

HELENA GABRIELA TURANO

**ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Pseudomonas
aeruginosa* MULTIRRESISTENTES ENDÊMICAS NO
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Ebert Lincopan Huenuman

Versão corrigida. Versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

RESUMO

Turano HG. Alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes endêmicas no Brasil. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes de infecção hospitalar que tem adquirido um caráter endêmico decorrente a sua resistência intrínseca e/ou adquirida aos antibacterianos comercialmente disponíveis. O objetivo do estudo foi avaliar, “in vitro”, opções terapêuticas baseadas na atividade sinérgica. Dez cepas de *P. aeruginosa* clonalmente não relacionadas, previamente caracterizadas como produtoras de metalo-beta-lactamase (MβL) do tipo SPM-1, VIM-1 e GIM-1, foram avaliadas. O efeito sinérgico foi investigado por “Checkerboard” e “Time-Kill”. As combinações [Piperacilina/Tazobactam x Aztreonam] e [Tigeciclina x nanofragmentos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA)] mostraram atividade sinérgica para 90 e 100% das cepas, respectivamente. Os resultados respaldam o uso terapêutico combinado de [Piperacilina/Tazobactam x Aztreonam], contra infecções produzidas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes produtoras de MβLs, além disso, [DDA/Tigeciclina] pode constituir a base para consolidar uma nova forma farmacêutica de uso clínico.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Multirresistência. Infecção hospitalar. Metalo-beta-lactamase. SPM-1. Sinergismo. DDA.

ABSTRACT

Turano HG. Alternative therapies for the treatment of infections produced by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains endemic in Brazil. [dissertation (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of nosocomial infections, which it has acquired an endemic status due to their intrinsic or acquired resistance to antibacterial agents commercially available. The aim of the study was to evaluate "in vitro" therapeutic options based on the synergistic activity. Ten clonally unrelated strains of *P. aeruginosa*, previously characterized as metallo-beta-lactamase (M β L) producers (i.e., SPM-1, VIM-1 and GIM-1) were evaluated. The synergistic effect was investigated by checkerboard" and Time-Kill assays. The combinations [Piperacillin/Tazobactam x Aztreonam] and [Tigecycline x bilayer fragments of dioctadecyldimethylammonium bromide (DDA)] showed synergistic activity for 90 and 100% of the strains, respectively. The results support the use of combined therapy by using [Piperacillin/Tazobactam x Aztreonam] against infections produced by strains of *P. aeruginosa* producing M β Ls, moreover, [DDA / Tigecycline] may be the basis for build a new pharmaceutical form for clinical use.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Multiresistance. Nosocomial infection. Metallo-beta-lactamase. SPM-1. Synergism. DDA.

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos antimicrobianos revolucionou a medicina, salvando inúmeras vidas, passando a ser altamente utilizados nos tratamentos terapêuticos. Diante desse elevado uso, várias melhorias nas produções desses medicamentos proporcionaram redução nos custos, tornando-os mais acessíveis e incentivando o uso sem prescrição médica (Davies, Davies, 2010).

Milhões de toneladas de antimicrobianos são produzidos para diversas finalidades, desde tratamentos terapêuticos curativos na medicina humana e animal; no tratamento profilático, como aditivos nas rações de animais; na agricultura, entre outros usos. Adicionalmente, diversas atividades antropogênicas, acabam por contaminar o meio-ambiente (córregos, rios, mares, oceanos e terra). Estes, por sua vez, têm sido constantemente alterados por influências humanas, com os descartes de resíduos de processos industriais, resíduos tóxicos, desinfetantes e agentes antimicrobianos, criando grandes reservas ambientais de resistência.

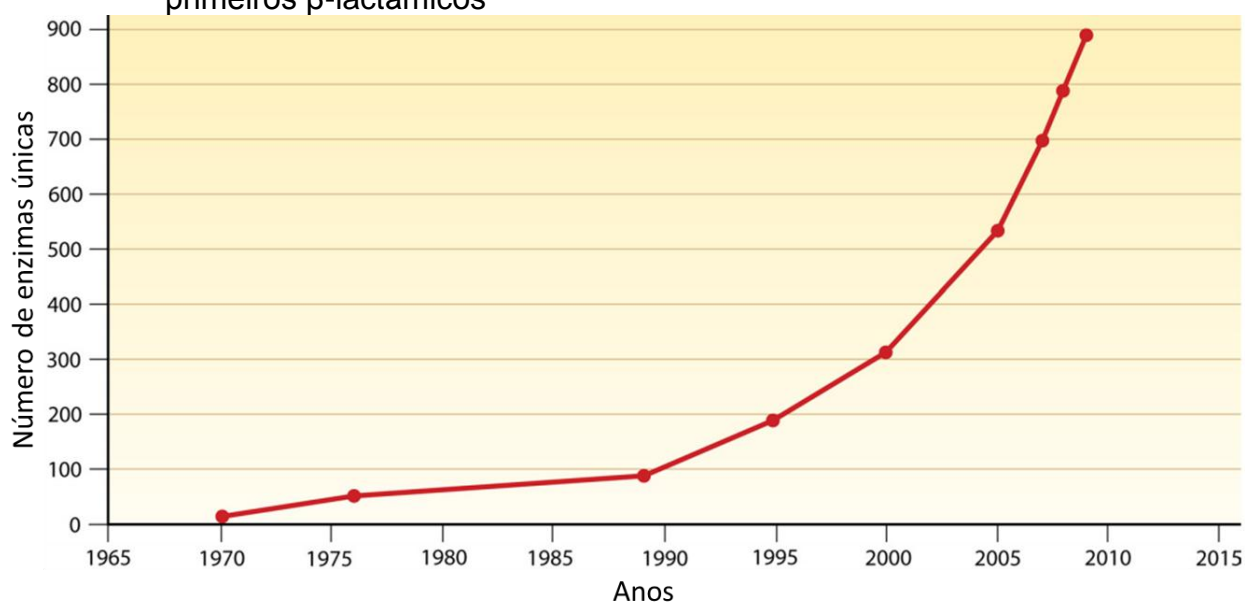
Outro ambiente extremamente rico em diversidade microbiológica é o esgoto, que também favorece a seleção de organismos resistentes (Davies, Davies, 2010; Fontes et al., 2011; Moura et al., 2010). Na Figura 1 podem ser observadas algumas das principais vias de transmissão de agentes patogênicos.

Para sobreviver a essas condições, várias adaptações moleculares foram desenvolvidas pelas bactérias, como adquirindo DNA exógeno, através de plasmídeos, transposons ou por captação direta e incorporação por recombinação homóloga, obtendo genes que codificam novas vias metabólicas, através da transferência gênica horizontal, contribuindo para a evolução dessas espécies e sendo um importante alvo de investigação devido a sua significância médica, pois mutantes espontâneos de resistência podem espalhar em uma população bacteriana os genes de resistência, conduzindo a uma potencial pandemia (Frost et al., 2005; Moura et al., 2010; Norman et al., 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 1998) temos como definição de IH qualquer infecção adquirida (48 – 72 h) após a entrada do paciente, que se revele enquanto internado, ou até mesmo após a alta, se for relacionada com os procedimentos hospitalares ou internação.

Estudos têm mostrado que as principais espécies Gram-negativas relacionadas às infecções hospitalares são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter* spp (Gales et al., 2012; Girão et al., 2008; Kiffer et al., 2005; Lincopan et al., 2005; 2006; Pavez et al., 2009; Rossi, 2011; Sader et al., 2001; Theuretzbacher, 2012).

Figura 2 - Números de enzimas β -lactamases identificadas desde a introdução dos primeiros β -lactâmicos



Nota: Enzimas β -lactamases identificadas durante a era dos antibióticos.

Fonte: Adaptado de Davies e Davies (2010).

O tratamento de pacientes com infecções hospitalares graves utilizando antibióticos de amplo espectro de atividade, como os carbapenêmicos, deve-se a sua boa permeabilidade através da membrana externa bacteriana e estabilidade frente a muitas β -lactamases (Franco et al., 2010; Fritsche et al., 2005; Gales et al., 2003). No entanto, essa escolha acaba exercendo maior pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar, ocasionando a seleção natural de bactérias resistentes ao imipenem e disseminação dos clones (Davies, Davies, 2010; Rodloff et al., 2006).

Um estudo de Rahal et al. (1998) avaliou a restrição de cefalosporinas para infecções por *Klebsiella* produtoras de ESBL. O estudo indicou que a restrição levou

a uma redução na frequência de isolados produtores de ESBL, porém também originou um aumento de 140% no uso de carbapenêmicos, como o imipenem, que por sua vez ocasionou a um aumento de 69% na frequência de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem e na emergência de espécies de *Acinetobacter* resistentes. Essas escolhas, portanto, apontam para a necessidade do controle de infecção dos hospitais (Rodloff et al., 2006).

De acordo com Sader e Jones (2005) é de extrema importância buscar alternativas para reduzir o desenvolvimento a resistência e usar de maneira eficaz os antimicrobianos já existentes.

Devido à resistência aos carbapenêmicos e a dificuldade no desenvolvimento de novas drogas (Tillotson, 2008), muitos autores têm previsto um retorno à era pré-antibiótica, postulando a volta de antibióticos abdicados atualmente (Levin, Oliveira, 2008; Paterson, Lipman, 2007; Schurek et al., 2009; Theuretzbacher, 2012; Timurkaynak et al., 2006), porém, uma alternativa mais sustentável é o estudo de combinações de antibióticos que alcancem efeitos sinérgicos (Choi et al., 2004; Tripodi et al., 2007; Zhanel et al., 2006).

Segundo Lyczak et al. (2002) a monoterapia pode ser utilizada para cepas suscetíveis de *P. aeruginosa*, porém o estudo de combinações permite a identificação de combinações de antibióticos sinérgicos e, essa combinação é mais efetiva contra cepas que podem desenvolver a resistência, sendo, portanto mais indicado.

De acordo com Yim et al. (2011) a combinação de antimicrobianos com imipenem pode proporcionar uma opção de tratamento para infecções complicadas ocasionadas por Enterobacteriaceae produtoras de ESBL ou AmpC e que, a combinação de antimicrobianos pode reduzir o surgimento de resistência e elevar o espectro de atividade.

Para os casos de pneumonia nosocomial, o tratamento através de combinações de antimicrobianos pode ser uma opção, se for ocasionada por *P. aeruginosa*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Acinetobacter* (Bouza, Muñoz, 2000).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um organismo Gram-negativo aeróbio e ubíquo, que dificilmente causa doenças em pessoas saudáveis (Hancock, Speert, 2000),

porém é uma das principais espécies bacterianas que ocasionam infecção em pacientes hospitalizados (Goldberg, 2010).

Na América Latina *Pseudomonas* spp. é responsável por 7,5% das infecções de corrente sanguínea, por 31,2% dos casos de pneumonia e, por 13,8% das infecções da pele e dos tecidos moles (Gales et al., 2012).

Sua importância se deve pela expressão de múltiplos mecanismos de resistência, dificultando a ação de antibacterianos, ocasionando elevados índices de morbidade e mortalidade (Gales et al., 2004; Lambert et al., 2011; Pellegrino et al., 2002; Poole, 2011; Sader et al., 2001).

Dentre os múltiplos mecanismos de resistência ressaltam-se: enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, super expressão de bombas de efluxo, perda de porina, alterações no sítio alvo (Kanj, Kanafani, 2011; Muller et al., 2011; Poole, 2011; Strateva, Yordanov, 2009; Zavascki et al., 2010).

Esse microrganismo pode apresentar resistência natural ou adquirida a um grande número de antibióticos utilizados na prática clínica, como cefalosporinas de primeira e segunda geração, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos (Strateva, Yordanov, 2009; Yoneda et al., 2005). De acordo com Bouza e Muñoz (2000) mesmo as drogas com boa atividade contra *P. aeruginosa* não são sempre 100% eficientes contra ela.

P. aeruginosa pode co-produzir mecanismos de resistência para outra classe de antibióticos, como por exemplo, a proteína RmtD, uma metilase 16S RNAr (Doi et al., 2007) que confere um nível elevado de resistência a aminoglicosídeos utilizados clinicamente, como Amicacina, Tobramicina e Gentamicina. As metilases 16S RNAr favorecem a disseminação entre as espécies, uma vez que são associadas com elementos genéticos móveis, como os transposons (Doi et al., 2007; Yamane et al., 2007).

Outro mecanismo descreve a super expressão de bombas de efluxo, as quais têm como função exportar metabólitos secundários e substâncias tóxicas (incluindo os antibióticos), além de excretar moléculas sinalizadoras para a comunicação celular (Pearson et al., 1999; Poole, 2011; Strateva, Yordanov, 2009). A habilidade do efluxo favorece a sobrevivência da bactéria na presença de desinfetantes e de antibióticos (Poole, 2005). Além disso, *P. aeruginosa* pode ser intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos devido à expressão constitutiva de genes

codificadores de bombas de efluxo para os mesmos (Neves et al., 2011; ; Poole, 2011; Strateva, Yordanov, 2009).

P. aeruginosa é produtora de biofilme, este é uma associação de bactérias em uma matriz polímera de polissacarídeos, DNA extracelular e proteínas. Seu biofilme permite o estabelecimento de comunicação entre as bactérias para a coordenação de atividades metabólicas, produção de fatores de virulência em recíproco benefício, protege contra o sistema de defesa do hospedeiro, dificulta a difusão de antibióticos e desinfetantes, além de permitir a troca de material genético (Lincopan, Trabulsi, 2008).

Segundo Hauser e Ozer (2011) as principais doenças clínicas relacionadas à *Pseudomonas aeruginosa* são: Infecções oculares, otológicas, respiratórias (acometendo também pacientes portadores de fibrose cística), do trato urinário, sanguíneas e de peles e tecidos moles (incluindo as feridas de pacientes com queimaduras).

1.2.1 Pseudomonas aeruginosa e infecções em pacientes com queimaduras

A queimadura é uma grave lesão, que acomete indivíduos, independente de sexo e de faixa etária, estando entre as principais causas de morbidade, devido ao desenvolvimento e sequelas, como a incapacidade funcional e deformidades estéticas; e a mortalidade, ocasionada pelas infecções, podendo progredir para septicemia, sendo de elevado grau de complexidade e de dificuldade de tratamento. As mais comuns causas de queimaduras são por escaldaduras, exposição às chamas, substâncias químicas, elétricas e radioativas, devido a atividades profissionais e/ou acidentes domésticos (De-Souza et al., 1998; Lacerda et al., 2010; Montes et al., 2011; Souza et al., 2009).

O ambiente hospitalar proporciona um grande número de fatores de riscos para os pacientes com queimaduras, possibilitando a infecção por microrganismos, que podem vir a se espalharem pela via linfática ou sanguínea, uma vez que a barreira mecânica que a pele oferece foi destruída. Ao mesmo tempo a lesão dos vasos sanguíneos na área afetada torna mais difícil a penetração de antibióticos e a chegada de células do sistema imune. Em 75% dos casos de óbitos de pacientes queimados, as infecções foram a grande responsável (Hammond et al., 2011; Macedo et al., 2005; Pruitt, McManus, 1992; Rempel et al., 2011).

Dependendo da localização das queimaduras podem acontecer variados tipos de complicações, como oftalmológicas, neurológicas e geniturinárias, além disso, a inalação dos produtos da combustão, como gases tóxicos, causam inflamação com edema da mucosa traqueobrônquica, levando a lesões graves, piorando o prognóstico, aumentando assim a mortalidade (Vale, 2005). A incidência de complicações no tratamento das queimaduras geralmente é proporcional a extensão da área afetada (Macedo et al., 2005). O comprometimento da pele, a barreira física de proteção, interfere entre a microbiota normal e o tecido sadio, deixando o paciente suscetível a invasão de microrganismos patogênicos (Rempel et al., 2011).

Sendo assim, as queimaduras devem ser protegidas por agentes antimicrobianos de uso tópico para evitar a proliferação e migração dos microrganismos do tecido necrosado para as regiões sadias (Hammond et al., 2011; Pruitt, McManus, 1992).

Conforme Vale (2005), as queimaduras podem ser classificadas de acordo com a gravidade da lesão, como de primeiro grau, segundo grau ou terceiro grau. As características de cada grau podem ser observadas no Quadro 1. De acordo com Pruitt e McManus (1992), o patologista pode interpretar o estado da infecção por microrganismos através de um esquema, apresentado no Quadro 2. O aumento da mortalidade pode ser observado conforme o aumento do estágio.

Quadro 1 – Classificação das queimaduras segundo a profundidade

Primeiro grau	Segundo grau	Terceiro grau
<ul style="list-style-type: none"> • Compromete apenas a epiderme; • Apresenta eritema, calor e dor; • Não há formação de bolhas; • Evolui com descamação em poucos dias; • Regride sem deixar cicatrizes; • Repercussão sistêmica é desprezível; • Não é considerada na avaliação da área atingida. 	<ul style="list-style-type: none"> • Compromete totalmente a epiderme e parcialmente a derme; • Apresenta dor, eritema, edema, bolhas, erosão ou ulceração; • Há regeneração espontânea; • Ocorre reepitelização a partir dos anexos cutâneos (folículos pilosos e glândulas); • Cicatrização mais lenta (2-4 semanas); • Pode deixar sequelas: discromia (superficial), cicatriz (profunda). 	<ul style="list-style-type: none"> • Destroi todas as camadas da pele, atingindo até o subcutâneo, podendo atingir tendões, ligamentos, músculos e ossos; • Causa lesão branca ou marrom, seca, dura, inelástica; • É indolor; • Não há regeneração espontânea, necessitando de enxertia; • Eventualmente pode cicatrizar, porém com retração das bordas.

Fonte: Adaptado de Vale (2005).

Quadro 2 – Critérios para os estágios microbianos nas queimaduras

Estágio I - Colonização		Estágio II - Invasão	
A - Superficial	População microbiana esparsas na superfície da queimadura;	A - Micro Invasão	Focos microscópicos de microrganismos em tecido viável imediatamente subjacente a escara
B - Penetração	Microrganismos presentes na variável espessura da escara	B - Generalizada	Penetração profunda generalizada de microrganismos nos tecidos subcutâneos viáveis
C - Proliferação	Densa população de microrganismos na interface inviável/viável do tecido	C - Microvascular	Envolvimento de vasos linfáticos e da microvasculatura

Fonte: Adaptado de Pruitt e McManus (1992).

Devido à complexidade de tratamento das lesões ocasionadas pelas queimaduras, um elevado gasto do Sistema Único de Saúde (SUS) é necessário por paciente queimado internado. De acordo com Mello-Jorge e Koizumi (2004), o gasto médio diário por paciente queimado internado é de R\$ 650,00 (casos não fatais), e de R\$ 1.620,00 diários para os casos que vão a óbito.

De acordo com os dados do SUS (2009), no Brasil, as queimaduras representam cerca de 1,6% do total de mortes decorrentes de causas externas, já em relação aos casos não fatais, representam cerca de 9% (80.607 pessoas) das internações no sistema público de saúde brasileiro, do grupo das causas externas.

Os patógenos mais encontrados em pacientes hospitalizados com queimaduras são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. e *Candida* spp. (Branski et al., 2009; Rempel et al., 2011). As infecções por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes queimados vai de pneumonias até bacteremias, tendo como fontes de origem a água, superfícies das grades das camas, o colchão do paciente, além de poder ocorrer através do contato pessoal, entre outras fontes (Rempel et al., 2011).

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* e fibrose cística

A fibrose cística (ou mucoviscidose) é uma doença genética autossômica recessiva, que apresenta maior incidência em populações caucasianas de descendência europeia. Ela atinge vários sistemas do organismo e caracteriza-se por uma ampla disfunção das glândulas exócrinas. O paciente portador dessa doença possui secreções mucosas espessas e viscosas que, acabam por bloquear os canais das glândulas exócrinas. Essa obstrução contribui para o aparecimento de

altos níveis de eletrólitos no suor, insuficiência pancreática (ocasionando um quadro secundário de desnutrição), diabetes mellitus, má absorção intestinal de gordura, comprometimento dos sistemas reprodutores e, doenças pulmonares obstrutivas crônicas (Fiates et al., 2001; Firmida, Lopes, 2011; Rosa et al., 2008).

Cerca de 70.000 pessoas no mundo são afetados pela fibrose cística (Cystic Fibrosis Foundation, 2012). De acordo com WHO (2004), a incidência de fibrose cística no Brasil é de 1 caso a cada 6.902 nascimentos. Um estudo de Raskin et al. (2008) indica que há um decréscimo na incidência de fibrocísticos da região Sul para a Sudeste do Brasil, uma vez que há mais pessoas com ascendência europeia no Sul.

As alterações do transporte iônico ocasionam um aumento das secreções mucosas, a hiperviscosidade dessas secreções e a consequente redução da atividade mucociliar nos pulmões, levando a uma diminuição da depuração das vias aéreas. Na fibrose cística as complicações respiratórias são as causas mais comuns de morbidade e mortalidade (Nichols et al., 2008).

Os microrganismos que mais acometem os pacientes com fibrose cística são: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, Complexo *Burkholderia Cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (Hauser et al., 2011; Lyczak et al., 2002).

Pseudomonas aeruginosa infecta tanto a zona respiratória quanto a zona condutora, além disso, ela pode acarretar em infecção crônica em pacientes com fibrose cística devido às mudanças adaptativas em seu modo de crescimento de não mucoide para mucoide (ocasionado por mutações), tornando-a mais resistente a fagocitose, reduzindo a função pulmonar, podendo levar a insuficiência respiratória e aumentando a mortalidade. Esse patógeno ocasiona lesões no epitélio, bloqueando progressivamente as vias aéreas (Doring et al., 2000; Lyczak et al., 2002; Perez et al., 2012).

O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* é dificultado inicialmente por sua resistência intrínseca a muitos antibióticos e, tem-se especulado que parte de sua resistência seria devido à estrutura da sua parede celular, juntamente com a formação de biofilme, que oferece proteção contra o sistema imune e, a falta de eliminação da secreção espessa por pacientes com fibrose cística (Doring et al., 2000; Lyczak et al., 2002; Perez et al., 2012).

Devido a dificuldade de penetração e, algumas vezes do mau rendimento das drogas, seja por via oral, ou sistêmica, para o tratamento de doenças brônquicas e

pulmonares, é necessário um novo método de administração, como a instituição de tratamento por via inalatória, o que pode ocasionar um maior efeito terapêutico e possivelmente diminuir os efeitos colaterais (Mariné, 2009).

A inalação, através de nebulizadores ou através de pó seco (“*dry powder*”), oferece diversos benefícios quando comparada aos métodos comuns de administração dos antimicrobianos, pois pode produzir altas concentrações dos antibióticos no sítio da infecção, sem o risco de toxicidade sistêmica, além disso, a inalação é menos incômoda aos pacientes, abrindo possibilidades para a utilização de drogas abandonadas por causarem elevada toxicidade, como a Polimixina B, e trazendo novas formas de uso de antibióticos, como Aztreonam, Levofloxacina e Fosfomicina (Labiris et al., 1999; Van Westreenen, Tiddens, 2010).

1.3 Metallo-beta-lactamases (MβL)

As MβLs pertencem à classe molecular B, de acordo com a classificação proposta por Ambler (1980). Esta classe de β-lactamases é caracterizada pela capacidade de hidrolisar carbapenênicos e por sua resistência aos inibidores comercialmente disponíveis, como o ácido clavulânico, mas são inibidas por agentes ou compostos quelantes de íons de metal (Queenan, Bush, 2007).

A primeira metallo-β-lactamase codificada cromossomicamente foi descrita em 1966 (Sabath, Abraham, 1966), em uma amostra de *Bacillus cereus*. A segunda MβL foi descrita em 1982 em *Stenotrophomonas maltophilia* (Saino et al., 1982).

Osano et al. (1994) relatou o primeiro caso de MβL adquirida, descrevendo IMP-1 como uma nova subclasse. Essa enzima foi isolada no Japão, em uma cepa de *Serratia marcescens*, apresentando resistência ao imipenem.

No Brasil, os genes que codificam as MβL móveis já foram observados em vários patógenos clinicamente importantes, tais como os bacilos não fermentadores *P. aeruginosa* (Gales et al., 2003a; Lincopan et al., 2010) e *Acinetobacter* spp. (Gales et al., 2003b), e em várias espécies da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella pneumoniae* (Lincopan et al., 2005; 2006).

Pellegrino et al. (2002) relatou a primeira MβL adquirida no Brasil, entretanto o determinante da resistência não foi caracterizado. Em 2003 foi isolada uma cepa de *A. baumannii* produtora de IMP-1, em São Paulo (Gales et al., 2003b).

Genes que codificam a MBL foram encontrados inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene. Seis grandes importantes grupos de MBL foram identificados: IMP (imipenemase) (Watanabe et al., 1991), VIM (Verona imipenemase) (Lauretti et al., 1999), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (Toleman et al., 2002), GIM (German imipenemase) (Castanheira et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (Lee et al., 2005) e NDM (New Delhi metalo- β -lactamase) (Yong et al., 2009).

A primeira identificação do gene que codifica para a enzima SPM-1 ocorreu na cidade de São Paulo, Brasil (Toleman et al., 2002). Desde o seu primeiro relato, em clones de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1, ocorreu elevada mortalidade entre os pacientes hospitalizados (Furtado et al., 2011; Gales et al., 2003a; Queenan, Bush, 2007; Santos Filho et al., 2002; Zavascki et al., 2006). O gene desta enzima apresentou conteúdo GC na ordem de 47%, indicando que ele tem uma procedência não intrínseca a *P. aeruginosa* (Toleman et al., 2002).

Atualmente apenas a enzima SPM-1 é codificada por um gene localizado em plasmídeo de aproximadamente 180 kb (Walsh et al., 2005), as demais enzimas MBL ficam em integrons da classe 1 (Mendes et al., 2006; Toleman et al., 2002).

A enzima SPM-1 hidrolisa todos os antimicrobianos β -lactâmicos, preferencialmente cefalosporinas, sendo incapaz de hidrolisar Aztreonam (Murphy et al., 2003). Até o presente período, SPM-1 só foi encontrada em *P. aeruginosa* e sua disseminação epidêmica já foi evidenciada em vários estados brasileiros (Gales et al., 2003a; Poirel et al., 2004; Zavascki et al., 2005). Salabi et al. (2010) publicou o primeiro caso de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 na Europa, de um paciente suíço que recebeu o primeiro atendimento em um hospital em Recife.

1.4 Principais antimicrobianos utilizados no estudo

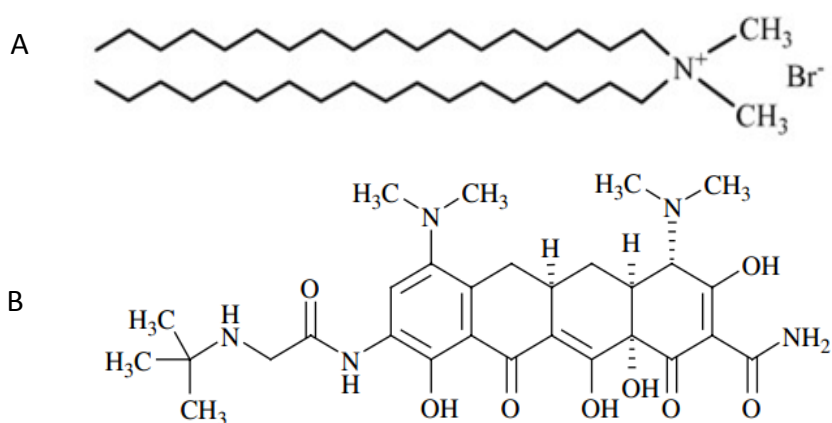
1.4.1 DDA - brometo de dioctadecildimetilamônio

O brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) é um lipídio catiônico, com duas longas cadeias hidrocarbonadas (C_{18}) altamente hidrofóbica e uma cabeça polar catiônica hidrofílica com um contra-íon monovalente (Br^-), Figura 3A. Suas cadeias hidrofóbicas lhe permitem formar

bicamadas em solução aquosa, o método de preparação determina as propriedades físicas e funcionais das vesículas ou dos fragmentos de bicamada formados. Mediante o uso da metodologia de sonicação com sonda (Tip) formam-se vesículas unilamelares pequenas ou fragmentos de bicamada assim como também vesículas interrompidas. Fragmentos de bicamada oferecem convenientemente uma grande área de nano superfícies hidrofóbicas adequadas para a solubilização de substâncias hidrofóbicas ou fármacos (Lincopan et al., 2004).

Vesículas de bicamadas de DDA têm sido usadas de diversas maneiras, seja como agentes de interface e imunoadjuvantes, como agentes biocidas contra bactérias e fungos. Estas características são atribuídas ao fato delas possuírem uma região altamente hidrofóbica que lhe permite interagir com diversos compostos (Lincopan et al., 2003).

Figura 3 - Estrutura química do DDA (A) e Tigeciclina (B).



Fonte: Adaptado de Lincopan e Carmona (2006); Livermore (2005).

1.4.2 Tigeciclina

A Tigeciclina é o primeiro antibiótico da nova classe das glicilciclinas (Figura 3B). As glicilciclinas tem estrutura semelhante às tetraciclinas, possuindo alterações estruturais. Apresenta atividade contra gram-positivos, gram-negativos, espécies anaeróbias, incluindo cepas multirresistentes (Rose, Rybak, 2006). Ela é alvo das bombas de efluxo cromossomicamente codificadas, como em *Proteaeae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sua função é de inibir a síntese proteica através da união à subunidade do ribossomo bacteriano 30S. A Tigeciclina é considerada um

antibiótico bacteriostático (Livermore, 2005), tem um grande potencial de utilidade, mas nem sempre é eficaz em monoterapia (Yim et al., 2011). As indicações permitidas pelo FDA são infecções de pele e tecidos moles complicadas e infecções intrabdominais complicadas (Rodvold et al., 2006).

A estrutura química da Tigeciclina é demonstrada na figura 3B. A Tigeciclina é um composto altamente solúvel em uma ampla faixa de pH devido sua estrutura química apresentar diversos grupos ionizáveis com diferentes valores de pKa. No interior da molécula, existem três grupamentos básicos e dois acídicos. Os valores de pKa de cada um desses grupamentos variam de 2.8 à 9.5. Portanto, a solubilidade da Tigeciclina é independente do pH devido sua estrutura química apresentar grupamentos químicos que se ionizam em uma ampla faixa de pH (FDA, 2005). Esta característica é de interesse uma vez que, dependendo da faixa de pH, a molécula pode estar protonada ou desprotonada favorecendo interações eletrostáticas com biomoléculas que podem ser carregadoras de drogas, favorecendo possíveis efeitos sinérgicos.

1.4.3 Piperacilina-Tazobactam

A Piperacilina é uma Penicilina semi-sintética da classe ureidopenicilina, com atividade bactericida pela inibição da formação do septo e síntese da parede celular, que possui amplo espectro de ação contra infecções ocasionadas por anaeróbios, Gram positivos e Gram negativos, incluindo isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (Lister, 2000). Segundo Noguchi et al. (1979), a Piperacilina tem alta afinidade pela PBP-3 tanto em *E. coli* quanto em *P. aeruginosa*.

A Piperacilina foi diminuindo sua utilidade conforme bactérias produtoras de β -lactamase foram surgindo. O Tazobactam, um poderoso inibidor de várias enzimas β -lactamases cromossomais ou mediadas por plasmídeos, é um triazolimetil penicilânico sulfônico. Ele foi associado à Piperacilina para aumentar sua atividade, passando a cobrir um número maior de bactérias produtoras de β -lactamase que, sem essa associação, seriam resistentes a Piperacilina (Drawz, Bonomo, 2010; Fass, Prior, 1989; Lister, 2000; Strayer et al., 1994).

Devido a sua ampla cobertura, Piperacilina/Tazobactam é altamente recomendado para infecções intra-abdominais, pneumonia hospitalar e infecções de pele e tecidos moles (Mah et al., 2012).

1.4.4 Aztreonam

Aztreonam é um antibiótico sintético bactericida, pertencente à classe dos monobactâmicos, que possui atividade contra uma grande variedade de bactérias Gram-negativas, incluindo membros da família Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa*, mas possui pouca atividade contra anaeróbios ou aeróbios Gram-positivos (Fleiss et al., 1985; Ng et al., 1985; Romero-Vivaz et al., 1985). Além do uso sistêmico, novas formulações têm sido aprovadas para o Aztreonam, como o Aztreonam lisina para inalação (Zeitler et al., 2012).

O mecanismo de ação desse antibiótico é devido a grande afinidade de ligação com a PBP-3, ocasionando o efeito bactericida em enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* (Georgopapadakou et al., 1982).

Adicionalmente, o Aztreonam é bastante resistente as principais β -lactamases (cromossomais e plasmidiais) estudadas e, reduz distúrbios gastrointestinais, uma vez que pouco interfere com a microbiota normal de Gram-positivos e anaeróbios (Sykes et al., 1982).

1.5 Justificativa

São múltiplos os mecanismos de resistência que podem ser expressos por *Pseudomonas aeruginosa*: super expressão de bombas de efluxo, perda de porina, enzimas modificadoras de drogas, alterações no sítio alvo e produção de biofilme. Dentre as enzimas modificadoras encontram-se: enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e diferentes beta-lactamases, entre elas, a Metallo-beta-lactamase. Esses mecanismos conferem uma resistência natural ou adquirida a um grande número de antibióticos utilizados na prática clínica para esse microrganismo, dificultando o tratamento de suas mais diversas infecções e reduzindo consideravelmente as opções terapêuticas. Considerando as poucas opções de tratamento nos casos de infecções por *P. aeruginosa* MR, esse trabalho estudou combinações de antimicrobianos que pudessem alcançar efeitos sinérgicos, para permitir possíveis alternativos esquemas terapêuticos.

6 CONCLUSÕES

1. A resistência a pelo menos três antibacterianos de classes diferentes foi confirmada em 9 de 10 cepas;
2. Todas as cepas foram sensíveis a Polimixina B e a Colistina;
3. O uso combinado de [Piperacilina/Tazobactam x Aztreonam] revelou atividade sinérgica contra as cepas clínicas MR de *P. aeruginosa* produtora de M β L SPM-1, GIM-1 e VIM-1, com potencial clínico e terapêutico, considerando aspectos farmacocinéticos;
4. O uso de DDA potencializa a atividade de Tigeciclina contra *P. aeruginosa* MR, cuja combinação exibe efeito sinérgico com atividade bactericida em poucas horas de interação;
5. Tigeciclina pode ser incorporada às bordas hidrofóbicas dos nanofragmentos de DDA, o que resulta na monomerização da Tigeciclina, com preservação da estrutura primária, favorecendo o efeito sinérgico de ambas drogas;
6. O uso combinado de DDA pode estender o potencial clínico da Tigeciclina para *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS¹

Ambler RP. The structure of β -lactamase. *Phil Trans R Soc Lond B Sci.* 1980;289(36):321-31.

Azzopardi EA, Azzopardi SM, Boyce DE, Dickson WA. Emerging gram-negative infections in burn wounds. *J Burn Care Res.* 2011;32(5):570-6.

Bouza E, Muñoz P. Monotherapy versus combination therapy for bacterial infections. *Med Clin North Am.* 2000;84(6):1357-89.

Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, Herndon DN. Emerging Infections in Burns. *Surg Infect (Larchmt).* 2009;10(5):389–97.

Brasil: Ministério da Saúde. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do país, de programa de controle de infecções hospitalares. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 de Maio de 1998. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html. [2012 Ago. 19].

Carvalho EM, Massarollo PC, Levin AS, Isern MR, Pereira WL, Abdala E, Rossi F, Mies S. Comparative study of etiological diagnosis of nosocomial pneumonia. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(1):67-74.

Castanheira M, Toleman M, Jones R, Schmidt F, Walsh T. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *blaGIM*, Encoding a New Subclass of Metallo-beta-Lactamase Antimicrob Agents *Chemother.* 2004;48(12):4654–61.

Choi JY, Park YS, Cho CH, Seon, Y, Shin SY, Song G, Yong D, Lee K, Kim JM. Synergic in-vitro activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:1089-104.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard - Ninth edition. CLSI document M02–A10. Wayne, PA: 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved standard - Twenty-First informational Supplement; CLSI document M100-S21. Wayne, PA:2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – Eighth edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: 2009.

Cystic Fibrosis Foundation. About cystic fibrosis [homepage on the internet]. Available from: <http://www.cff.org/AboutCF>. [2012 Jul. 31].

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-33.

De-Souza DA, Marchesan WG, Greenea'd LJ. Epidemiological data and mortality rate of patients hospitalized with burns in Brazil. *Burns.* 1998;24:433-8.

Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(3):852-6.

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

Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -Lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):160–201.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Enterobacteriaceae. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v_2.0_120101.pdf. [2012a Feb 14].

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): EUCAST Quality Control. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_QC_tables_2.0.pdf. [2012b Feb 14].

Fass RJ, Prior RB. Comparative in vitro activities of piperacillin-tazobactam and ticarcillin-clavulanate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(8):1268-74.

Food and Drug Administration (FDA): Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics Review. Tigecycline 2005. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/021821Orig1s000ClinPharmR.pdf [2012 Agu 31].

Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Perea EJ. In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy.* 2003;49(1-2):24-6.

Fernández-Cuenca F, Egea P, López-Cerero L, Díaz-De Alba P, Vila J, Pascual A. [Comparison of 3 methods for determining sensitivity to imipenem and meropenem in *Acinetobacter baumannii* with a carbapenem-heteroresistant phenotype]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(8):485-8.

Fiates GMR, Barbosa E, Auler F, Feiten SF, Miranda F. Estado nutricional e ingestão alimentar de pessoas com fibrose cística. *Rev Nut.* 2001;14(2):95-101.

Firmida MC, Lopes AJ. Aspectos epidemiológicos da fibrose cística. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto.* 2011;10(4):12-22.

Fleiss PM, Richwald GA, Gordon J, Stern M, Frantz M, Devlin RG. Aztreonam in human serum and breast milk. *Br J Clin Pharmacol*. 1985;19(4):509-11.

Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MI, Lincopan N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):3063-4.

Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(9):825-9.

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

Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):722-32.

Furtado GH, Gales AC, Perdiz LB, Santos AF, de Medeiros EA. Prevalence and clinical outcomes of episodes of ventilator-associated pneumonia caused by SPM-1-producing and non-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(5):604-6.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):354-60.

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

Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003b;45(1):77-9.

Gales AC, Torres PL, Vilarinho DS, Melo RS, Silva CF, Cereda RF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a intensive care unit of a teaching hospital. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(4):267-71.

Georgopapadakou NH, Smith SA, Sykes RB. Mode of action of azthreonam. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;21(6):950-6.

Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Giamarellou H. Comparative in vitro interactions of ceftazidime, meropenem, and imipenem with amikacin on multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997;29(2):81-6.

Gilbert DN, Moellering JR RC, Elipoulos GM, Chambers HF, Saag MS. The Sanford guide to antimicrobial therapy. 40th ed. Sperryville: Antimicrobial Therapy; 2010.

Girão E, Levin AS, Basso M, Gobara S, Gomes L B, Medeiros EA, Barone AA, Costa S. F. Trends and outcome of 1121 nosocomial bloodstream infections in intensive care units in a Brazilian hospital, 1999-2003. *Int J Infect Dis.* 2008;12:145-6.

Goldberg JB. Why is *Pseudomonas aeruginosa* a pathogen? *F1000 Biol Rep.* 2010;2(29):1-4.

Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(9):980-3

Hall MJ, Middleton R.F, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother.* 1983;11(5):427-33.

Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, Horswill AR, Hamood AN. An in vitro biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. *Burns.* 2011;37(2):312-21.

Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat.* 2000;3(4):247-55.

Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):29-70.

Hauser A, Ozer EA. *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Reviews Microbiology.* 2011;9(3).

Høiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med.* 2011;9:32.

Joyce LF, Downes J, Stockman K, Andrew JH. Comparison of five methods, including the PDM Epsilonometer test (E-test), for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30(10):2709-13.

Kanj SS, Kanafani ZA. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(3):250-59.

Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakaqami, Tuner P, Mendes C. MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(3):216-24.

Labiris NRC, Holbrook AM, Chrystyn H, Macleod SM, Newhouse MT. Dry Powder versus Intravenous and Nebulized Gentamicin in Cystic Fibrosis and Bronchiectasis: A Pilot Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1711-6.

Lacerda LA, Carneiro AC, Oliveira AF, Gragnani A, Ferreira LM. Estudo epidemiológico da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Universidade Federal de São Paulo. *Rev Bras Queimaduras*. 2010;9(3):82-8.

Lambert ML, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, Agodi A, Frank U, Mertens K, Schumacher M, Wolkewitz M. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(1):30-8.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. 1999;43:1584-90.

Lee K, Yum J H, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4485-91.

Levin AS, Oliveira MS. The challenge of multidrug resistance: the treatment of gram-negative rod infections. *Shock*. 2008;30 Suppl 1:30-3.

Lincopan N, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. *In vivo* activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):412-8.

Lincopan N. Atividade biológica de uma nova formulação de anfotericina b solubilizada em nanofragmentos catiônicos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio. [tese (Doutorado em Análises Clínicas)]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2004.

Lincopan N, Macculloch JA, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Med Microbiol*. 2005;43(1):516-9.

Lincopan N, Carmona-Ribeiro AM. Lipid-covered drug particles: combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(1):66-75.

Lincopan N, Leis R, Vianello MA, de Araújo MR, Ruiz AS, Mamizuka EM. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Med Microbiol*. 2006;55(11):1611-3.

Lincopan N, Trabulsi LR. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabulsi, L. R. e Alterthum, F. *Microbiologia*. 5th ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p. 369-81.

Lincopan N, Neves P., Mamizuka EM, Levy, CE. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis*. 2010;14:344-7.

Lister PD. Beta-lactamase inhibitor combinations with extended-spectrum penicillins: factors influencing antibacterial activity against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy*. 2000;20(9 Pt2):213S-218S.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40.

Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(4):611-4.

Lauret D, Thrupp MD. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. Lorian V. *Antibiotics in laboratory medicine manual of clinical microbiology*. London: Williams e Wilkins, American Society for Microbiology; 1980.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):194-222.

Macedo JLS, Rosa SC, Macedo KCS, Castro C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. *Rev Col Bras Cir*. 2005;32(4):173-7.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.

Mah GT, Mabasa VH, Chow I, Ensom MH. Evaluating outcomes associated with alternative dosing strategies for piperacillin/tazobactam: a qualitative systematic review. *Ann Pharmacother*. 2012;46(2):265-75.

Mariné J. Antibióticos por via inalatória – uma opção para prevenção e tratamento das pneumonias. *Pulmão RJ*. 2009;Suppl2:S64-S67.

Masgala A, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Discrepancies between various methods in susceptibility testing and epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Cent Eur J Public Health*. 2010; 18(2):119–123.

Mello-Jorge MHP, Koizumi MS. Gastos governamentais do SUS com internações hospitalares por causas externas: análise no Estado de São Paulo, 2000. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(2):228-38.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, GALES AC. Metallo- β -lactamase. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(2):103-13.

Mitsugui CS, Tognim MC, Cardoso CL, Carrara-Marroni FE, Botelho Garcia L. In vitro activity of polymyxins in combination with β -lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(5):447-50.

Molina-García L, Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Fernández-de Córdoba ML, Ruiz-Medina A. Photo-chemically induced fluorescence determination of tigecycline by a stopped-flow multicommutated flow-analysis assembly. *Analytical Letters*. 2011;44:127–36.

Montes SF, Barbosa MH, Sousa Neto AL. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um Hospital de Ensino. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45(2):369-73.

Moura JP, Gir E. Conhecimento dos profissionais de enfermagem referente à resistência bacteriana a múltiplas drogas. *Acta Paul Enferm*. 2007;20(3):351-6.

Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol*. 2010;161:58–66.

Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1211-21.

Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(2):582-7.

Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 7):857-60.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico. 6th ed; Approved standards M7–A6. Wayne, Pa: NCCLS; 2003.

Neves PR. Alterações da Permeabilidade e Expressão de Bombas de Efluxo em Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Resistente ao Imipenem. [tese (Doutorado em Análises Clínicas)]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2010.

Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(4):409-20.

Ng WW, Chau PY, Leung YK, Livermore DM. In vitro activities of Ro 17-2301 and aztreonam compared with those of other new beta-lactam antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(5):872-3.

Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35(3):135-53.

Noguchi H, Matsubishi M, Mitsubishi S. Comparative studies of penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Eur J Biochem. 1979;100(1):41-9.

Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009;364(1527):2275-89.

Oliveira TR, Benatti CR, Lamy MT. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. Biochim Biophys Acta. 2011;1808(11):2629-37.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38(1):71-8.

Paterson DL, Lipman J. Returning to the pre-antibiotic era in the critically ill: the XDR problem. Crit Care Med. 2007;35(7):1789-1791.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(6):2702.

Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. J Bacteriol. 1999;181(4):1203-10.

Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér SA, Oliveira MP, Sampaio JLM, Freitas D'A, Ferreira ALP, Amorim ELT, Riley LW, Moreira BM. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2420-4.

Perez LR, Antunes AL, Freitas AL, Barth AL. When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo- β -lactamase gene shows high ability to produce biofilm. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(5):711-4.

Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J Antimicrob Chemother. 2004;53(1):28-52.

Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(4):1406-9.

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

Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol. 2011;2(65):1-13.

Pruitt BA Jr, McManus AT. The changing epidemiology of infection in burn patients. *World J Surg.* 1992;16(1):57-67.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;3:440-58.

Rahal JJ, Urban C, Horn D, et al . Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA.* 1998;280:1233–7.

Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis.* 2006;43 Suppl 2:S95-9.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, Ludwig N, Valentin L, Rosario-Filho NA, Camargo Neto E, Lewis E, Giugliani R, Diniz EM, Culp L, Phillip JA 3rd, Chakraborty R. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros.* 2008;7(1):15-22.

Rempel LCT, Tizzot MRPA, Vasco JFM. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. *Rev Bras Queimaduras.* 2011;10(1):3-9.

Rodloff AC, Goldstein EJC, Torres A. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:916-29.

Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(6):1221-9.

Romero-Vivas J, Rodríguez-Créixems M, Bouza E, Hellín T, Guerrero A, Martínez-Beltrán J, García de la Torre M. Evaluation of aztreonam in the treatment of severe bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(2):222-6.

Rosa FR, Dias FG, Nobre LN, Morais HA. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. *Rev Nutr.* 2008;21(6):725-37.

Rose WE, Rybak MJ. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy.* 2006;26(8):1099-110.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.* 2011;52(9):1138-43.

Sabath LD, Abraham EP. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J.* 1966;98(1):11C-3C.

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

Sader HS, Jones RN. Comprehensive in vitro evaluation of cefepime combined with aztreonam or ampicillin/sulbactam against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(5):380-4.

Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22(4):564-70.

Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):582.

Santos Filho L, Santos IB, Assis AML, Xavier DE. Determinação da Produção de metalo beta-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *Revista Brasileira de Patologia*. 2002;38(01):79-84.

Sistema Único de Saúde (SUS). Datasus. Informações de saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) e Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS) por ocorrência segundo causas externas do Brasil. 2009. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br> [2011 Jul 28].

Souza AA, Mattar CA, De Almeida PCC, Faiwichow L, Fernandes FS, Neto ECA, Manzotti MS, De Paiva LGR. Perfil epidemiológico dos pacientes internados na Unidade de Queimaduras do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. *Rev Bras Queimaduras*. 2009;8(3):87-90.

Schurek KN, Sampaio JL, Kiffer CR, Sinto S, Mendes CM, Hancock RE. Involvement of pmrAB and phoPQ in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4345-51.

Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 9):1133-48.

Strayer AH, Gilbert DH, Pivarnik P, Medeiros AA, Zinner SH, Dudley MN. Pharmacodynamics of piperacillin alone and in combination with tazobactam against piperacillin-resistant and-susceptible organisms in an in vitro model of infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(10):2351-6.

Sykes RB, Bonner DP, Bush K, Georgopapadakou NH. Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;21(1):85-92.

Theuretzbacher U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(4):295-9.

Tillotson GS. Where does novel antibiotics ReD stand among other pharmaceutical products: an industrial perspective? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(5):551-2.

Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(3):224-8.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(5):673-9.

Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparison activities of Colistin, Rifampicina, Imipenem and Sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30:537-40.

Ubbink J, Schär-Zammaretti P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2007;12:263-70.

Vale ECS. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. *An Bras Dermatol*. 2005;80(1):9-19.

Van Westreenen M, Tiddens HA. New antimicrobial strategies in cystic fibrosis. *Paediatr Drugs*. 2010;12(6):343-52.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;2:306-25.

Walton MA, Villarreal C, Herndon DN, Heggors JP. The use of aztreonam as an alternate therapy for multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns*. 1997;23(3):225-7.

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

World Health Organization (WHO). The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. 2004 Available from: http://www.cfww.org/docs/who/2002/who_hgn_cf_wg_04-02.pdf. [2012 Aug 14].

Yamane K, Wachin J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama, Kimura K, Kai K, Ishikawa S, Ozawa Y, Konda T, Arakawa Y. 16S rRNA Methylase-producing, Gram-negative Pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:642-6.

Yim H, Woo H, Song W, Park MJ, Kim HS, Lee KM, Hur J, Park MS. Time-Kill synergy tests of tigecycline combined with imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against clinical isolates of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Ann Clin Lab Sci*. 2011;41(1):39-43.

Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, Nishino T, Shimizu E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by

quantitative real-time polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 2005;243:125-31.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. 2009;53(12):5046–54.

Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother. 2005;56:1148-51.

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

Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(1):71-93.

Zeitler K, Salvas B, Stevens V, Brown J. Aztreonam lysine for inhalation: new formulation of an old antibiotic. Am J Health Syst Pharm. 2012;69(2):107-15.

Zhanel GG, Mayer M, Laing N, Adam HJ. Mutant Prevention Concentrations of Levofloxacin Alone and in Combination with Azithromycin, Ceftazidime, Colistin (Polymyxin E), Meropenem, Piperacillin Tazobactam, and Trobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2228-30.