram resistentes

^b 5 isolados foram caracterizados como intermediários e 23 resistentes

5 Discussão

Os bacilos Gram-negativos, principalmente a *Pseudomonas aeruginosa*, representam uma importante causa de infecções em pacientes hospitalizados e são conhecidos como um grupo de microorganismos altamente resistentes aos antimicrobianos. Devido ao aumento da prevalência e da disseminação destas bactérias, amplamente observada no ambiente hospitalar, estudos de resistência e de tipagem molecular ganharam muita importância nos últimos anos (Pfaller et al., 2001; Jones et al., 2003).

Um estudo de tendência realizado no Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), no período de 1998 a 2003, que avaliou 1.121 episódios de infecção de corrente sanguínea em unidades de terapia, demonstrou que *P. aeruginosa* era o quarto agente de infecção de corrente sanguínea e que 53% dos isolados de *P. aeruginosa* eram resistentes ao imipenem (Girão et al., 2004). Este mesmo estudo evidenciou um aumento de infecção de corrente sanguínea causada por microorganismos Gram-negativos ($p=0,04$), devido especificamente ao aumento de infecções causadas por *A. baumannii*, e demonstrou também que não houve aumento da incidência de infecção de corrente sanguínea causada por *P. aeruginosa* no período estudado e tampouco da sua resistência ao imipenem (Girão et al., 2004). Os isolados avaliados por Girão et al. (2004) eram predominantemente de unidades clínicas e de terapia intensiva.

Em estudo realizado por Martins et al. (2004), a taxa de infecção de corrente sanguínea por microorganismos Gram-negativos multirresistentes foi avaliada após a implantação de medidas de controle em unidades de terapia intensiva. O uso de medidas de intervenção mostrou-se eficaz na redução do número de infecções nestas unidades ($p < 0,001$), evidenciando assim a importância das medidas de controle na prevenção de infecções hospitalares.

Dados do *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS) de 2003 demonstram que, de 52 unidades de terapia intensiva de hospitais americanos onde foram testados 14.051 isolados de *P. aeruginosa*, 90% das unidades apresentaram 20% de resistência ao imipenem, resultado este bem abaixo da resistência encontrada nas unidades de terapia intensiva do Hospital das Clínicas em estudo realizado por Girão et al., em 2004 (NNIS, 2003).

A pressão seletiva devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos e as hospitalizações prolongadas, dentre outros fatores, contribuem para a emergência de microorganismos multirresistentes. O aumento das infecções causadas por estes microorganismos proporcionou o uso das polimixinas via intravenosa associada à necessidade de aperfeiçoar os métodos de avaliação de resistência *in vitro* à polimixina B e colistina.

A atividade antimicrobiana das polimixinas para isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes é bem conhecida na prática médica. No entanto, poucos estudos têm sido publicados sobre a avaliação *in vitro* do perfil de sensibilidade às polimixinas para estes isolados, o que dificulta a

realização de uma correlação clínico-laboratorial para microorganismos multirresistentes.

Em 1970, o NCCLS determinou os limites de corte de sensibilidade para a polimixina B e colistina (NCCLS, 1979). Entretanto, com a introdução de aminoglicosídeos e β -lactâmicos de amplo espectro para o tratamento de infecções por Gram-negativos, o uso das polimixinas tornou-se incomum e praticamente restrito a uso tópico. Assim, o NCCLS optou por excluir os critérios interpretativos para as polimixinas do documento. Atualmente, o CLSI padronizou critérios interpretativos para polimixina B e colistina somente por métodos de microdiluição em caldo e diluição em ágar.

No entanto, o CLSI determina que a atividade antimicrobiana da polimixina B pode prever a susceptibilidade da colistina (CLSI, 2005). Neste estudo, evidenciamos a ocorrência de apenas um isolado (0,9%) resistente à polimixina B e sensível a colistina. É possível que os mecanismos de resistência envolvidos em diferentes fenótipos sejam realmente distintos, permitindo assim a existência de diversos perfis de sensibilidade mesmo entre isolados multirresistentes.

De acordo com os resultados das CIMs determinadas neste estudo, a maioria dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes ainda permanece susceptível a ação das polimixinas, principalmente para colistina. Apenas um isolado apresentou resistência à polimixina B pelo método de microdiluição em caldo (CIM 8,0 μ g/mL) e Etest[®] (CIM 4,0 μ g/mL).

Estudos mais recentes mostram a emergência de resistência à polimixina B em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes (Bratu et al.,

2005; Landman et al., 2005). Bratu et al. (2005), demonstraram que, de um total de 691 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, obtidos de 15 hospitais nova-iorquinos (EUA), num período de 3 meses no ano de 2001, nenhum isolado apresentou resistência à polimixina B (CIM < 4,0 µg/mL). Landman et al. (2005), analisaram um total de 527 isolados em 11 hospitais americanos (NY, EUA), num período de 3 meses em 2003, e evidenciaram a emergência de 25 (5,0%) isolados com susceptibilidade reduzida à polimixina B (CIM > 2,0µg/mL). Estes dados mostram que isolados de *P. aeruginosa* raramente desenvolvem resistência às polimixinas.

A determinação de CIM pelo método de Etest[®] é uma técnica de fácil execução, porém os resultados obtidos não foram aparentemente concordantes com os valores determinados pela microdiluição em caldo.

Nicodemo et al. (2004) demonstraram que há discordância entre os resultados de sensibilidade para polimixina B e colistina, quando 70 isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* foram analisados por diferentes metodologias. Neste estudo, 78,8% e 77,3% dos isolados foram considerados sensíveis para a polimixina B e 80,0% e 75,7% para a colistina pelos métodos de Etest[®] e diluição em agar, respectivamente. Os isolados com CIM de 4,0µg/mL para polimixina B e colistina explicaram a existência de erros (erros muito graves, erros graves e erros menores) na interpretação dos testes de sensibilidade. No entanto, este mesmo estudo demonstrou que existe uma concordância de 96,7% e 89,4% entre os resultados obtidos pelo método de Etest[®] e diluição em agar para colistina e polimixina B, respectivamente. Entretanto, o presente estudo, evidenciou uma fraca

correlação entre os métodos de Etest® e microdiluição em caldo tanto para colistina (R^2 0,011) como para polimixina B (R^2 0,044).

De acordo com os resultados evidenciados neste estudo, o método de Etest® poderia ser útil na triagem de resistência bacteriana à colistina (1,8% de erros graves), pois os percentuais de erros estão concordantes com o limite estabelecido pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Entretanto, este método não mostrou-se eficiente para polimixina B devido à elevada quantidade de erros graves (15,6%) observados.

Em virtude da escassez de publicações anteriores, salientamos a necessidade de outros estudos para avaliar melhor a aplicabilidade da metodologia de Etest® na determinação do perfil de sensibilidade para as polimixinas.

Os testes de sensibilidade aplicados neste estudo permitiram evidenciar que resultados mais fidedignos para avaliar o perfil de susceptibilidade às polimixinas podem ser obtidos pela técnica de microdiluição em caldo. Hogardt et al. (2004) demonstraram que o método da microdiluição em caldo pode ser considerado uma técnica válida, rápida e de baixo custo na determinação da CIM. Este estudo mostrou que os valores das CIMs para colistina e polimixina B de isolados de *P. aeruginosa* obtidos pelo método de microdiluição em caldo foram inferiores aos obtidos pelo método de diluição em ágar.

No entanto, os critérios interpretativos para determinação da CIM ainda não são aplicados uniformemente entre as comunidades científicas. Os limites de sensibilidade para as polimixinas propostos pela BSAC (*British*

Society for Antimicrobial Chemotherapy) definem como sensíveis os isolados com CIM $\leq 4,0\mu\text{g/mL}$ e resistentes com CIM $\geq 8,0\mu\text{g/mL}$. Para a *Société Française de Microbiologie* (FSM) os limites recomendados para isolados determinados como sensíveis abrangem CIMs $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$ e aqueles categorizados como resistentes, CIMs $> 2,0\mu\text{g/mL}$. O documento M100-S15 do CLSI (2005), recomenda critérios distintos dos anteriormente descritos (sensível para CIM $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$ e resistente para CIMs $\geq 4,0\mu\text{g/mL}$), e, por tratar-se de um documento amplamente seguido na rotina dos laboratórios brasileiros, optamos por utilizá-lo neste estudo.

Em relação à avaliação comparativa dos resultados discordantes entre os métodos de microdiluição em caldo e disco-difusão, foi possível verificar a ocorrência de erros muito graves (0,9%) e erros menores (44,0%) para polimixina B. Para colistina foram observados apenas erros menores (6,4%). Embora os percentuais de erros estejam acima do limite permitido pelo FDA, talvez o método de disco-difusão possa ser utilizado como um método de triagem da resistência a colistina. Estudos mais minuciosos deverão ser realizados com o intuito de determinar a aplicabilidade desta metodologia na rotina laboratorial. resultado do disco difusão deve ser sempre confirmado com a determinação da CIM por um método de diluição.

Estudo realizado por Gales et al. (2001) evidenciou baixa difusão em ágar da polimixina B e colistina pelo método de difusão de disco, detectando falsa sensibilidade (erros muito graves) em 5% de 200 isolados de bacilos Gram-negativos. Este mesmo estudo sugere que a metodologia de disco-difusão para esta classe de antimicrobianos deve ser confirmada pela

determinação da CIM, por diluição em ágar ou microdiluição em caldo, principalmente para isolados de infecções sistêmicas.

Em estudo realizado por Nicodemo et al. (2004), foi evidenciado uma fraca correlação entre os métodos de disco-difusão e diluição em ágar para polimixinas com frequência de 18,1% e 22,7% de resultados falso-resistentes para polimixina B e colistina, respectivamente, em 70 isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*.

O baixo percentual de resistência a polimixina B e a ausência de isolado resistente a colistina em um período de seis anos, evidenciados no presente estudo, é surpreendente, uma vez que o aparecimento da resistência bacteriana está associada à pressão seletiva por antimicrobianos.

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade de isolados multirresistentes em pacientes que haviam utilizado colistina via intravenosa. Nossos resultados mostraram que não houve resistência à colistina, mesmo após sua introdução, em 1993, na prática clínica de nosso hospital. A incidência de isolados com CIM de 2,0µg/mL para colistina em pacientes com uso prévio deste antimicrobiano, também indica uma possível emergência de resistência bacteriana no futuro.

Os resultados deste estudo mostraram que 20 isolados em momentos diferentes, com intervalo de 1 a 57 dias, a partir de 8 pacientes com infecção de corrente sanguínea, não apresentaram resistência à colistina mesmo após o uso terapêutico deste antimicrobiano. Este resultado mostrou-se muito interessante, em virtude da ampla utilização deste antimicrobiano no

tratamento de infecções causadas por microorganismos multirresistentes em nosso hospital.

No presente estudo, foi observado também que a resistência ao imipenem, determinada pelo método de microdiluição em caldo, foi bastante similar ao meropenem. Apenas 2 (1,8%) isolados foram resistentes ao meropenem e 5 (4,6%) apresentaram resistência intermediária a este antimicrobiano, sendo que todos foram resistentes ao imipenem.

Uma das limitações do presente estudo foi a perda de isolados multirresistentes, devido à inviabilidade de alguns microorganismos, principalmente aqueles isolados em anos anteriores (1998 a 2002), dificultando assim uma análise mais minuciosa do perfil de sensibilidade destes isolados ao longo do período de estudo.

Sete isolados *P. aeruginosa* apresentaram um perfil de sensibilidade diferente, sendo sensíveis a ciprofloxacina. Estes isolados foram identificados com frequência de 71% no ano de 2003, não havendo, entretanto, predomínio destes isolados em nenhuma unidade de internação. Estes isolados também apresentaram diferentes padrões moleculares, não demonstrando assim ser um único *cluster* com este perfil de sensibilidade. Estudos realizados por Sahm et al., em 2001, relataram a presença deste mesmo fenótipo em 23 (34,3%) isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem. Este perfil diferente de sensibilidade à ciprofloxacina pode ser decorrente da produção de carbapenemases, já que tanto a alteração da permeabilidade da membrana externa das *P. aeruginosa* quanto a alteração

da bomba de efluxo podem levar a resistência cruzada com ciprofloxacina (Livermore, 2002).

A análise molecular dos isolados evidenciou a presença de um padrão predominante durante o período de estudo (1998 a 2003), determinado como padrão A, indicando assim a possível existência de um genótipo multirresistente em nosso hospital. Em estudo realizado por Pellegrino et al. (2002), também foi caracterizada a presença de um genótipo predominante, denominado genótipo A, em 27% de 63 isolados obtidos de quatro hospitais privados do estado do Rio de Janeiro.

Isolados de um mesmo paciente identificados em diferentes momentos (totalizando 8 pacientes) apresentaram, sempre quando comparados entre si o mesmo padrão molecular, demonstrando assim que aparentemente o paciente permanecia infectado com a mesma cepa bacteriana.

A análise molecular pelo dendrograma, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice, no ano de 2003, confirmou a presença de um padrão molecular predominante (11/51; 21,6%) e a presença de 2 grupos de isolados estreitamente relacionados, 4 grupos possivelmente relacionados e um grupo distinto ao padrão A. Estes resultados são similares àqueles determinados pela análise visual baseada nos critérios propostos por Tenover et al. (2005).

Não houve um predomínio dos isolados em nenhuma unidade e período específicos, durante o ano de 2003. Este dado nos permite concluir que não houve um surto hospitalar durante este período.

A tipagem molecular vem sendo amplamente utilizada como ferramenta importante para auxiliar o entendimento e controle das infecções nosocomiais. Os resultados deste estudo mostraram que a presença de 7 grupos de isolados multirresistentes pode ser facilmente identificada por PFGE e que um maior conhecimento da distribuição genotípica destes microorganismos pode favorecer um melhor entendimento da disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados na prática médica.

A possível existência de um genótipo predominante enfatiza a importância de medidas de intervenção que diminuam a infecção cruzada como isolamento de contato, melhor adequação da área física das unidades de terapia intensiva e maior aderência às medidas básicas de controle de infecção hospitalar como higiene das mãos.

Assim sendo, estudos futuros que correlacionem melhor a resistência *in vitro* e *in vivo*, bem como as medidas de controle na disseminação de microorganismos multirresistentes, serão de grande valia na evolução epidemiológica das infecções hospitalares.

6 Conclusões

Não houve presença de isolados resistentes para colistina pelo método de microdiluição, entretanto foram encontrados 0,9% de isolados resistentes para polimixina B.

Houve uma fraca correlação entre os métodos de microdiluição e Etest para colistina e polimixina B, evidenciada pela quantidade de erros graves (15,6%) para polimixina B e (1,8%) para colistina.

O método de Etest não deve ser empregado para determinar o perfil de sensibilidade para a polimixina B.

O método de disco-difusão não mostrou ser útil na determinação do perfil de sensibilidade às polimixinas de isolados multirresistentes, apresentando erros muitos graves (0,9%) para polimixina B e erros menores para colistina.

Aparentemente os métodos de difusão utilizados, Etest e disco-difusão, demonstraram melhores resultados para colistina do que para polimixina B, podendo ser talvez utilizados como métodos de triagem da resistência à colistina.

Isolados pertencentes ao padrão molecular predominante foram identificados em todos os anos avaliados no estudo.

De acordo com a análise molecular, realizada pelo dendrograma dos isolados obtidos no ano de 2003, foi caracterizada a presença de sete grupos de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes, evidenciando um grupo distinto, dois grupos estreitamente relacionados e quatro grupos possivelmente relacionados geneticamente ao padrão molecular predominante.

Os pacientes que receberam colistina parenteral não apresentaram isolados resistentes. Pacientes com mais de um isolado, em momentos diferentes, não apresentaram resistência às polimixinas e nem alteração genotípica dos isolados.

Anexo A – Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos

N	No LIM	CIM IM	CIM ME	CIM CO	CIM PB	Etest CO	Etest PB	CIM ATM	CIM CAZ	CIM CIP	CIM CPM	CIM P/T	CIM GEN
1	4	512,0	512,0	1,0	1,0	1,00	3,00	16,0	>128,0	64,0	128,0	>128,0	>128,0
2	5	1024,0	512,0	1,0	1,0	2,00	2,00	16,0	>128,0	32,0	128,0	>128,0	>128,0
3	6	64,0	32,0	1,0	1,0	1,00	3,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	32,0
4	7	64,0	32,0	2,0	1,0	1,00	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
5	8	64,0	32,0	2,0	1,0	1,50	2,00	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
6	9	32,0	8,0	1,0	1,0	2,00	2,00	>128,0	>128,0	16,0	32,0	64,0	>128,0
7	10	64,0	16,0	1,0	1,0	2,00	3,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
8	11	64,0	16,0	1,0	1,0	0,50	2,00	64,0	8,0	16,0	64,0	64,0	>128,0
9	12	64,0	64,0	1,0	1,0	0,75	1,50	128,0	16,0	32,0	64,0	128,0	>128,0
10	13	64,0	16,0	1,0	1,0	0,75	3,00	128,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0
11	14	64,0	32,0	1,0	1,0	2,00	3,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
12	15	64,0	32,0	1,0	1,0	1,00	3,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
13	16	64,0	16,0	1,0	1,0	3,00	1,50	32,0	64,0	32,0	16,0	>128,0	>128,0
14	18	64,0	32,0	1,0	1,0	2,00	2,00	128,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0
15	21	512,0	512,0	1,0	1,0	2,00	2,00	16,0	>128,0	32,0	128,0	>128,0	>128,0
16	23	32,0	16,0	1,0	1,0	2,00	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0

“continuação”

Anexo A – Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos

N	No LIM	CIM IM	CIM ME	CIM CO	CIM PB	Etest CO	Etest PB	CIM ATM	CIM CAZ	CIM CIP	CIM CPM	CIM P/T	CIM GEN
17	24	512,0	512,0	1,0	1,0	2,00	1,00	32,0	>128,0	32,0	128,0	>128,0	>128,0
18	25	32,0	16,0	1,0	1,0	2,00	1,50	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
19	26	32,0	32,0	1,0	1,0	3,00	1,50	64,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0
20	27	32,0	32,0	1,0	1,0	2,00	1,50	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
21	28	64,0	32,0	1,0	1,0	1,50	2,00	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
22	29	64,0	16,0	1,0	1,0	1,50	1,50	32,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	32,0
23	30	64,0	16,0	1,0	1,0	1,00	4,00	8,0	32,0	<0,25	32,0	32,0	32,0
24	31	64,0	32,0	1,0	1,0	2,00	3,00	64,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0
25	32	64,0	16,0	2,0	2,0	1,50	2,00	32,0	64,0	32,0	16,0	>128,0	>128,0
26	33	64,0	32,0	1,0	1,0	1,50	2,00	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
27	34	64,0	16,0	1,0	1,0	1,00	4,00	32,0	32,0	64,0	32,0	128,0	16,0
28	35	64,0	256,0	2,0	2,0	1,00	3,00	32,0	32,0	64,0	32,0	64,0	8,0
29	36	64,0	256,0	2,0	2,0	1,00	3,00	32,0	32,0	64,0	32,0	64,0	8,0
30	37	64,0	256,0	2,0	2,0	0,75	4,00	32,0	32,0	64,0	32,0	64,0	8,0
31	38	64,0	256,0	2,0	1,0	1,50	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
32	39	64,0	32,0	2,0	1,0	0,50	2,00	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
33	40	64,0	32,0	1,0	0,5	2,00	3,00	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
34	41	64,0	32,0	0,5	<0,25	2,00	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
35	42	64,0	32,0	0,5	0,5	1,00	2,00	128,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0

"continuação"

Anexo A – Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos

N	No LIM	CIM IM	CIM ME	CIM CO	CIM PB	Etest CO	Etest PB	CIM ATM	CIM CAZ	CIM CIP	CIM CPM	CIM P/T	CIM GEN
36	43	64,0	64,0	<0,25	<0,25	2,00	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
37	44	64,0	32,0	0,5	0,5	1,50	2,00	>128,0	>128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
38	45	64,0	16,0	0,5	0,5	2,00	4,00	>128,0	>128,0	1,0	64,0	>128,0	4,0
39	46	64,0	32,0	0,5	0,5	1,50	3,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
40	47	64,0	32,0	0,5	0,5	1,00	4,00	128,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0
41	49	32,0	16,0	<0,25	<0,25	1,00	3,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	2,0
42	50	32,0	32,0	0,5	0,5	1,50	3,00	64,0	32,0	32,0	32,0	128,0	16,0
43	51	32,0	32,0	0,5	0,5	2,00	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	1,0
44	52	32,0	32,0	0,5	0,5	1,50	1,50	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
45	53	512,0	1024,0	1,0	1,0	1,50	1,50	64,0	64,0	32,0	32,0	128,0	>128,0
46	54	32,0	16,0	0,5	0,5	0,75	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
47	55	32,0	16,0	0,5	0,5	1,00	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
48	56	32,0	16,0	0,5	0,5	2,00	2,00	128,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
49	57	32,0	16,0	0,5	0,5	1,50	2,00	64,0	128,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
50	58	64,0	64,0	0,5	0,5	1,50	3,00	128,0	64,0	16,0	16,0	128,0	>128,0
51	59	64,0	64,0	1,0	0,5	1,50	2,00	128,0	128,0	64,0	32,0	>128,0	>128,0
52	60	64,0	64,0	0,5	0,5	1,50	1,50	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
53	61	64,0	64,0	1,0	0,5	1,50	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
54	62	64,0	64,0	<0,25	<0,25	1,00	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0

"continuação"

Anexo A – Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos

N	No LIM	CIM IM	CIM ME	CIM CO	CIM PB	Etest CO	Etest PB	CIM ATM	CIM CAZ	CIM CIP	CIM CPM	CIM P/T	CIM GEN
55	63	64,0	32,0	0,5	0,5	1,50	3,00	>128,0	>128,0	4,0	64,0	>128,0	>128,0
56	64	64,0	64,0	1,0	1,0	1,50	1,50	32,0	32,0	32,0	32,0	128,0	>128,0
57	65	512,0	256,0	1,0	0,5	1,50	3,00	64,0	>128,0	32,0	128,0	128,0	>128,0
58	67	32,0	64,0	0,5	0,5	1,50	3,00	64,0	64,0	32,0	32,0	128,0	8,0
59	82	16,0	8,0	<0,25	<0,25	3,00	4,00	1,0	<0,25	<0,25	0,5	1,0	0,5
60	83	32,0	64,0	0,5	<0,25	2,00	3,00	64,0	64,0	32,0	16,0	>128,0	>128,0
61	88	256,0	256,0	1,0	<0,25	1,50	3,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
62	89	512,0	512,0	0,5	<0,25	2,00	4,00	16,0	>128,0	32,0	128,0	>128,0	>128,0
63	91	16,0	16,0	0,5	<0,25	4,00	3,00	64,0	16,0	16,0	16,0	>128,0	>128,0
64	92	32,0	32,0	0,5	<0,25	1,00	1,50	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
65	93	64,0	16,0	1,0	<0,25	2,00	3,00	32,0	32,0	32,0	16,0	128,0	1,0
66	94	64,0	32,0	1,0	<0,25	1,50	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	128,0	>128,0
67	96	32,0	32,0	0,5	<0,25	0,75	1,50	64,0	>128,0	32,0	16,0	>128,0	>128,0
68	97	32,0	32,0	1,0	<0,25	1,00	3,00	32,0	32,0	32,0	16,0	>128,0	0,5
69	99	32,0	16,0	1,0	<0,25	1,50	2,00	32,0	64,0	32,0	32,0	128,0	>128,0
70	101	256,0	256,0	1,0	<0,25	2,00	2,00	16,0	>128,0	32,0	128,0	128,0	>128,0
71	102	32,0	32,0	1,0	0,5	1,50	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
72	103	64,0	16,0	2,0	1,0	1,50	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
73	104	64,0	16,0	1,0	1,0	2,00	4,00	8,0	16,0	0,5	16,0	>128,0	32,0

"continuação"

Anexo A – Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos

N	No LIM	CIM IM	CIM ME	CIM CO	CIM PB	Etest CO	Etest PB	CIM ATM	CIM CAZ	CIM CIP	CIM CPM	CIM P/T	CIM GEN
74	112	128,0	128,0	0,5	0,5	1,00	1,50	>128,0	>128,0	32,0	64,0	>128,0	32,0
75	117	64,0	32,0	1,0	1,0	2,00	3,00	128,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
76	119	64,0	8,0	0,5	0,5	1,00	1,50	8,0	2,0	8,0	8,0	4,0	2,0
77	121	32,0	8,0	1,0	1,0	3,00	3,00	>128,0	>128,0	16,0	32,0	>128,0	1,0
78	125	64,0	8,0	0,5	0,5	1,50	1,50	>128,0	128,0	8,0	128,0	>128,0	2,0
79	126	512,0	256,0	1,0	1,0	4,00	4,00	16,0	>128,0	32,0	128,0	128,0	>128,0
80	131	32,0	16,0	1,0	0,5	1,50	1,50	>128,0	>128,0	<0,25	64,0	>128,0	4,0
81	132	64,0	128,0	1,0	1,0	1,50	1,50	16,0	>128,0	32,0	128,0	>128,0	32,0
82	134	64,0	128,0	1,0	1,0	1,50	4,00	128,0	>128,0	32,0	64,0	>128,0	>128,0
83	141	64,0	2,0	<0,25	<0,25	1,00	1,50	4,0	0,5	8,0	<0,25	1,0	4,0
84	156	64,0	64,0	1,0	<0,25	2,00	4,00	32,0	4,0	16,0	16,0	16,0	2,0
85	157	512,0	512,0	0,5	<0,25	1,50	3,00	16,0	>128,0	32,0	128,0	128,0	>128,0
86	159	128,0	16,0	1,0	0,5	1,50	2,00	32,0	>128,0	16,0	128,0	>128,0	>128,0
87	160	64,0	64,0	0,5	2,0	1,50	3,00	32,0	32,0	16,0	16,0	128,0	1,0
88	161	64,0	32,0	0,5	0,5	1,50	2,00	64,0	32,0	16,0	16,0	>128,0	>128,0
89	162	32,0	64,0	<0,25	0,5	1,00	2,00	64,0	32,0	16,0	16,0	>128,0	>128,0
90	163	64,0	64,0	0,5	0,5	1,50	1,50	32,0	4,0	64,0	8,0	64,0	>128,0
91	164	64,0	64,0	<0,25	<0,25	0,50	1,00	>128,0	>128,0	16,0	32,0	>128,0	0,5
92	166	32,0	64,0	<0,25	<0,25	1,00	3,00	>128,0	2,0	64,0	16,0	>128,0	16,0

“continuação”

Anexo A – Perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos

N	No LIM	CIM IM	CIM ME	CIM CO	CIM PB	Etest CO	Etest PB	CIM ATM	CIM CAZ	CIM CIP	CIM CPM	CIM P/T	CIM GEN
93	167	128,0	128,0	2,0	<0,25	0,75	0,50	>128,0	>128,0	16,0	32,0	>128,0	32,0
94	170	32,0	4,0	<0,25	<0,25	3,00	1,50	>128,0	>128,0	16,0	64,0	>128,0	1,0
95	173	128,0	32,0	0,5	0,5	1,50	2,00	16,0	4,0	32,0	8,0	16,0	64,0
96	174	32,0	32,0	0,5	0,5	2,00	2,00	64,0	>128,0	32,0	32,0	>128,0	1,0
97	176	32,0	32,0	1,0	1,0	2,00	4,00	16,0	4,0	<0,25	8,0	16,0	0,5
98	177	32,0	16,0	0,5	8,0	2,00	4,00	16,0	4,0	<0,25	8,0	16,0	1,0
99	178	128,0	16,0	0,5	0,5	1,50	1,50	32,0	4,0	32,0	8,0	16,0	0,5
100	179	32,0	16,0	1,0	1,0	2,00	4,00	128,0	>128,0	32,0	16,0	>128,0	>128,0
101	181	32,0	32,0	1,0	0,5	1,50	2,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
102	182	16,0	16,0	1,0	1,0	1,50	4,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	2,0
103	184	32,0	16,0	1,0	1,0	1,50	3,00	128,0	32,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
104	185	16,0	16,0	1,0	1,0	2,00	3,00	64,0	64,0	32,0	32,0	>128,0	>128,0
105	189	128,0	128,0	1,0	0,5	1,50	3,00	16,0	>128,0	64,0	>128,0	>128,0	>128,0
106	190	32,0	16,0	2,0	0,5	1,50	3,00	8,0	32,0	16,0	16,0	>128,0	0,5
107	191	512,0	256,0	1,0	1,0	2,00	4,00	8,0	>128,0	32,0	128,0	128,0	>128,0
108	192	32,0	32,0	1,0	0,5	2,00	4,00	16,0	16,0	32,0	16,0	128,0	2,0
109	193	512,0	256,0	1,0	0,5	1,50	4,00	8,0	>128,0	32,0	128,0	>128,0	>128,0

N: Número de cepas; N°LIM: Número do isolado; IM: Imipenem; ME: Meropenem; CO: Colistina; PB: Polimixina B; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacina; CPM: Cefepima; P/T: Piperacilina-Tazobactam; GEN: Gentamicina

“conclusão”

Anexo B - Comparação dos resultados discordantes entre os métodos de disco-difusão, Etest® e microdiluição em caldo dos 109 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Isolado	Colistina			Polimixina B		
	MD (µg/mL)	Etest® (µg/mL)	DD (mm)	MD (µg/mL)	Etest® (µg/mL)	DD (mm)
23	1,0 (S)	1,0 (S)	15 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	11 (S)
27	1,0 (S)	1,0 (S)	16 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	11 (S)
30	2,0 (S)	0,75 (S)	16 (S)	2,0 (S)	4,0 (R)	11 (S)
38	0,5 (S)	2,0 (S)	16 (S)	0,5 (S)	4,0 (R)	12 (S)
40	0,5 (S)	1,0 (S)	17 (S)	0,5 (S)	4,0 (R)	12 (S)
59	<0,25 (S)	3,0 (R)	14 (S)	<0,25 (S)	4,0 (R)	18 (S)
62	0,5 (S)	2,0 (S)	15 (S)	<0,25 (S)	4,0 (R)	19 (S)
63	0,5 (S)	4,0 (R)	14 (S)	<0,25 (S)	3,0 (R)	18 (S)
73	1,0 (S)	2,0 (S)	13 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	17 (S)
79	1,0 (S)	4,0 (R)	13 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	18 (S)
82	1,0 (S)	1,5 (S)	13 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	16 (S)
84	1,0 (S)	2,0 (S)	14 (S)	<0,25 (S)	4,0 (R)	18 (S)
97	1,0 (S)	2,0 (S)	15 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	20 (S)
98	0,5 (S)	2,0 (S)	15 (S)	8,0 (R)	4,0 (R)	19 (S)
100	1,0 (S)	2,0 (S)	15 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	20 (S)
102	1,0 (S)	1,5 (S)	16 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	21 (S)
107	1,0 (S)	2,0 (S)	16 (S)	1,0 (S)	4,0 (R)	20 (S)
108	1,0 (S)	2,0 (S)	16 (S)	0,5 (S)	4,0 (R)	20 (S)
109	1,0 (S)	1,5 (S)	16 (S)	0,5 (S)	4,0 (R)	21 (S)

MD = Microdiluição em caldo, DD = Disco-Difusão

Anexo C - Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice do perfil de bandas obtido a partir da técnica de PFGE.

Isolado	Unidade	Data
164	Clínica	03/10/03
132	Clínica	09/07/03
137	Clínica	15/10/03
91	Clínica	08/03/03
160	Clínica	29/09/03
82	Clínica	03/01/03
131	Clínica	29/06/03
88	Clínica	26/02/03
104	Clínica	10/04/03
174	UTI	29/10/03
176	UTI	31/10/03
177	Clínica	02/11/03
179	UTI	11/11/03
117	UTI	27/05/03
193	Clínica	26/12/03
102	UTI	07/04/03
103	UTI	08/04/03
126	UTI	23/06/03
156	UTI	12/09/03
166	UTI	06/10/03
141	Clínica	01/08/03
101	Clínica	04/04/03
162	UTI	30/09/03
99	UTI	31/03/03
92	UTI	14/03/03
157	UTI	12/09/03
83	UTI	24/01/03
89	Clínica	05/03/03
97	Clínica	23/03/03
170	Clínica	16/10/03
159	Clínica	28/09/03
181	Clínica	24/11/03
190	Clínica	10/12/03
93	Clínica	13/03/03
132	Clínica	04/07/03
121	Clínica	08/06/03
112	UTI	10/05/03
189	Clínica	09/12/03
192	UTI	21/12/03
191	Clínica	12/12/03
119	Clínica	31/05/03
125	Cirurgia	18/06/03

Referências

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

Bannes RD Jr, Rifkind D. Intravenous administration of sodium colistimethate. *JAMA*, 1964; 190:278-81.

Barnett M, Bushhby SR, Wilkinson S. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol*. 1964; 23:552-74.

Beringer P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2001; 7(6):434-40.

Beveridge EG, Martin AJ. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol*. 1967; 29:125-35.

Bratu S, Quale J, Cebular S, Heddurshetti R, Landman D. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(3):196-201.

Brown MR, Watkins WM. Low magnesium and phospholipid content of cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to polymyxin. *Nature*. 1970; 227(265):1360-1.

Brown MRW, Fenton EM, Watkins WN. Tetracycline-sensitive/polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* . *Lancet*. 1972; 2:86.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(6):1211-33.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(6):1379-82.

Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R. A reassessment of the *in-vitro* activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemoter*. 1997; 39: 255-60.

Chang SC, Fang CT, Chen YC, Hsueh PR, Luh KT, Hsieh WC. *In vitro* activity of meropenem against common pathogenic bacteria isolated in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 32: 273-279.

Clark NG, Patterson J, Lynch JP. Antimicrobial resistance among Gram-negative organisms in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care*. 2003; 9(5):413-23.

Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S15*. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2005.

Conrad RS, Galanos C. Fatty acid alterations and polymyxin B binding by lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* adapted to polymyxin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:1724-8.

Cox CE, Harrison LH. Intravenous sodium colistimethate therapy of urinary-tract infections: pharmacological and bacteriological studies. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1970; 296-302.

Craig WA, Kunin CM. Dynamics of binding and release of the polymyxin antibiotics by tissues. *J Pharmacol Exp Ther*. 1973; 184:757-65.

Dupont P, Hocquet D, Jeannot K, Chavanet P, Plesiat P. Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(4):518-22.

Edgar WM, Dickinson KM. A trial of colistin methane sulphonate in urinary infection with *Pseudomonas pyocyanea*. *Lancet*. 1962;1:739-40.

Eickhoff T, Finland M. Polymyxin B and colistin: *in vitro* activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Med Sci*. 1965; 249: 172-4.

Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science*. 1971; 173: 836-8.

Flaherty JP, Weinstein RA. Nosocomial Infections caused by antibiotic-resistant organisms in the intensive-care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996; 17:236-248.

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

Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(1): 183-90.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Highes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988;16:128-40.

Girão ES, Levin ASS, Medeiros EAS, et al. Nosocomial bloodstream infections in Intensive Care Unit: A five-year study. Abstract presentation. *Meeting of Society of HealthCare Epidemiology of America*. 2004.

Goodwin NJ. Colistin and sodium colistimethate. *Med Clin North Am*. 1970; 54: 1267-76.

Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J Bacteriol*. 1997; 179(22):7040-5.

Grundmann H, Schneider C, Hartung D, et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(3): 528-34.

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

Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 1317-23.

Harris A, Smith D, Johnson JA, et al. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(3):340-5.

Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, et al. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 1999; 28(5): 1128-33.

Hoeprich PD. *The Polymyxins*. In: Mandell GL, Douglas Jr RG, Bennett JE, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's: Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 382-5.

Hoppe B. Control of infections caused by drug-resistant organism in critical care. *Am J Crit Care* . 1997; 6(2): 141-144.

Jensen T, Pedersen SS, Garne S, et al. Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Antimicrob Chemother*. 1987; 19: 831-8.

Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary *in vitro* spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (1997-2001). *Int JAntimicrob Agents*. 2003; 22: 551-556.

Kaufmann ME. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. 1st ed. New Jersey: Ed. Humana Press. 1998; 15: 33-50.

Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: ASM press; 2003; p.719-28.

Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, et al. Adverse effects of sodium cholestimethate. *Ann Int Med*. 1970; 72: 857-68.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. *Nonfermentative Gram-Negative Bacilli*. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC, editors. *Diagnostic Microbiology*. 5th ed. New York: Lippincot. Philadelphia; 1997. Cap 5.

Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):954-7.

Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996; 17(6): 366-8.

Levin SA, Barone AA, Penco J, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 1999; 28: 1008-11.

Li J, Milne RW, Nation RL, et al. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(5):837-40.

Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. *In vitro* pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(3):781-5.

Liesegang A, Tschape H. Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol*. 2002; 291(8): 645-8.

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

Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis*. 1991; 78:7-19.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Inf Dis*. 2002; 34: 634-40.

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

Makela PH, Sarvas M, Calcagno S, Lounatmaa K. Isolation and genetic characterization of polymyxin resistant mutants of *Salmonella*. *FEMS Microbiol Lett*. 1978; 3:323-6.

Maoilin F, Brian LE. Modification of penicilin-binding proteins as mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986; 33:1-5.

Markou N, Apostolakos H, Koumoudiou C, et al. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care*. 2003; 7(5): 78-83.

Martins ST, Moreira M, Furtado GH, et al. Application of control measures for infections caused by multi-resistant Gram-negative bacteria in intensive care unit patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3): 331-4.

McMillan FH, Pattison IC. Sodium colistimethate. I. Dissociations of aminomethanesulfonates in aqueous solution. *J Pharm Science*. 1969; 58(6): 730-7.

Moore RA, Chan L, Hancock RE. Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984; 26(4):539-45.

Munro BH. Statistical Methods for health care research. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott. 1997.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard M7–A5*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S14*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2004.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard M2-A2 S2*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 1981.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard—7th ed.; M2-A7*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard ASM2-2*. 2nd edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 1979.

National Nosocomial Infection Surveillance NNIS System Report. *Am J Infect Control*. 2003; 31:481-90.

Nicodemo AC, Araujo MR, Ruiz AS, Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(4): 604-8.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994; 264:382-8.

Nord NM, Hoeprich PD. Polymyxin B and Colistin. *N Engl J Med*. 1964; 270:1030-5.

Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6):1661-9.

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho MMG, et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7): 2420-4.

Pfaller MA, Acar J, Jones RN, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance proGram. *Clin Infect Dis.* 2001; 32 Suppl 2: S156-67.

Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. *Molecular Biology – PFGE Analysis of Chromosomal Restriction Fragments.* In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* 1st ed.: ASM Press; 1992. p.10.5.c.1-p.10.5.c.11.

Pfaller MA, Jones RN, Bieddenbach DJ, MYSTIC ProGram Study Group (USA). Antimicrobial resistance trends in medical centers using carbapenems: report of 1999 and 2000 results from the MYSTIC proGram (USA). *Diagn. Microbiol Infect. Dis.* 2001; 41: 177-182.

Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2):312-8.

Pitout JD, Sanders CC, Sanders WE. Antimicrobial Resistance with focus on beta-lactam resistance in Gram-negative bacilli. *Am J Med.* 1997; 103(1): 51-9.

Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 4thed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1995. p.1980-2003.

Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):479-87.

Pruitt BA Jr. Infections of burns and other wounds caused by *Pseudomonas aeruginosa*. In: Sabath LD, editors. *Pseudomonas aeruginosa*. The Organism, Diseases It Causes, and Their Treatment. Bern: Hans Huber Publishers. 1980; p.55 - 70.

Rhomberg PR, Jones RN, Sader SS, MYSTIC ProGramme (US) Study Group. Results from the meropenem yearly susceptibility test information collection (MYSTIC) proGramme: report of the 2001 data from 15 United States medical centers. *Int JAntimicrob Agents.* 2004; 23: 52-59.

Ridley AM. *Genomic Fingerprinting by Application of REP-PCR*. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. New Jersey: Ed. Humana Press; 1998. Cap.15. p.103-15.

Romling U, Fiedler B, Bosshammer J, et al. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1994; 170(6):1616-21.

Romling U, Tummeler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):464-5.

Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11 Suppl 4:17-32.

Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med*. 1995; 15(2):407-31.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, et al. Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin America Medical Centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 32:289-301.

Sader HS, Pignatari AC, Leme IL, et al. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993; 17(1):13-8.

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

Sader HS, Sampaio JLM, Zoccoli C, Reis AO, Jones RN. Summary of the SENTRY antimicrobial surveillance program results in three Brazilian medical centers for 1997. *Braz J Infect Dis*. 1999; 3:63-79.

Sahm DF, Critchley IA, Kelly LJ, et al. Evaluation of current activities of fluoroquinolones against Gram-negative bacilli using centralized in vitro testing and electronic surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(1):267-74.

Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 1992;15:824-39.

Satake S, Yoneyama H, Nakae T. Role of OmpD2 and chromosomal beta-lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1991;28:199-207.

Shand GH, Anwar H, Brown MR. Outer membrane proteins of polymyxin resistant *Pseudomonas aeruginosa*: effect of magnesium depletion. *J Antimicrob Chemother.* 1988;22(6):811-21.

Silbert S, Boyken L, Hollis RJ, Pfaller MA. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47(4):619-21.

Southern EM, Elder JK. *Theories of gel electrophoresis of high molecular weight DNA*. In: Rickwood D, Hames BD, editors. *Pulsed Field Gel Electrophoresis – A Practical Approach*. 1st ed. New York: IRL Press; 1995. Cap.1. p.1-18.

Steward CD, Stocker SA, Swenson JM, et al. Comparison of agar dilution, disk diffusion, MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):544-7.

Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Ann Ver Biochem.* 1977;46:723-63.

Taylor G, Allison H. "Colomycin": laboratory and clinical investigations. *Brit Med J.* 1962;2:161-3.

Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 2233-9.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18(6): 426-39.

Trabulsi LR, Toledo MRF. *Resistência a Drogas Bacterianas*. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Compertz OF, Candeias JAN, editores. 3^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu; 2002. Cap.11. p.105-9.

Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyses facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34: 52-57.

Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis.* 1997; 25(5):1094-8.

Turnidge JL, Milne R, Nation RL, Coulthard K. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (3): 781-5.

Vaara M, Vaara T, Jensen M, et al. Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett.* 1981;129:145-9.

Vurna-Rapp U, Kayser FH, Hadorn K, Wiederkehr F. Mechanism of imipenem resistance acquired by three *Pseudomonas aeruginosa* strains during imipenem therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9: 580-587.

Young ML, Bains M, Bell A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(11):2566-8