Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina – DIP

Diversidade de fenótipos e genótipos em amostras bacterianas de lavado bronco - alveolar de pacientes com pneumonia em um hospital universitário do Rio de Janeiro

Adriana Lucia Pires Ferreira

Rio de Janeiro
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Diversidade de fenótipos e genótipos em amostras bacterianas de lavado bronco – alveolar de pacientes com pneumonia em um hospital universitário do Rio de Janeiro

Adriana Lucia Pires Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Orientador: Profª. Beatriz Meurer Moreira

Rio de Janeiro

Dezembro/2007

Ferreira, Adriana Lucia Pires
Diversidade de fenótipos e genótipos em amostras bacterianas de lavado bronco – alveolar de pacientes com pneumonia em um hospital universitário do Rio de Janeiro / Adriana Lucia Pires Ferreira. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2007.

Orientador: Beatriz Meurer Moreira

Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 80-92

1. Pneumonia hospitalar. 2.Múltiplos fenótipos. 3.Diversidade clonal. – Tese. I. Ferreira, Adriana Lucia Pires. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias. III. Título.

Diversidade de fenótipos e genótipos em amostras bacterianas de lavado bronco – alveolar de pacientes com pneumonia em um hospital universitário do Rio de Janeiro

Adriana Lucia Pires Ferreira

Orientador: Profª. Beatriz Meurer Moreira

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Aprovada por:

_____

Presidente, Profª. Drª. Simone Aranha Nouér

_____

Drª.Renata Fernandes Rabello

_____

Drª. IanicK Souto Martins

Rio de Janeiro

Dezembro/2007

Aos meus pais, Joaquim Luiz e Ana Lucia, pelo carinho e apoio. “Mãe obrigada por servir de porto seguro nos momentos difíceis e pelo amor e compreensão incondicionais”.

Ao meu querido marido José Antônio pelo carinho e apoio e aos meus irmãos Lusimar e Alex Luiz pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof[a]. Dr[a]. Beatriz Meurer Moreira pela orientação, atenção e paciência em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Santoro Lopes, coordenador da Pós-Graduação em DIP da UFRJ, pela credibilidade.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica do HUCFF que me apoiaram na realização desse trabalho.

Aos amigos Elizabeth Mendes Alves, Nerly de Almeida, Leomar Afonso da Silva Caldas, Vera Lúcia de Moraes Bastos, Simone de Azevedo Gomes e Márcia de Fátima Santos Machado da Silva que colaboraram de várias formas.

À Prof[a]. Dr[a]. Simone Aranha Nouér, pela ajuda que tornou mais fácil a coleta de dados.

À equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Infecções Bacterianas e do Laboratório de Patogênese e Resistência de Cocos Gram-positivos do Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde que me receberam de braços abertos.

Ao Rubens Dias pela “introdução” ao caminho da Biologia Molecular.

Às companheiras Flávia Pellegrino, Ana Carolina Rocha, Myrna Gomes, Adriana Vivoni, Valéria Girão e Maria Silvana Alves pelo incentivo e auxílio no “trajeto do 272”.

Aos pacientes que, anonimamente, participaram do estudo.

RESUMO

Diversidade de fenótipos e genótipos em amostras bacterianas de lavado bronco-alveolar de pacientes com pneumonia em um hospital universitário do Rio de Janeiro

Adriana Lucia Pires Ferreira

Orientador: PROF^{a}. Dr^{a} Beatriz Meurer Moreira

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

A pneumonia hospitalar representa uma alta mortalidade. A ocorrência de variações fenotípicas e genotípicas nos agentes etiológicos destas infecções ainda não foi adequadamente estudada, e pode ocasionar dificuldades na instituição do tratamento correto. **Objetivo:** descrever as variações de fenótipos e genótipos presentes em bactérias obtidas de lavado bronco-alveolar (LBA) de pacientes com pneumonia hospitalar atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ. **Métodos:** Um total de 33 LBAs com crescimento significativo ($\geq 10^4$ unidades formadoras de colônias/mL) obtidos de 27 pacientes no período de outubro/2002 a março/2003 foram incluídos no estudo. Após 48h de incubação, de cada tipo colonial diferente com contagem significativa foram selecionadas cinco colônias (definidas no presente estudo como subpopulações) para identificação, teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão (Clinical and Laboratory Standards Institute) e análise molecular por técnica de PCR (ERIC e RAPD). Foram incluídos no estudo 222 subpopulações de 46 amostras de Gram-negativos: *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Acinetobacter* spp. (Ac), *Serratia marcescens* (Sm), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Klebsiella oxytoca* (Ko), *Citrobacter freundii* (Cf), *Enterobacter aerogenes* (Ea), *Enterobacter cloacae* (Ec), e *Proteus mirabilis* (Pm) isoladas nos 33 LBAs, para realização da fenotipagem, e 200 subpopulações para realização da genotipagem. **Resultados:** Em sete pacientes (26%), dentre colônias inicialmente supostas como Pa, Sm, Ko, Cf e Ec, outros microrganismos foram encontrados: *S. maltophilia*, *Chryseobacterium* sp., Kp, Ac e Sm. Somente nas enterobactérias foram encontradas subpopulações com diversidade de biótipos. No teste de susceptibilidade, foram encontrados 80 fenótipos de resistência distintos dentre as 222 subpopulações: 20 microrganismos apresentavam múltiplos fenótipos de resistência. Dentre as 200 subpopulações avaliadas por PCR, foram detectados 52 genótipos em 22 pacientes. Sete pacientes (26%) apresentavam diversidade clonal. **Conclusões**: Um quarto dos pacientes apresentou variação fenotípica e genotípica em amostras bacterianas isoladas de LBA. Este resultado pode ter implicação terapêutica.

Palavras-chave: 1. Pneumonia hospitalar. 2 .Múltiplos fenótipos. 3. Diversidade clonal.

Rio de Janeiro

Dezembro/2007

ABSTRACT

Diversity of phenotypes and genotypes among bacterial isolates obtained from broncho-alveolar lavage of patients from a university hospital in Rio de Janeiro.

Adriana Lucia Pires Ferreira

Orientador: Profª. Drª. Beatriz Meurer Moreira

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Nosocomial pneumoniae has high mortality. The occurrence of a diversity of phenotypes and genotypes among the microbial agents of these infections may compromise the treatment, and has not been adequately addressed to date. **Objective:** To describe the variations of phenotypes and genotypes among bacterial isolates obtained from broncho-alveolar lavage (BAL) specimens of patients with nosocomial pneumonia admitted to Hospital Universitário Clementino Fraga Filho of UFRJ. **Methods:** A total of 33 BAL specimens leading to significant bacterial growth ($\geq 10^4$ colony forming units/mL) obtained from 27 patients from October/2002 to March/2003 were included in the study. After 48h incubation, cultures were examined for colonies of unique types and significant growth. Five colonies (subpopulations) of each type were selected for species identification, antimicrobial susceptibility by disc diffusion testing (Clinical and Laboratory Standards Institute) and genotyping by PCR (ERIC and RAPD). For phenotyping, we studied 222 subpopulations of 46 Gram-negative isolates: *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Acinetobacter* spp. (Ac), *Serratia marcescens* (Sm), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Klebsiella oxytocca* (Ko), *Citrobacter freundii* (Cf), *Enterobacter aerogenes* (Ea), *Enterobacter cloacae* (Ec), and *Proteus mirabilis* (Pm) isolated from 33 BAL specimens. For genotyping, 200 subpopulations were included. **Results**: Among seven patients with colonies initially described as Pa, Sm, Ko, Cf and Ec, other microorganisms were found: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp., Kp, Ac and Sm. Only the enterobacterial isolates had more than one biotype within the subpopulations of an isolate. A total of 80 distinct resistance phenotypes were found in the susceptibility tests, and 20 bacterial isolates had multiple resistance phenotypes. The 200 subpopulations studied by PCR revealed 52 genotypes among 22 patients. Seven patients (26%) had polyclonal isolates. **Conclusions:** One fourth of the patients had BAL specimens with phenotypically and genotypically diverse bacterial subpopulations within an isolates. This finding may pose therapeutic difficulties.

Key-words: 1. Nosocomial pneumonia. 2. Multiple phenotypes. 3. Clonal diversity

Rio de Janeiro

Dezembro/2007

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS IX

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS XI

1 INTRODUÇÃO. 13

2 REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 Mecanismos de defesa do hospedeiro 17
2.2 Epidemiologia da pneumonia hospitalar 18
2.3 Patogênese da pneumonia 20
2.4 Fatores de risco para pneumonia bacteriana 22
2.6 Métodos de tipagem bacteriana 24
2.6.1 Métodos convencionais 24
2.6.2 Métodos moleculares 26
2.7 Bacilos Gram-negativos nas infecções hospitalares 27
2.8 Resistência aos antimicrobianos nos bacilos Gram-negativos 28
2.8.1 Principais mecanismos de resistência em bacilos Gram-negativos 29
2.8.2 Epidemiologia da resistência 31
2.9 Diversidade bacteriana 32

3 OBJETIVO. 35

4 MATERIAIS E MÉTODOS 36
4.1 Definições 36
4.2 Desenho do estudo 38
4.3 Ambiente do estudo 39
4.4 População de estudo 39
4.4.1 Critérios de inclusão 39
4.4.2 Critérios de exclusão 39
4.5 Coleta do espécime clínico 39
4.6 Processamento do espécime clínico 40
4.7 Ficha de dados clínicos 40
4.8 Amostras avaliadas 41
4.9 Amostras - controle 44
4.10 Caracterização fenotípica das subpopulações 44
4.10.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos 45
4.10.2 Teste de disco difusão 46
4.10.3 Teste de detecção de produção de beta-lactamase de espectro ampliado. 47
4.10.4 Teste para produção de enzima metalo-beta-lactamase 48
4.10.5 Teste de diluição em ágar e teste de difusão em gradiente de concentração.. 48
4.11 Caracterização genotípica das subpopulações 49

4.11.1 Caracterização da presença do gene *bla*$_{spm}$ 52

5 RESULTADOS 53
5.1 População de pacientes e LBA incluídos no estudo..... 53
5.2 Caracterização fenotípica das subpopulações..... 56
5.3 Caracterização genotípica das subpopulações..... 62

6 DISCUSSÃO..... 71

7 CONCLUSÕES 79

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

ANEXOS..... 92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	*Acinetobacter*
AC	Ágar Chocolate
AS	Ágar Sangue
AFLP	Amplificação seletiva de fragmentos de restrição a partir da digestão total do DNA genômico (*Amplifield fragment length polymorfhism analysis*)
AMB	Ambulatório
AmpC	Beta-lactamases cromossômicas induzíveis
API	*Analytical Profile Index*
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATS	*American Thoracic Society*
BGNFG	Bacilo Gram-negativo fermentador de glicose
BGNNFG	Bacilo Gram-negativo não fermamentador de glicose
CB	Caldo Brucella
CIM	Concentração mínima inibitória
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CESP	*Citrobacter, Enterobacter, Serratia e Providencia*
Cf	*Citrobacter freundii*
CLSI	*Clinical Laboratory Standard Institute*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Ea	*Enterobacter aerogenes*
Ec	*Enterobacter cloacae*
ECI	Enfermaria de cuidados intensivos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMG	Emergência
ERIC	Amplificação de segmentos do DNA que se repetem no cromossomo de enterobactérias (*Enterobacterial Repititive Intergenic Consensus*)
ESBL	β-lactamase de espectro ampliado
EUA	Estados Unidos da América
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Kp	*Klebsiella pneumoniae*
Ko	*Klebsiella oxytoca*
LBA	Lavado bronco-alveolar
M-*bla*	Metalo-β-lactamase
MHA	Mueller - Hinton ágar
NCCLS	*National Committe for Clinical Laboratory Standards*
NNISS	*National Nosocomial Infections Surveillance System*
O-F	Oxidação - fermentação
Pa	*Pseudomonas aeruginosa*
PCR	Técnica de reação da polimerase em cadeia (*Polimerase chain reaction)*
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*)
Pm	*Proteus mirabilis*
RAPD	Análise do polimorfismo de segmentos do DNA amplificado de forma aleatória (*Random Amplifield Polymorfic DNA*)
RFLP	Polimorfismo dos fragmentos de restrição (*Restriction fragment length polimorphisms*)
SIM	Sulfeto – indol- motilidade
Sm	*Serratia marcescens*
SHV	Sulphydryl variable
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SPM-1	São Paulo metalo-β-lactamase
Subpops	Subpopulações
TEM	Temoriana
TSA	Tripticase Soy ágar
TSB	Tripticase Soy broth
TSI	Agar Tríplice açúcar - ferro
TOT	Tubo oro-traqueal
UC	Unidade Coronariana
UCC	Unidade Cardíaca
UFC	Unidade formadora de colônias
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de terapia intensiva
VM	Ventilação mecânica

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1 Esquema de seleção das subpopulações (subpops) investigadas no estudo 43

Figura 2 Figuras representativas dos padrões de bandas obtidos para enterobactérias, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *Acinetobacter* spp. 66

Figura 3 Dendrograma das enterobactérias avaliadas pelo ERIC-PCR 67

Figura 4 Dendrograma das amostras de *S. marcescens* avaliadas pelo RAPD 68

Figura 5 Dendrograma das amostras de *E. aerogenes* avaliadas pelo RAPD ..68

Figura 6 Dendrograma das amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas pelo RAPD..... 69

Figura 7 Dendrograma das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas pelo RAPD.....70

Tabela 1 Agentes bacterianos associados à pneumonia segundo achados de LBA realizado em pacientes atendidos no HUCFF (outubro/2002 a março/2003).....38

Tabela 2 Condição de amplificação e respectivos iniciadores utilizados nas reações de PCR.....51

Tabela 3 Distribuição dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a faixa etária.....53

Tabela 4. Distribuição da localização dos pacientes do estudo no HUCFF.....54

Tabela 5 Microrganismos encontrados em 33 LBA obtidos de pacientes do HUCFF entre outubro/02 e março/03.....55

Tabela 6 Descrição dos pacientes que tiveram isolamento de amostras com identificação final discrepante da original.....56

Tabela 7 Resultados dos testes de identificação utilizados na diferenciação de 84 subpopulações de enterobactérias.....58

Tabela 8 Resultados dos testes de identificação utilizados na diferenciação de 138 subpopulações de BGNNFG.....59

Tabela 9 Pacientes com subpopulações apresentando diferentes biótipos.....60

Tabela 10 Freqüência de múltiplos perfis de resistência.....61

Tabela 11 Pacientes com microrganismos produtores de beta - lactamase.....62

Tabela 12 Total de subpopulações incluídas na análise molecular.....63

Tabela 13 Pacientes com subpopulações policlonais.....65

1 INTRODUÇÃO

A pneumonia, importante causa de morbi-mortalidade, é definida como inflamação distal do pulmão causada por infecção microbiana, sendo caracterizada histologicamente pelo acúmulo de neutrófilos nos bronquíolos distais, alvéolos e interstício (Griffin & Meduri, 1994). A pneumonia pode ser adquirida na comunidade (origem comunitária) ou no ambiente hospitalar (origem hospitalar), quando também recebe a denominação de pneumonia associada aos cuidados com a saúde. Neste último caso, a pneumonia está ausente no ato da admissão do paciente no hospital, surgindo somente após no mínimo 48 horas de internação, ou mesmo após a alta quando puder ser relacionada com a internação ou com procedimentos hospitalares (Gusmão *et al*, 2003). Estima-se que 15% de todas as mortes associadas à hospitalização estejam diretamente relacionadas às pneumonias hospitalares (Sader *et al*, 2001b), sendo os pacientes que utilizam ventilação mecânica, os que apresentam um alto risco de desenvolverem esta enfermidade (Tablan *et al*, 1994).

Os critérios clínicos habituais de diagnóstico envolvem a presença de febre, tosse e secreção purulenta, em combinação com evidência radiológica. Entretanto, estes critérios não são confiáveis, pois são sensíveis, mas pouco específicos como no caso de pacientes com doença pulmonar pré-existente (Levison, 2001). Uma dificuldade adicional é que a existência de microrganismos em secreções do trato respiratório não confirma, necessariamente, o diagnóstico de pneumonia (Tablan *et al*, 1994; e Baraibar *et al*, 1997). Vários estudos demonstram que espécimes clínicos do trato respiratório inferior devem ser quantificados para permitir que se diferencie a presença de microrganismos que colonizam daqueles que causam infecção, já que é

inevitável que exista sempre algum grau de contaminação dos espécimes clínicos do trato respiratório inferior com microrganismos da microbiota da orofaringe. Curiosamente, é possível observar freqüentemente a natureza polimicrobiana do agente etiológico em ambiente hospitalar. É consenso entre vários especialistas que em espécime de lavado bronco-alveolar (LBA) a concentração bacteriana é igual ou superior a 10^4 unidades formadoras de colônias/mL nos doentes com pneumonia. Considera-se que concentrações inferiores representam microbiota de colonização de orofaringe (Chastre *et al,* 1988; Torres *et al,* 1989; Pinner *et al*, 1996; CDC, 1997; Rello *et al*, 1997; Speich *et al*, 1998; Johanson, 2003 e Guimarães & Rocco, 2006). No Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, o LBA é o espécime clínico que tem sido mais utilizado no diagnóstico do agente etiológico das pneumonias hospitalares.

Etiologia polimicrobiana pode ser observada nas pneumonias. Um outro aspecto já descrito em pneumonias hospitalares é a natureza policlonal de amostras de uma mesma espécie (Winn *et al*, 2006). Por outro lado, uma vez que as características fenotípicas apresentadas por microrganismos são adaptáveis ao meio em que os mesmos se encontram, é possível observar que aqueles relacionados a um mesmo genótipo podem apresentar variedade fenotípica, ou seja, exibem uma diversidade de biótipos ou de perfil de susceptibilidade. De fato, alguns estudos descreveram uma diversidade genética em amostras bacterianas relacionadas a infecções (Silbert *et al*, 2001 e Pellegrino *et al*, 2002) e a presença de múltiplos fenótipos de uma determinada bactéria em um único espécime clínico.

Em qualquer situação, o diagnóstico microbiológico inicial que inclui técnicas bioquímicas tradicionais é baseado na observação das características morfológicas das colônias obtidas em uma cultura. Porém, esta observação pode não refletir a

diversidade de microrganismos presentes no espécime clínico, visto que colônias macroscopicamente idênticas podem diferir em sua caracterização fenotípica. Uma vez definida os tipos morfológicos para realização da identificação bacteriana e teste de susceptibilidade aos antimicrobianios, pode-se estar direcionando o resultado para um laudo que nem sempre será reperesentativo da infecção avaliada. A diversidade bacteriana deve ser observada considerando a possível presença de múltiplos fenótipos. Testes de identificação conflitantes na presença de mais de um biótipo, podem dificultar na identificação bacteriana e colônias bacterianas podem não apresentar igualmente resistência a um determinado antibiótico. Por outro lado, a investigação microbiológica rotineira é fundamental para o reconhecimento do agente etiológico das infecções e para a definição da opção terapêutica mais adequada. Mesmo para o início da terapia empírica de infecções potencialmente graves, a definição do patógeno presente é extremamente importante, para uma evolução clínica favorável. Assim, a identificação do agente etiológico, bem como a escolha do antimicrobiano baseado no teste de susceptibilidade pode sofrer interferências. Além disso, um dos fatores que auxilia na escolha empírica do antimicrobiano é o reconhecimento precoce do patógeno mais provável o que diminui o tempo de hospitalização e custo do tratamento (Scheupner & Cobb, 1992).

A partir de um levantamento feito na literatura de língua inglesa incluída no banco de dados PubMed, não foi possível encontrar nenhum estudo sobre a presença de múltiplos fenótipos, que possam incluir variações no antibiograma, e múltiplos genótipos, em espécimes de LBA obtidos de pacientes com pneumonia.

Desta forma, o presente estudo foi desenhado para descrever as prováveis variações de fenótipos e genótipos presentes em bacilos Gram-negativos isolados a partir de espécimes de LBA obtidos de pacientes com pneumonia atendidos no

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), durante um período de seis meses. Os microrganismos isolados em LBA no HUCFF, conforme levantamento sobre o período de janeiro a dezembro de 2001, foram predominantemente bacilos Gram-negativos (78%). Os principais agentes dentre os Gram-negativos foram: *P. aeruginosa* (38,2%), *Acinetobacter* spp, (7,3%), *S. marcescens* (6,6%), *E. cloacae* (5,1%) e *K. pneumoniae* (4,4%). Estes foram os principais microrganismos selecionados para o presente estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismos de defesa do hospedeiro

O pulmão saudável não contém microrganismos. A esterilidade pulmonar reflete as ações coletivas da imunidade natural e adquirida do hospedeiro, além de outros mecanismos de defesa como o movimento do muco e os movimentos ciliares (Silva, 1999). Aproximadamente 80% das células que revestem as vias respiratórias centrais são células epiteliais colunares, pseudo-estratificadas e ciliadas. Cada célula ciliada contém aproximadamente 200 cílios, que batem em ondas coordenadas, propagando-se no sentido da orofaringe. Os cílios são revestidos por uma película líquida composta por duas camadas. A camada mais externa é viscosa e aprisiona partículas depositadas, que são então arrastadas no revestimento mucoso em direção à nasofaringe, onde serão deglutidas e expectoradas, a camada mais interna é de baixa resistência e é nela que os cílios batem para realização do movimento. As partículas depositadas no epitélio escamoso da superfície nasal são removidas pelo espirro (Levison, 2002).

Quando partículas infecciosas escapam das defesas das vias respiratórias e se depositam na superfície alveolar, elas são removidas pelas células fagocitárias e por fatores humorais. O patógeno fagocitado é transportado para a superfície ciliada e para dentro da orofaringe ou através dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais. Os macrófagos alveolares processam e apresentam o antígeno ao linfócito e secretam citocinas, que modulam o processo imune nos linfócitos T e B. As citocinas ativam os

macrófagos alveolares e recrutam fagócitos adicionais e outros fatores imunológicos a partir do plasma (Levison, 2002).

Porém, alguma deficiência na imunidade pode predispor à pneumonia. A invasão bacteriana ao parênquima pulmonar resulta na pneumonia, e reflete a interação de alguns fatores, tais como a alteração desses mecanismos de defesa do hospedeiro, a patogenicidade e virulência dos microrganismos, e a dimensão do inóculo bacteriano.

2.2 Epidemiologia da pneumonia hospitalar

As pneumonias, juntamente com as infecções cirúrgicas, a bacteremia e as infecções urinárias, estão entre os quatro tipos de infecções associadas aos cuidados com a saúde mais freqüentes, perfazendo aproximadamente 10% de todas estas infecções. A pneumonia é a segunda causa mais comum e a mais fatal das infecções hospitalares, com taxas de mortalidade que variam de 30 a 60% (Wenzel, 1995; Mandell & Campebel, 1998). De acordo com o *American Thoracic Society* (ATS, 2005) , sua letalidade varia entre 33% e 71%. Algumas estatísticas apontam que, em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), a pneumonia é a infecção mais freqüênte na Europa (Vincente *et al*, 1995 e Spencer, 1996) e a segunda mais freqüente nos hospitais americanos (CDC, 1997). Segundo o *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNISS, 2004), 83% das pneumonias hospitalares que ocorrem nos Estados Unidos são associadas com ventilação mecânica.

Uma variedade de microrganismos pode causar infecções do trato respiratório inferior. De acordo com um estudo do programa de vigilância de resistência antimicrobiana SENTRY (Sader *et al*, 2001) realizado em 11 hospitais do Rio de Janeiro, São Paulo e Florianópolis, nos anos de 1997 e 1998, dentre 525 amostras isoladas em

trato respiratório inferior, os microrganismos predominantes foram : *P. aeruginosa* (30%), *S. aureus* (20%), *Acinetobacter* spp. (13%), *Klebsiella* spp. (10%), e *Enterobacter* spp. (8%). De fato, alguns trabalhos regionais corroboram na prevalência de *P. aeruginosa* como um importante patógeno de infecções associadas aos cuidados com a saúde, especialmente associado a pacientes mais debilitados (Loureiro *et al*. 2001; Pellegrino *et al*., 2001). Esses dados diferem de alguns estudos realizados nos Estados Unidos, onde *S. aureus* foi o agente mais freqüente (17%), seguido dos bacilos Gram-negativos aeróbicos: *P. aeruginosa* (16%), *Enterobacter* spp. (11%) e *K. pneumoniae* (7%) (Richard *et a*l, 2000). Em um estudo realizado por Guimarães e Rocco na UTI do HUCFF da UFRJ, no período de setembro de 1999 a fevereiro de 2001, em 64 pacientes dos 69 com pneumonia associada à ventilação mecânica, foram identificados os agentes etiológicos, sendo os germes Gram-negativos responsáveis por 29 casos (45,3%), com predomínio de *P. aeruginosa* (22%), seguido por *Acinetobacter* spp. (14%) e *S. aureus* resistente à meticilina (11%).

O agente etiológico da pneumonia associada aos cuidados com a saúde pode também estar relacionado com o tempo de internação, uso de antibiótico e uso de dispositivo respiratório. Em 2005 a ATS publicou um consenso para o diagnóstico e tratamento da pneumonia associada aos cuidados com a saúde, no qual é informada uma classificação dos pacientes de acordo com a gravidade da doença de base, com a presença ou não de fatores de risco para pneumonia e com o tipo de pneumonia. Nesta proposta, é caracterizada como precoce a pneumonia que ocorre em pacientes nos primeiros quatro dias de hospitalização ou intubação, e tardia aquela que ocorre em pacientes com mais de quatro dias de hospitalização ou intubação. Esta classificação permite estabelecer propostas diferenciadas para o tratamento empírico. No caso das pneumonias de início precoce, os microrganismos mais freqüentemente encontrados

são representantes da microbiota da orofaringe: *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* e *Haemophilus influenzae*. Já nas pneumonias de início tardio, predominam bacilos Gram-negativos freqüentemente multirresistentes (Koeman *et al*, 2001).

2.3 Patogênese da pneumonia

A freqüência da colonização da mucosa da orofaríngе por bacilos Gram-negativos em indivíduos sadios é baixa, tornado-se elevada com a hospitalização. A doença pulmonar obstrutiva, a paralisia dos músculos respiratórios, a pneumoconiose, a fibrose cística, o edema pulmonar, o câncer brônquico, a imunodepressão, o alcoolismo, a desnutrição, o estado de alteração neurológica, uso de sondas nasoenterais e a idade avançada são algumas das condições consideradas “de risco” para pneumonia (Pechère & Joly, 1986). Os seios da face também contribuem como reservatórios de patógenos para a colonização da orofaringe (Rouby *et al*, 1994; Guimaraes & Rocco, 2006). A administração de antimicrobianos também contribui para determinação da composição dos microrganismos que colonizam o trato respiratório, além de selecionar microrganismos mais resistentes aos antimicrobianos.

A maioria dos patógenos pulmonares origina-se na microbiota orofaríngea, sendo a aspiração desses patógenos o mecanismo mais comum para o desenvolvimento da pneumonia. A destruição da fibronectina, que é um receptor para a microbiota Gram-positiva, em conseqüência do aumento da atividade proteolítica salivar, expõe os receptores para bacilos Gram-negativos aeróbios. Os bacilos Gram-negativos que irão aderir à superfície da mucosa da orofaringe provavelmente têm como origem o estômago do próprio paciente devido ao aumento do pH gástrico após o uso de antiácidos ou agentes bloqueadores de H_2 (Johanson *et al*, 1969; Levison, 2002). De

fato, cerca de 50% de adultos sadios aspiram as secreções orofaríngeas para o trato respiratório superior durante o sono. Esta freqüência pode aumentar em indivíduos com diminuição do nível de consciência (Levison, 2002).

Através da inalação de aerossóis infecciosos também é possível desenvolver pneumonia. Esses aerossóis são pequenos o bastante para contornar as defesas do hospedeiro. Uma partícula inalada com tamanho apropriado (≤ 5 μm) pode ser suficiente para alcançar o alvéolo e iniciar a infecção. As etiologias de pneumonia tipicamente adquiridas por aerossóis incluem a tuberculose, a legionelose, a histoplasmose, a psitacose, a febre Q e a síndrome pulmonar por hantavírus (Levison, 2002).

Mais raramente, o agente etiológico da pneumonia chega aos pulmões por via hematogênica. Este fenômeno é observado nos indivíduos em uso de cateter intravenoso e naqueles que apresentam endocardite bacteriana. A função de filtro do pulmão e a riqueza de rede capilar favorecem a disseminação por via sangüínea (Pechère & Joly, 1986).

Os microrganismos que causam pneumonia também podem ser inoculados diretamente nos pulmões. Esta inoculação pode ocorrer por contaminação do condensado formado no circuito ventilatório, que pode resultar em colonização e infecção das vias aéreas após a intubação traqueal ou após ferimentos perfurantes do tórax (Koeman *et al*, 2001).

2.4 Fatores de risco para pneumonia bacteriana

Os fatores de risco para pneumonia podem ser agrupados em intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos são aqueles relacionados ao paciente, tais como a imunodepressão, os extremos de idade, a gravidade da doença de base e a desnutrição

(Gusmão *et al*, 2003). Os principais fatores extrínsecos são: o uso prolongado de ventilação mecânica, que aumenta o risco de ocorrência da pneumonia em 6-21 vezes, e o uso do tubo oro-traqueal, que facilita a colonização traqueobrônquica. Durante a intubação, os microrganismos localizados nas vias aéreas superiores podem ser arrastadas para a traquéia. Além disso, pode ocorrer adesão dos microrganismos ao tubo oro - traqueal, formando uma substância polissacaride, denominada biofilme, que fixa o microrganismo na superfície do tubo e impede a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Outros fatores de risco são: a contaminação das mãos dos profissionais de saúde; o uso de antibioticoterapia prévia, que aumenta o risco de colonização; a posição de decúbito dorsal que favorece o refluxo gástrico; a aspiração do conteúdo da orofaringe; e a profilaxia da úlcera de stress (Tablan, *et al*, 1994).

2.5 Critérios diagnósticos para pneumonia hospitalar

Sendo o critério clínico isoladamente insuficiente para o diagnóstico das pneumonias, sempre há necessidade de associação com critérios radiológicos e microbiológicos. Embora não existam alterações radiológicas características, a radiografia de tórax é o exame utilizado para a detecção de infiltrados pulmonares, podendo confirmar a existência e a localização do infiltrado pulmonar, avaliar a extensão, detectar acometimento pleural, cavitação pulmonar e determinar a resposta à terapia antimicrobiana (Guimarães *et al*, 2006; Levison, 2002).

A tomografia computadorizada de alta resolução dos pulmões pode aumentar a acurácia do diagnóstico de pneumonia, especialmente quando o processo envolve uma região do pulmão obscurecida pelo diafragma, fígado, costelas, clavículas, ou coração (Levison, 2002).

Os critérios microbiológicos são importantes para a pesquisa do agente etiológico e avaliação do perfil de susceptibilidade para o ajuste da antibioticoterapia, quando necessário, e para o controle de cura. Um consenso de pesquisadores na área de diagnóstico de pneumonia associada à ventilação mecânica sugere a coleta de espécime clínico por broncoscopia (Chastre, 1998). A sensibilidade e a especificidade dos procedimentos invasivos variam segundo o tipo de paciente, o tipo de lesão pulmonar e o grau de exposição prévia aos agentes antimicrobianos. A broncoscopia por fibra óptica é segura e relativamente bem tolerada, tendo-se tornado o procedimento invasivo padronizado para obtenção de secreções do trato respiratório inferior, podendo fornecer uma visualização direta das vias respiratórias inferiores. Os espécimes clínicos podem ser coletados com escova de bainha, por lavagem bronco-alveolar ou por biópsia transbrônquica. A coleta de LBA apresenta vantagens quando se refere ao volume do espécime coletado para o processamento de múltiplos testes laboratoriais. Estima-se que aproximadamente um milhão de alvéolos são banhados por secreção pulmonar, retornando para o volume total de LBA 1mL desta secreção (Baselski & Wunderink, 1994). A sensibilidade da cultura do LBA varia entre 42 a 93% (média de 73%) e especificidade variando de 45 a 100% (média de 82%) (Reimer *et al*, 1998 e Grossman *et al*, 2000). No HUCFF, o LBA é o espécime clínico utilizado para realização da cultura em pacientes com suspeita de pneumonia na UTI.

Um dos problemas relacionados a espécimes respiratórios é a contaminação por microrganismos que podem ser encontrados no trato respiratório. Desta forma, a cultura quantitativa torna-se importante na avaliação dos espécimes obtidos do trato respiratório inferior, pois permite a elaboração de critérios que possam distinguir quando um microrganismo pertence apenas à microbiota local ou está causando infecção. O

ponto de corte para avaliação do LBA é de 10^4 UFC de um único microrganismo por mL de LBA (Baselski & Wunderink, 1994).

Outros espécimes clínicos também podem ser utilizados na pesquisa do agente etiológico das pneumonias. A biópsia brônquica e pulmonar fornece espécimes de grande especificidade para o diagnóstico de pneumonia, mas de baixa sensibilidade (Johanson & Dever, 2003). A hemocultura também apresenta baixa sensibilidade quando comparada ao LBA (Luna *et al*, 1999). A cultura do líquido pleural na ocorrência do derrame pleural concomitante é importante, pois microrganismos isolados nesse espécime também refletem o agente etiológico da infecção (Levison,2002).

Em 2006, o grupo *Canadian Critical Care Trials* publicaram um estudo randomizado de técnicas diagnósticas realizado entre maio de 2000 e fevereiro de 2005. Eles estudaram 739 pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica, internados em 28 UTIs do Canadá e Estados Unidos, comparando a cultura quantitativa de LBA (n=365) e cultura qualitativa de aspirado traqueal (n=374) em dois grupos distintos. O resultado detectado nesses dois grupos avaliados, com as diferentes estratégias diagnósticas, não apresentou nenhuma diferença significativa (p=0.94), apresentando associação semelhante tanto nos resultados clínicos quanto no uso de antibioticoterapia (p=0.90).

2.6 Métodos de tipagem bacteriana

2.6.1 Métodos convencionais

Os sistemas de classificação de microrganismos baseiam-se em características fenotípicas, principalmente morfológicas e fisiológicas. Os sistemas

moleculares baseiam-se nas relações filogenéticas das bactérias pela comparação das seqüências de várias macromoléculas ou genes que as codificam (Ordoñez, 2005).

Os testes realizados para identificação das bactérias em laboratórios clínicos são baseados nas características fenotípicas. Testes bioquímicos são fundamentados na pesquisa de enzimas estruturais, na pesquisa de produtos metabólicos e catabólicos e na sensibilidade a diferentes compostos. Também testes sorológicos são utilizados na identificação bacteriana (Martinez & Taddei, 2005).

O exame microscópico pelo método de Gram das colônias isoladas permite a separação de bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivos e Gram-negativos. As bactérias Gram-negativas são separadas em fermentadoras de glicose (BGNFG) e não-fermentadores de glicose (BGNNFG). Através de vários outros testes bioquímicos podemos agrupar estas bactérias em biótipos que determinam o agente etiológico da infecção. A separação das bactérias em sorotipos é clinicamente importante para algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

Vários sistemas comerciais foram desenvolvidos com objetivo de aumentar a acurácia e agilizar o resultado da identificação bacteriana, entretanto, a precisão destes sistemas varia conforme o microrganismo a ser identificado. Entre os principais sistemas comerciais desenvolvidos estão o sistema API (BioMérieux Hazelwood, EUA); Crystal (Becton Dickinson, Inc., Cockeysville, EUA); Enterotube II (Becton Dickinson, Inc., Cockeysville, EUA); RapID (Innovative Diagnostics Systems, Inc., Atlanta, EUA); Vitek (BioMérieux, Vitek Inc. Hazelwood, EUA) e MicroScan (Dade Behring, Inc., West Sacramento, EUA). Entretanto, os testes bioquímicos convencionais permanecem como os testes padrão para a identificação de microrganismos e foram os testes utilizados no presente estudo.

2.6.2 Métodos moleculares

Os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados na determinação de tipos bacterianos. Assim, a biologia molecular surge como uma importante ferramenta para identificação de surtos, sendo largamente empregada em estudos epidemiológicos (Martinez & Taddei, 2005). Os métodos moleculares mais utilizados nas investigações epidemiológicas hospitalares incluem a determinação do perfil plasmidial, ribotipagem, amplificação de segmentos do ácido desoxirribonucléico (DNA) empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise dos perfis de fragmentação do DNA, após digestão com enzimas de restrição, através de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), que apresenta alto poder discriminatório e reprodutibilidade (Renders *et al*, 1996). A análise do polimorfismo de segmentos do DNA amplificado de forma aleatória (*Random Amplified Polymorfic DNA* - RAPD) e o *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - PCR (ERIC-PCR) são variações da técnica de PCR muito utilizadas para este fim. O RAPD é baseado na amplificação de segmentos de DNA utilizando iniciadores com seqüências arbitrárias (Tenover, Arbeit & Goering,1997), enquanto que o ERIC-PCR se fundamenta na amplificação de segmentos do DNA que se repetem no cromossomo de enterobactérias através do uso de iniciadores específicos (Versalovic *et al*, 1991). Estas técnicas vêm substituindo o PFGE, que possui custo elevado, necessita de equipamentos sofisticados, e demanda um tempo maior para o seu desenvolvimento. A utilização da técnica de RAPD-PCR e ERIC-PCR foram comparadas à utilização da PFGE em estudos epidemiológicos (Liu *et al.*, 1995; Pruckler *et al.*, 1995; Renders *et al*,1996). Nestes estudos, aqueles métodos (RAPD e ERIC-PCR) apresentaram um nível de discriminação que se aproximou àquele do PFGE, embora esta equivalência não tenha sido observada de forma consistente

para bactérias Gram positivas. Desta forma, tais técnicas estão sendo amplamente utilizadas na avaliação da diversidade genética e como técnica de tipagem molecular em associação ou substituição à técnica de PFGE para bacilos Gram-negativos (Bois *et al*, 1999). No presente estudo as técnicas de RAPD-PCR e ERIC-PCR foram utilizadas para avaliar a diversidade genética dos microrganismos isolados no LBA.

2.7 Bacilos Gram-negativos nas infecções hospitalares

A família *Enterobacteriaceae* compõe uma família de bacilos Gram-negativos que tem como habitat natural o intestino humano e pode ser encontrada amplamente na natureza. Os microrganismos desta família estão entre os patógenos mais freqüentemente isolados na clínica, e causam diversas infecções. Dentre os gêneros mais estudados e de interesse médico destacam-se *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Edwarsiella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* e *Plesiomonas*. Com exceção do gênero *Plesiomonas,* são oxidase negativos e todos os membros desta família fermentam glicose e reduzem nitrato a nitrito. Todos os gêneros, exceto *Klebsiella*, são flagelados, ou seja, são móveis, e algumas cepas produzem cápsulas (Farmer, 1995).

Os BGNNFG, assim determinados por não utilizarem os carboidratos de forma fermentativa, são bacilos Gram-negativos encontrados no meio ambiente. Podem ser oxidase positivos, como *P. aeruginosa*, ou oxidase negativos, como *Acinetobacter* spp. A motilidade é variável conforme o gênero estudado e um dos testes mais utilizados no auxílio da identificação desses microrganismos é o teste de oxidação-fermentação (O-F) segundo Hugh & Leifson (Koneman *et al*, 1997) A maioria dessas bactérias causa doenças associadas a infecções oportunistas. Estes microrganismos têm emergido

como patógenos de grande importância nas UTIs em todo o mundo. Os membros desse grupo mais isolados na clínica segundo dados do SENTRY são: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia* spp (Jones *et al*, 2003).

2.8 Resistência aos antimicrobianos nos bacilos Gram-negativos

Segundo estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) 2004 dos EUA, são consumidos cerca de 235 milhões de doses de antibióticos por ano, em todo o mundo. A utilização intensa de antimicrobianos favorece o desenvolvimento da resistência bacteriana.

Determinados grupos de bactérias apresentam resistência natural a determinados antimicrobianos, denominada de resistência intrínseca. A determinação desta resistência pode ser utilizada no auxílio da confirmação da correta identificação bacteriana. Já a resistência adquirida pode ser disseminada por diferentes mecanismos genéticos, como mutação ou transferência do DNA (Rossi & Andreazzi, 2005).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos fundamentam-se em quatro pontos: alterações do sítio de ação na bactéria, impedindo assim a ligação do antimicrobiano com o microrganismo; intervenção de enzimas bacterianas, tais como beta-lactamases e aminoglicosidases, que degradam ou modificam o antimicrobiano; diminuição da permeabilidade da membrana externa bacteriana que dificulta a penetração do antimicrobiano; e o efluxo ativo, contando com bombas–dependentes de adenosina trifosfato, que expulsam para fora da célula o antimicrobiano que conseguiu penetrar em seu interior. Estes mecanismos podem ocorrer de forma concomitante nas

diferentes espécies bacterianas (Rossi & Andreazzi, 2005).

A observação de uma grande variedade genética entre bactérias multirresistentes sugere a existência de uma intensa pressão de seleção por meio do uso de antimicrobianos. Por outro lado, a detecção de um genótipo restrito, com disseminação de clones resistentes em unidades hospitalares, indica a necessidade da implementação de medidas de barreira para conter a expansão desses clones. Desta forma, podemos concluir que a utilização das ferramentas da biologia molecular para tipagem de cepas pode ser muito útil para o planejamento das medidas de contenção da resistência bacteriana (Nouér, 2005).

2.8.1 Principal mecanismo de resistência em bacilos Gram-negativos

Vários gêneros de Gram-negativos revelam produção de beta-lactamases codificadas em seu cromossomo, freqüentemente em pequenas quantidades. Entretanto, beta-lactamases plasmidiais, com ação sobre as primeiras cefalosporinas desenvolvidas, já haviam sido descritas em amostras de *Escherichia coli* desde 1965 (Abraham & Chain, 1940).

Com o aumento do uso de antimicrobianos, as beta-lactamases clássicas denominadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1, passaram a ser observadas em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, e também em outros microrganismos como *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Bradford, 2001).

No começo da década de 1980, um novo perfil de atuação de beta-lactamases plasmidiais foi observado em amostras de membros da família *Enterobacteriaceae*, devido a mutações pontuais das enzimas originais, que incluiam atuação em todos os novos beta-lactâmicos desenvolvidos, com exceção apenas dos

carbapenêmicos e das cefamicinas: as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) (Bush, *et al*, 1995). Desde então, enterobactérias produtoras de ESBL têm sido descritas em vários países (Bradford, 2001), inclusive no Brasil (Bonnet *et al.*, 2000a; Bonnet *et al.*, 2000b; Sader, 2000; Behar *et al.*, 2001; Bonnet *et al.*, 2001; Martins, 2001; Oliveira, Fernandes & Almeida, 2001; Pessoa-Silva *et al.*, 2002).

Nas bactérias que apresentam beta-lactamases cromossômicas induzíveis (AmpC), a resistência somente se manifesta quando houver exposição ao agente indutor, ou seja, um antimicrobiano beta-lactâmico (Quinn *et al,*1987). Os gêneros de maior importância clínica que produzem essa beta-lactamase são designadas de “Grupo CESP”, e compreendem *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia e Providencia* (Bush *et al*, 1995). Entretanto, podemos encontrar enzimas do tipo AmpC em outros membros da família *Enterobacteriaceae*, como por exemplo, *Morganella morganii*. Segundo dados do programa SENTRY obtidos no período de 1997 a 1999, *Enterobacter* foi a quinta causa mais freqüente de infecções da corrente sangüínea, pneumonia e infecções de ferida cirúrgica, e a quarta causa de infecção do trato urinário em São Paulo, Rio de Janeiro e Florianópolis. O reconhecimento do microrganismo como membro do grupo “CESP” é importante devido à possibilidade da emergência de múltipla resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Essas beta-lactamases induzíveis também são produzidas por vários BGNNFG, como por exemplo, *P. aeruginosa*. Essas cepas mantêm a susceptibilidade aos carbapenêmicos, que são fortes indutores, mas não sofrem a ação direta dessas enzimas (Rossi & Andreazzi, 2005).

As metalo-beta-lactamases (M*bla*) utilizam íons de zinco para o rompimento do anel beta-lactâmico. Diferentemente das outras beta-lactamases, apresentam forte atividade contra os carbapenêmicos, mas não contra o aztreonam. *S. maltophilia* apresenta essa beta-lactamase de forma constitutiva (Rossi & Andreazzi, 2005).

Os genes bacterianos que codificam M*bla* (*bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM,}$ *bla*$_{spm}$, *bla*$_{GIM}$ *e bla*$_{sim-1}$) estão localizados em cassetes cromossômicos ou plasmidiais. Com exceção da SPM-1 que é codificada por um gene no plasmídio, estas enzimas são codificadas por genes inseridos em cassetes dentro de integrons. Essa característica constitui um fator facilitador para a disseminação destes genes para vários gêneros bacterianos (Mendes *et al,* 2006).

No Brasil, SPM é a M*bla* fortemente predominante, tendo sido descrita em seis estados (Gales *et al*, 2003 e Cipriano *et al,* 2007). Em 2002, Pellegrino e colaboradores realizaram estudo com *P. aeruginosa* em cinco hospitais do Rio de Janeiro e observaram a presença de gene SPM nas amostras avaliadas. Considerando esse dado, a investigação do gene SPM foi incluída no estudo.

2.8.2 Epidemiologia da resistência

Atualmente, vários mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias conferem falhas na terapêutica. Os membros da família *Enterobacteriaceae* isolados em ambiente hospitalar vêm apresentando elevados nívies de resistência, o que torna difícil o tratamento e implica na necessidade de uma identificação correta dos mecanismos de resistência pelo laboratório clínico. Em geral, os carbapenemas (imipenem e meropenem) apresentam um bom espectro de ação frente às enterobactérias multirresistentes (Jones,1998, Martins *et al*, 2006), mas a utilização desses antimicrobianos também começa a causar preocupação devido ao desenvolvimento de resistência (Lincopan *et al*, 2005).

Infecções por *P. aeruginosa* apresentam elevada mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os índices mais elevados de morbi-mortalidade são

associados com uma ineficiente terapia empírica (Boffi *et al*, 2000). *P. aeruginosa* apresenta elevada resistência natural aos antimicrobianos e vem desenvolvendo novos mecanismos de resistência adquirida, incluindo a produção de beta-lactamases, que limitam a escolha dos agentes antimicrobianos para o tratamento (Harris *et al*, 1999). Em um estudo com 200 amostras de *P. aeruginosa*, publicado em 2002 por Pellegrino e colaboradores, altos níveis de resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado brasileiro foram observados: para amicacina, 40%, aztreonam 50%, ceftazidima 40%, cefepima 50%, ciprofloxacina 54%, piperacilina-tazobactam 43% e ticarcilina-clavulanato 61%. Nesse mesmo estudo foi identificado o predomínio de um único genótipo multiresistente de *P. aeruginosa* em diferentes hospitais do Rio de Janeiro.

Como mencionado anteriormente, outro membro importante do grupo dos BGNNFG é *Acinetobacter* spp. Em 2003, Jones, Sader e Mondell, após o estudo de 3.468 amostras de *Acinetobacter* spp obtidas no programa SENTRY entre 1997-2001, sugeriram que os carbapenemas imipenem e meropenem ainda são as melhores alternativas para um tratamento empírico. A resistência observada por estes autores nesse microrganismo foi de: 11% para imipenem; 12% para meropenem; 31% para cefepime; 32% para gatifloxacina; e 33% para tobramicina.

2.9 Diversidade bacteriana

A presença de variações nos fenótipos e genótipos presentes nas amostras bacterianas vem sendo estudada em vários microrganismos. Considerando-se bactérias Gram-positivas, um exemplo de variação genotípica digno de nota foi descrito por Van Eldere e colaboradores (2000). Estes autores avaliaram 15 amostras de *Staphylococcus epidermidis* obtidas de cinco frascos de hemoculturas de um paciente com endocardite,

selecionando três colônias da placa original de cada uma delas. Através da utilização de técnicas moleculares de macrorestrição e amplificação seletiva através da reação em cadeia da polimerase de fragmentos de restrição a partir da digestão total do DNA genômico (Amplifield fragment length polymorphism analysis - AFLP), os autores observaram a presença de quatro genótipos diferentes relacionados entre si e dois perfis de susceptibilidade distintos. Para melhor compreensão destes achados, Van Eldere e colaboradores realizaram, em paralelo, um experimento *in vivo* utilizando um dos genótipos do microrganismo isolado e camundongo como modelo animal, e mais uma vez foi observada a presença simultânea de diferentes genótipos, o que sugeriu uma variação genética durante a infecção. Já Sharma e colaboradores (2001), também avaliando bactérias Gram-positivas, estudaram 57 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativas isolados de hemoculturas de 22 pacientes, sendo nove colônias selecionadas da placa original para avaliação por técnica de PFGE Dessas 57 amostras, 41 (71,9%) foram consideradas por critérios clínicos o agente etiológico da bacteremia, e 16 (28,1%) contaminação da amostra. Os autores observaram um predomínio monoclonal nas bacteremias, ou seja, 35 (85,4%) das 41 hemoculturas apresentavam um único genótipo. Ainda analisando as bactérias Gram-positivas, Céspedes e colaboradores (2005) estudaram 148 amostras de *S. aureus* isoladas de culturas para pesquisa de colonização nasal. Essas amostras foram genotipadas por meio da técnica de PFGE, e foram incluídas três colônias de cada isolamento primário. Os autores observaram que aproximadamente 6,6% das amostras eram policlonais.

Considerando-se o grupo das bactérias Gram-negativas, De Silva & Rubin (1977), ao examinarem 59 espécimes clínicos, observaram diferentes biótipos de *Klebsiella pneumoniae* em um mesmo material biológico. Estes autores encontraram mais de um biótipo de *K. pneumoniae* (avaliado no sistema *Analytical Profile Index* – API

20E) em 18 (31%) espécimes a partir da análise de cinco colônias obtidas da cultura original de cada espécime. Um outro exemplo importante foi descrito posteriormente por Maslow e colaboradores (1993). Estes autores isolaram duas amostras de *Klebsiella* a partir de um mesmo espécime de urina: uma capaz de produzir indol a partir do triptofano, o que sugeria a identificação da espécie como *Klebsiella oxytoca*, e outra sem essa capacidade de produção do indol, o que conduziu à identificação de *K. pneumoniae*. Entretanto, ambas as amostras pertenciam a um mesmo genótipo, avaliado por ribotipagem e PFGE. Através da utilização de uma sonda obtida pela clonagem do operon triptofanase de *Escherichia coli*, os autores concluíram que uma subpopulação da amostra de *Klebsiella* havia sofrido uma mutação no gene que codifica o metabolismo do triptofano, produzindo uma linhagem com um biótipo variante.

Recentemente, David e colaboradores (2006) estudaram um surto policlonal (dois genótipos) de amostras de *Serratia marcescens* isoladas a partir de vários sítios de pacientes internados em uma UTI Neonatal no período de outubro 2001 a junho de 2002. Cada genótipo apresentava pigmentação e susceptibilidade aos antimicrobianos distinta. Neste mesmo estudo, duas amostras, morfologicamente diferentes, foram detectadas simultaneamente em líquido céfalo-raquidiano de uma das crianças. Estas amostras pertenciam a um mesmo genótipo definido por PFGE e RAPD entretanto, apresentavam susceptibilidade aos antimicrobianos distintos.

Infecção policlonal também foi descrita na tuberculose. Warren e colaboradores (2004), utilizando a técnica de PCR diretamente no espécime clínico, detectaram simultaneamente, duas cepas (Beijing e não - Beijing) de *Mycobacterium tuberculosis* em 35 (19%) de um total de 186 espécimes de escarro avaliados representando a múltipla infecção em 57% dos pacientes incluídos no estudo.

3 OBJETIVOS

O presente estudo foi elaborado com o objetivo geral de descrever a variedade das características fenotípicas e genotípicas em achados bacteriológicos de lavado bronco-alveolar (LBA) em pacientes com pneumonia.

Os objetivos específicos foram:

1- descrever a composição de fenótipos observados no perfil bioquímico (biótipo) e no perfil de susceptibilidade (fenótipo de resistência) aos antimicrobianos encontrados para cada espécie bacteriana isolada a partir do mesmo espécime clínico de LBA.

2- descrever a composição clonal (genótipo) encontrada para cada espécie bacteriana isolada a partir do mesmo espécime clínico de LBA através do emprego da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Definições de termos

Para maior clareza na descrição do presente estudo, apresentamos a seguir as definições utilizadas para alguns termos referentes às populações de bactérias estudadas.

- Espécime clínico: material obtido para exame, como por exemplo, LBA

- Amostra: microrganismo de uma espécie ou gênero obtido no cultivo do espécime clínico. Por exemplo, no cultivo de um espécime clínico de LBA pode haver crescimento de uma amostra de *P. aeruginosa* e de uma amostra de *Acinetobacter* spp.

- Subpopulações: colônias de morfologias idênticas obtidas no crescimento inicial (isolamento primário) de uma amostra. No presente estudo, por exemplo, foram estocadas em separado cinco subpopulações (quando disponíveis) de cada amostra obtida no cultivo do LBA. Num LBA do qual foram obtidas uma amostra de *P. aeruginosa* e de uma amostra de *Acinetobacter* spp. foi planejado o estoque de 5 subpopulações de *P. aeruginosa* (cinco colônias supostamente de *P. aeruginosa* de morfologias idênticas quando comparadas entre si) e cinco subpopulações de *Acinetobacter* spp. (cinco colônias supostamente de *Acinetobacter* spp. de morfologias idênticas quando comparadas entre si).

- Espécime Monomicrobiano: presença de um único microrganismo (uma amostra) obtido no cultivo do espécime clínico.

- Espécime Polimicrobiano: presença de mais de um microrganismo (uma amostra) obtido no cultivo do espécime clínico.

- Fenótipo: conjunto de resultados obtidos no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (fenótipo de resistência) ou em testes bioquímicos de identificação (biótipo) obtidos no processo do estudo de uma subpopulação.

- Biótipo: conjunto de resultados de testes bioquímicos obtidos no processo de identificação de uma subpopulação.

- Fenótipo de resistência: conjunto de resultados de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos obtidos para uma subpopulação.

- Genótipo: padrões de bandas apresentados pelas subpopulações incluídas dentro de um mesmo agrupamento (*cluster*) na análise computadorizada dos testes de PCR das subpopulações.

- Monoclonal: presença de um único genótipo em um conjunto de subpopulações.

- Policlonal: presença de mais do que um genótipo em um conjunto de subpopulações.

- Pneumonia tardia: ocorre em pacientes com mais de quatro dias de hospitalização.

- Pneumonia precoce: ocorre em pacientes nos primeiros quatro dias de hospitalização.

- Pneumonia hospitalar: inflamação distal dos pulmões causada por bactérias e associada aos cuidados com a saúde, ou seja, ausente no ato da admissão no hospital ou na admissão em outro local de internação da mesma instituição quando transferido.

- Pneumonia comunitária: inflamação distal dos pulmões causada por bactérias e não pode ser associada aos cuidados com a saúde.

4.2. Desenho do estudo

O presente estudo é descritivo, transversal, sobre 222 subpopulações obtidas de 46 amostras consecutivas de bacilos Gram-negativos identificados como agentes bacterianos de 33 espécimes de LBA detectadas em 27 pacientes com pneumonia atendidos no HUCFF durante o período compreendido entre outubro/2002 e março/2003 (6 meses), conforme apresentado na tabela 1. Foram avaliadas características bioquímicas utilizadas na identificação bacteriana, resultados de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e genótipos determinados por técnica de PCR-fingerprinting. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUCFF (Anexo I). Como a identidade dos pacientes foi preservada em todos os pacientes, foi dispensada a obtenção de Termo de Consentimento dos pacientes do estudo. Esta pesquisa não envolveu qualquer conflito de interesse, nem recebeu qualquer patrocínio.

Tabela 1. Agentes bacterianos associados à pneumonia segundo achados de LBA realizado em pacientes atendidos no HUCFF (outubro/2002 a março/2003)

Agentes etiológicos	Número de pacientes	%*
Pseudomonas aeruginosa	6	22,2
P. aeruginosa e *Serratia marcescens*	4	14,9
Acinetobacter sp	3	11,1
Klebsiella pneumoniae	3	11,1
Acinetobacter sp. e Pseudomonas aeruginosa	2	7,4
Enterobacter aerogenes	1	3,7
Enterobacter cloacae	1	3,7
Pseudomonas aeruginosa e Proteus mirabilis	1	3,7
Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella pneumoniae	1	3,7
Pseudomonas aeruginosa e *Citrobacter freundii*	1	3,7
Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter aerogenes*	1	3,7
Acinetobacter sp. e *Klebsiella pnemoniae*	1	3,7
Pseudomonas aeruginosa e *Klebsiella oxytocca*	1	3,7
Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella oxytocca e *C. freundii*	1	3,7
Total	27	100

*(sobre total de pacientes)

4.3. Ambiente do estudo

O HUCFF é um hospital universitário, terciário com aproximadamente 490 leitos ativos, atendendo a pacientes internados e ambulatoriais da rede pública de saúde. Apresenta-se dividido em diversas enfermarias clínicas e cirúrgicas e cinco UTIs com 32 leitos. População preferencialmente crônica, e incluindo transplantes de órgãos, inclusive pulmonar e hemodiálise.

4.4. População de estudo

4.4.1 Critérios de inclusão: pacientes apresentando diagnóstico clínico de pneumonia conforme critérios do CDC (2004) com coleta de LBA.

4.4.2 Critérios de exclusão: pacientes para os quais tenha ocorrido perda de amostras obtidas de cultura de LBA devido à contaminação ou crescimento inferior a 10^4 UFC/ mL. Amostras que não foram identificadas como agente bacteriano associado à pneumonia estão excluídas da caracterização genotípica e amostras de bactérias Gram-positivas.

4.5. Coleta do espécime clínico

O LBA foi colhido de acordo com o protocolo estabelecido pelo Serviço de Pneumologia do HUCFF, segundo indicação dos médicos assistentes. O protocolo para a coleta do LBA envolve as seguintes etapas: anestesia local; entrada do broncoscópio através do tubo oro-traqueal (TOT); encaminhamento do aparelho no brônquio correspondente ao local de condensação ou onde tenha maior quantidade de secreção;

lavagem do local com seis alíquotas de 20mL de soro fisiológico, sendo a primeira desprezada e recolhendo-se o restante.

4.6. Processamento do espécime clínico

A cultura quantitativa foi realizada conforme o método adotado como rotina do laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica (SPC) do HUCFF (Isenberg, 1998). Inicialmente, o espécime foi homogeneizado em agitador do tipo vórtex e semeado em placas de ágar sangue de carneiro a 5% (AS, Sanofi) e ágar chocolate (AC, Sanofi) utilizando-se alça calibrada de 0,001 mL. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C, sendo as placas de AC incubadas em atmosfera de 5% de $C0_2$ (método da vela). Após 48h, as culturas foram avaliadas quanto ao crescimento obtido, selecionando-se colônias de morfologia distintas para processamento de identificação da espécie e susceptibilidade aos antimicrobianos.

4.7. Ficha de dados clínicos

Para cada paciente incluído no estudo foram anotados dados demográficos e clínicos, obtidos por meio de revisão de prontuários. Os seguintes dados foram anotados em ficha própria (Anexo II): dados demográficos; diagnóstico da principal doença de base; datas da internação hospitalar, coleta do espécime clínico, uso de antimicrobianos durante a internação atual, antes da data da coleta do espécime clínico e a especificação do antimicrobiano;o uso TOT e ventilação mecânica (VM).

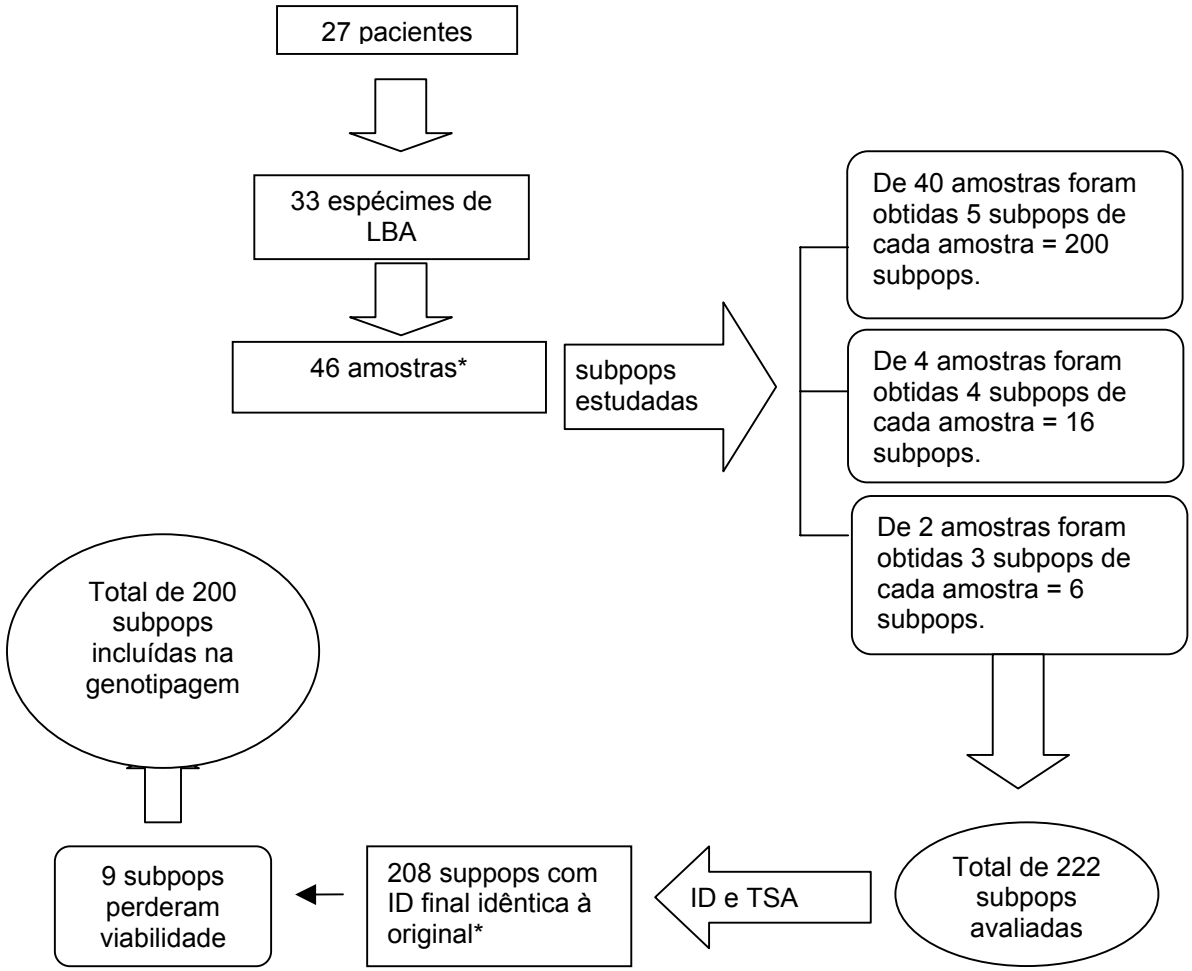
4.8. Amostras avaliadas

Dentre 51 LBA processados no Laboratório de Bacteriologia do SPC no período de outubro/2002 a março/2003, 38 (74,5%) apresentaram contagem significativa (superior ou igual a 10^4 UFC/ mL), e 33 (64,7%), que obtiveram crescimento de bacilos Gram-negativos, foram incluídos no presente estudo, perfazendo um total de 27 pacientes (quatro pacientes apresentaram mais de um LBA com contagem significativa). Os microrganismos isolados foram identificados no laboratório através do sistema Vitek® (BioMérieux, Hazelwood MO) de automação e avaliados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos conforme a padronização proposta pelo National Committe for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para o presente estudo, de cada morfologia colonial observada na placa com a cultura original, para cada bactéria incluída no estudo, foram selecionadas cinco colônias de morfologias semelhantes que tivessem gerado uma suspeita de se tratarem da mesma espécie, para realização de caracterização fenotípica e genotípica individual (Figura 1). Uma colônia (uma subpopulação) dentre as cinco obtidas para cada amostra foi avaliada inicialmente quanto às suas características morfo-tintoriais através do método de Gram e a produção da enzima citocromo oxidase. Em seguida, todas as colônias (subpopulações) de cada amostra foram armazenadas em caldo Brucella (CB, Difco) acrescido de glicerol a 10% e mantidas a -20°C até a realização dos testes bioquímicos, testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (incluindo pesquisa de ESBL para as enterobactérias e M*bla* para os BGNNFG e enterobactérias) e genotipagem.

Um total de 46 amostras incluindo 9 gêneros foram estudadas. De 40 amostras foram obtidas 5 subpopulações de cada amostra (formando um total de 200 subpopulações). De 4 amostras foram obtidas 4 subpopulações de cada amostra (total de 16 subpopulações). Finalmente, de 2 amostras foram obtidas 3 subpopulações de cada amostra (total de 6 subpopulações). Portanto, foram avaliadas 222 subpopulações das 46 amostras, das quais 208 tiveram identificação confirmada (identificação final idêntica à original). A identificação bioquímica final de 14 dentre 38 subpopulações isoladas a partir de 8 espécimes de LBA (obtidos de 7 pacientes) foi diferente da suspeita inicial. Porém, 9 subpopulações perderam a viabilidade após a realização de testes fenotípicos. Desta forma, nos testes de genotipagem foram incluídas as 199 subpopulações com identificação original confirmada. Além destas, uma susbpopulação adicional foi incluída na genotipagem, apesar de ter revelado identificação final discepante da original, porque pertencia ao mesmo gênero identificado originalmente. Na figura 1 encontra-se o fluxograma da seleção de subpopulações investigadas no estudo.

Figura 1: Esquema de seleção das subpopulações (subpops) investigadas no estudo



Legenda. ID: testes de identificação bacteriana; TSA: teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, ID final: identificação bacteriana obtida após avaliação das subpops; ID original; identificação bacteriana obtida no laudo do laboratório de Bacteriologia.
* Incluindo 9 gêneros.

4.9. Amostras-controle

Para o controle de qualidade dos testes realizados no presente estudo foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC®) ou cepas previamente caracterizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Infecções Bacterianas do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (LEMIB/IMPPG). As amostras de referência utilizadas incluíram *Escherichia coli* ATCC® 25922 e 35218, *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883 e 700603, *Raoultella terrigena* ATCC® 33257, *Raoultella planticola* ATCC® 33531, *Proteus mirabilis* ATCC® 7002 e *Morganella morganii* Fer228.

4.10. Caracterização fenotípica das subpopulações

Todas as amostras foram identificadas por meio de testes bioquímicos convencionais e características morfo-tintoriais de acordo com protocolos estabelecidos por Mac Faddin,1976, para as enterobactérias, e Koneman, 1997, para BGNNFG. Os testes incluíram a produção de citocromo oxidase; teste de fermentação de carboidratos (glicose e lactose) e produção de gás em meio de ágar tríplice açúcar-ferro (TSI); motilidade, produção de indol e produção de H_2S em meio ágar sulfeto-indol-motilidade (SIM); hidrólise da uréia; descarboxilação de aminoácidos (lisina, ornitina e arginina); produção de DNAse; desaminação da fenilalanina; utilização de citrato; testes de vias de metabolização da glicose (reação de Voges-Proskauer e Vermelho de metila). Para BGNNFG foram incluídos os testes de produção de hemólise em AS; produção de

DNAse, crescimento a 42°C (para *Pseudomonas*) e 44°C (para *Acinetobacter*); teste de via metabólica (OF glicose 1%) e o teste de motilidade por meio da gota pendente.

Testes adicionais foram realizados para bactérias dos gêneros *Klebsiella e Serratia,* que incluíram o teste de adonitol segundo o protocolo recomendado por Fisher e colaboradores (1989). Exclusivamente para *Klebsiella* foram realizados o teste de crescimento a 10ºC e de fermentação de L-sorbose (Edwards & Ewing, 1986) e assimilação de histamina e D-melezitose (Monnet & Freney, 1994). Esses testes foram importantes para diferenciar *Raoultella*. Exclusivamente para *Serratia* foram realizados os testes de utilização de D-sorbitol e L-arabinose, conforme protocolo de Farmer e colaboradores (1984) para definição da espécie.

Para a preparação do inóculo a ser utilizado nos testes de identificação, as amostras foram semeadas em placas de petri contendo AS através da técnica de esgotamento em superfície. Procedida à semeadura, as culturas foram incubadas a 35ºC, em aerobiose, por 24 horas.

4.10.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada através do método de disco-difusão (Kirby-Bauer, conforme recomendações do NCCLS (2004) e CLSI (2005 - 2007), exceto para polimixina que foi determinada a concentração mínima inibitória (CIM) de acordo com CLSI (2005). A produção de ESBL foi determinada através do teste de disco - aproximação para as enterobactérias (NCCLS, 2004 e CLSI, 2005 - 2007). As amostras de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias que se mostraram resistentes à ceftazidima pelo teste de disco-difusão foram analisadas

através do método de disco-aproximação para detecção da produção da enzima M*bla* (Arakawa *et al*, 2000).

4.10.2 Teste de disco-difusão

A partir de colônia cultivada em AS durante 24 horas a 35°C, foi realizada suspensão de cada amostra em salina fisiológica esterilizada, com turbidez equivalente à escala padrão de 0,5 de McFarland. Com o auxilio de um “swab”, as suspensões foram semeadas na superfície do meio de ágar Muller-Hinton (MHA, Merck), semeadas em três direções para obter um crescimento homogênio e confluente. Posteriormente, foram aplicados, com auxílio de uma pinça estéril, discos de papel de filtro impregnados com antimicrobianos (Cefar Diagnóstica LTDA) na superficie do ágar, com distância aproximada de 2,5 cm entre eles.

Antimicrobianos avaliados

Enterobactérias: amicacina, amoxacilina/ ácido clavulânico, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/ tazobactam e sulfametoxazol/ trimetoprim (NCCLS, 2004 e CLSI 2005 - 2007).

P. aeruginosa: amicacina, aztreonam, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/ tazobactam, polimixina e ticarcilina/ ácido clavulânico (NCCLS 2004 e CLSI 2005 - 2007).

Acinetobacter spp.: amicacina, ampicilina/ sulbactam, aztreonam, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem e sulfametoxazol/ trimetoprim (NCCLS, 2004 e CLSI 2005 - 2007).

Stenotrophomonas maltophilia: levofloxacina, minociclina e sulfametoxazol/ trimetropim (NCCLS, 2004 e CLSI 2005 - 2007).

Chryseobacterium spp.: amicacina, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem, piperacilina/ tazobactam, rifampicina, sulfametoxazol/ trimetropim e vancomicina (Kirby *et al*, 2004).

Os testes foram incubados a 35°C por 24 horas, e a interpretação dos halos de inibição foi realizada de acordo com as recomendações do NCCLS, 2004 e CLSI (2005 - 2007), com exceção da interpretação do halo obtido com o disco de polimixina para *P. aeruginosa*, que foi avaliado seguindo o protocolo sugerido por Gales e colaboradores (2001). Para controle de qualidade dos testes foram incluídas as cepas-padrão ATCC recomendadas (NCCLS, 2004 e CLSI 2005 - 2007).

4.10.3 Teste de detecção de produção de beta - lactamase de espectro ampliado

A detecção desta enzima foi realizada pelo método de dupla difusão, observando-se o sinergismo entre os antibióticos padronizados (Jarlier *et a*l, 1988). Uma placa contendo MHA foi inoculada com o auxílio de um ‘swab’ umedecido em uma suspensão bacteriana com padrão 0,5 da escala de McFarland. Após a semeadura, foi aplicado para as enterobactérias, no centro da placa, um disco de amoxicilina /ácido clavulânico, e dispostos ao seu redor, com distância de 20mm, discos de ceftazidima, aztreonam, cefotaxima e ceftriaxona. A leitura foi realizada após incubação a 35°C por 24 horas.

O teste foi considerado positivo quando observada uma ampliação do halo de inibição em algumas das cefalosporinas ou aztreonam, ou ainda, o aparecimento de uma zona de inibição entre o disco com inibidor e uma das drogas beta-lactâmicas.

4.10.4 Teste para produção de enzima metalo-beta-lactamase

A determinação da produção M*bla* foi realizada pelo método de disco-aproximação, proposto por Arakawa e colaboradores (2000). A partir de cultura foi feita uma suspensão em solução salina esteril, com turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland, que foi semeada em toda a superficie do meio MHA para obtenção de crescimento confluente. Foram aplicados dois discos de ceftazidima, separados por uma distância de 5cm entre eles, e um disco de papel de filtro foi colocado próximo a um dos discos de ceftazidima a uma distância centro a centro de 2cm. No disco não impregnado, foram aplicados 3µL de ácido 2-mercaptopropiônico P.A. (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.), um inibidor de M*bla* que possui a propriedade de bloquear a ação da enzima. As culturas foram incubadas a 35°C por 18 horas. Foi considerado positivo o surgimento ou um aumento do halo de inibição em torno do disco de ceftazidima próximo ao disco contendo o inibidor.

4.10.5 Teste de diluição em ágar e teste de difusão em gradiente de concentração

Todas as amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram resistência para imipenem foram submetidas ao teste de diluição em ágar e teste de difusão em gradiente de concentração para a polimixina.

Para a realização do teste de diluição em ágar, suspensões das amostras cultivadas em ágar nutriente durante 24 horas a 35ºC foram diluídas 1:10 em solução fisiológica estéril. O inóculo foi depositado com o auxílio de um replicador do tipo

“Steers” sobre a superfície de placas contendo MHA com concentrações crescentes de 0,5 a 32,0 µg/mL do antimicrobiano. As culturas foram incubadas por 24 horas a 35ºC.

As amostras submetidas ao teste de difusão em gradiente de concentração teste-E (AB Biodisk, Solna, Suécia) foram cultivadas em ágar nutriente durante 24 horas a 35ºC. Suspensões de cada amostra foram preparadas em solução fisiológica estéril até atingir turvação correspondente à da escala padrão 0,5 de McFarland, e semeadas com auxílio de “swab” na superfície do MHA. Fitas de teste-E foram aplicadas na superfície do ágar inoculado. Após incubação por 24 horas a 35ºC, a leitura do CIM foi realizada no ponto de inserção do crescimento microbiano com a fita de teste-E. As amostras de *Serratia* spp. e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controles de amostra resistente e susceptível, respectivamente.

4.11. Caracterização genotípica das subpopulações

A avaliação da diversidade genotípica foi efetuada através da técnica de PCR. Para as enterobactérias foi utilizado o ERIC-PCR com iniciador do tipo ERIC-2 (5’-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3), conforme protocolo adaptado de Pacheco e colaboradores (1997), exceto para amostras de *Serratia* spp e cinco subpopulações de *Enterobacter aerogenes*. Para estas últimas foi utilizado RAPD-PCR conforme protocolo de Mahenthiranlingam e colaboradores (1996) utilizando o iniciador 272 (5’-AGCGGGCCAA-3’). As subpopulações das bactérias não fermentadoras também foram avaliadas pela técnica de RAPD-PCR conforme protocolo adaptado de Mahenthiranlingam e colaboradores (1996) utilizando o iniciador 272 (para *P. aeruginosa)* e Grundmann e colaboradores (1997) utilizando o iniciador M13 (5’-

GAGGGTGGCGGTTCT-3') (para *Acinetobacter* spp.). Amostras–controle ATCC de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram utilizadas.

O DNA foi extraído por lise térmica (Pacheco *et al*, 1997) a partir de crescimento em meio Tripticase Soy broth (TSB, Difco), para *Pseudomonas* e *Serratia*, e crescimento em placa contendo Tripticase Soy agar (TSA, Difco), para *Acinetobacter* e demais enterobactérias. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25µL conforme descrito a seguir, sob as condições descritas na tabela 2.

- Iniciador ERIC-2: 20mM de Tris-HCl (pH 8,4); 3mM de $MgCl_2$ (Life Technologies); 100mM de cada dNTP (Life Technologies); 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies); 0,3mM de ERIC-2. A quantidade de DNA molde foi de 3,0µL.

- Iniciador 272: 20mM de Tris-HCl (pH 8,4); 3mM de $MgCl_2$ (Life Technologies); 250mM de cada dNTP; (Life Technologies); 5,0U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies) ; 25mM de 272. A quantidade de DNA molde foi de 3,0µL.

- Iniciador M13: 20mM de Tris-HCl (pH 8,4); 3mM de $MgCl_2$ (Life Technologies); 250mM de cada dNTP (Life Technologies); 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies) ; 5mM de M13. A quantidade de DNA molde foi de 2,0µL.

Tabela 2. Condição de amplificação e respectivos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Iniciador	Condições de amplificação
ERIC-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	Desnaturação inicial (94ºC/ 2min), 40 ciclos de 94ºC / 30s; 54ºC/ 1 min; 72ºC/ 4min.; extensão final 72ºC/ 1min.
272: 5'-AGCGGGCCAA-3'	Desnaturação inicial (94ºC/ 2min), 30 ciclos de 94ºC/ 1min; 36ºC/ 1min; 72ºC/ 2min; extensão final 72ºC/ 10min
M13: 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	Desnaturação inicial (94ºC/ 2min), 35 ciclos de 94ºC/ 20s; 50ºC/ 1min; 72ºC/ 20s; extensão final 72ºC/ 5min

Alíquotas de 10µL dos produtos de amplificação adicionados a 4µL de tampão de corrida foram aplicados em poços em gel de agarose a 1,5% e submetidos à corrida em tampão tris-borato EDTA sob corrente elétrica de 100 volts. O gel foi corado em brometo de etídio a 1µg/mL e fotografado sob transiluminador UV. Como padrão de DNA para corrida eletroforética foi utilizado 1 Kb DNA ladder para o primer ERIC-2 e 100 Kb DNA ladder para os demais.

A interpretação dos resultados foi realizada por inspeção visual e com o auxilio do programa GelCompar II versão 4.0 utilizando coeficiente Dice de similaridade e "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages" (UPGMA). Para a inspeção visual do perfil de bandas foram utilizados os seguintes critérios: (1) subpopulações com perfis de bandas idênticos entre si ou apresentando até duas diferenças foram incluídas

em um mesmo genótipo (que correpondeu a pelo menos 80% de similaridade no dendrograma); e (2) subpopulações apresentando mais do que duas diferenças no perfil de bandas foram incluídas em genótipos distintos (Gori *et a*l., 1996; Bois *et al*., 1999 e Manges *et al*., 2001).

4.11.1 Caracterização da presença do gene *bla*$_{spm}$

Para análise das amostras quanto à presença do gene *bla*$_{spm}$ que codifica a M*bla* SPM, foi realizada reação de PCR utilizando-se os iniciadores SPM, descritos por Gales e colaboradores (2003) (senso: 5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3'; antisenso: 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'). Os parâmetros da reação foram: 95ºC por 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95ºC por 1 min, anelamento a 40ºC por 1 min e extensão a 68ºC por 1 min. Os produtos da amplificação foram revelados por meio de eletroforese em géis de agarose a 0,8%, corados em brometo de etídio 1µg/mL e visualizados em um transiluminador U.V. (Gales *et al*., 2003). Como padrão de DNA para corrida eletroforética foi utilizado 100 Kb DNA ladder. Uma amostra de *P. aeruginosa* que contém o gene *bla*$_{spm}$ foi utilizada como controle positivo.

5 RESULTADOS

5.1 População de pacientes e LBA incluídos no estudo

No presente estudo, foram analisadas 222 subpopulações de 46 amostras de Gram-negativos isoladas de 33 espécimes de LBA obtidos de 27 pacientes atendidos no HUCFF (1 da emergência e 26 internados), no período de outubro de 2002 a março de 2003. No anexo III estão listadas as principais características destes pacientes. A média da idade dos pacientes foi de 60 anos, variando de 29 a 82 anos. Na tabela 3 é apresentada à distribuição dos pacientes por faixa etária.

Tabela 3. Distribuição dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a faixa etária

Faixa etária	Número (%) de pacientes
29-35	1 (3,7)
36-45	4 (14,8)
46-55	2 (7,4)
56-65	9 (33,3)
66-75	7 (26,0)
76-82	4 (14,8)

Com relação à localização no hospital, a maioria (70,3%) dos pacientes estava internada na UTI, UCC e na ECI. A distribuição da localização dos pacientes é apresentada na tabela 4.

Tabela 4. Distribuição da localização dos pacientes do estudo no HUCFF

Localização	Número e (%) de pacientes
UTI	13 (48,1)
UCC	3 (11,1)
ECI	3 (11,1)
UC	2 (7,4)
8D	2 (7,4)
7F	1 (3,7)
9C	1 (3,7)
9D	1 (3,7)
EMG	1 (3,7)

Legenda: UTI: Unidade de Tratamento Intensivo; UCC: Unidade Cardíaca; UC: Unidade Coronariana, ECI: Enfermaria de Cuidados Intensivos; 8D, 7F, 9C e 9D: Enfermarias; EMG: Emergência.

A maioria dos pacientes (96,2%) estava sob VM: somente o paciente que se encontrava na emergência não utilizou TOT e VM e o paciente do 9D utilizou somente TOT.

Dentre os 27 pacientes, 25 (93%) apresentavam pneumonia associada aos cuidados com a saúde, e um paciente tinha pneumonia comunitária. Não foi possível determinar o tipo de infecção no paciente atendido na emergência. Dentre os casos de pneumonia associada aos cuidados com a saúde, 25 (93%) ocorreram após quatro dias de internação e foram classificados como pneumonia tardia. Não foi possível classificar a infecção no paciente atendido na emergência.

Com relação ao uso prévio de antibióticos (antes da coleta do LBA), 25 (93%) pacientes usaram antibioticoterapia prévia, e um paciente não utilizou. Não foi possível determinar a utilização de antibióticos para o paciente atendido na emergência.

O exame de LBA foi realizado mais de uma vez em cinco (18,5%) dos 27 pacientes: dois LBA em quatro pacientes e três LBA em um paciente. No total de 33 exames de LBA incluídos no estudo, 20 (60,6%) apresentaram um microrganismo apenas e 13 (39,4%) revelaram crescimento polimicrobiano. *P. aeruginosa* foi o agente

mais freqüente entre as culturas monomicrobianas (50,0%) e polimicrobianas (92,6%). *Acinetobacter* spp. foi o segundo agente mais freqüente nas monomicrobianas (20,0%), e *Serratia marcescens* (38,5%) o segundo mais isolado nas polimicrobianas, obtido sempre junto com *P. aeruginosa*. Na tabela 5 são apresentados os microrganismos encontrados nos 33 LBA.

Tabela 5. Microrganismos encontrados em 33 LBA obtidos de pacientes do HUCFF entre outubro/02 e março/03.

Microrganismo	Número e (%) de LBA
LBA Monomicrobiano[a] (n: 20)	
Pseudomonas aeruginosa	10 (30,3)
Acinetobacter sp	4 (12,1)
Klebsiella pneumoniae	3 (9,2)
Enterobacter aerogenes	1 (3,0)
Enterobacter cloacae	1(3,0)
Proteus mirabilis	1(3,0)
LBA Polimicrobiano[b] (n: 13)	
Pseudomonas aeruginosa e *Serratia marcescens*	5 (15,2)
Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytocca	2 (6,1)
Pseudomonas. aeruginosa e Citrobacter. freundii	2 (6,1)
Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter sp.	1 (3,0)
Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella pneumoniae	1 (3,0)
Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter aerogenes*	1 (3,0)
Acinetobacter sp.e Klebsiella pnemoniae	1 (3,0)
Total	33 (100)

Legenda: a: Monomicrobiano: LBA com apenas um microrganismo; b: Polimicrobiano: LBA com mais de um microrganismo.

5.2 Caracterização fenotípica das subpopulações

Utilizando-se os testes bioquímicos previamente descritos, foram descritas 222 subpopulações das amostras incluídas no estudo. Em 8 espécimes de LBA (24,2%) obtidos de 7 pacientes ocorreram discrepâncias entre a identificação inicial do microrganismo e a identificação final definida para cada uma das amostras (14 subpopulações: 6,3% das 222). Dentre estas 8 amostras, 6 representavam microrganismo não-fermentador e apenas duas eram de fermentadores. Na tabela 6 são apresentadas estas discrepâncias.

Tabela 6: Descrição dos pacientes que tiveram isolamento de amostras com identificação final discrepante da original

Identificação original[a]			Identificação final[b]	
Código do paciente	Microrganismo	Número de subpopulações avaliadas[c]	Microrganismo	Número de subpopulações com a identificação indicada
7	*Pseudomonas aeruginosa*	5	*Pseudomonas aeruginosa*	4
			Chryseobacterim sp.	1
14	*Pseudomonas aeruginosa*	4	*Pseudomonas aeruginosa*	3
			Stenotrophomonas maltophilia	1
15	*Serratia marcescens*	5	*Serratia marcescens*	4
			Stenotrophomonas maltophilia	1
17	*Pseudomonas aeruginosa*	4	*Pseudomonas aeruginosa*	2
			Stenotrophomonas maltophilia	2
18	*Klebsiella oxytocca*	5	*Klebsiella oxytocca*	4
			Klebsiella pneumoniae	1
	Citrobacter freundii	5	*Citrobacter freundii*	3

			Acinetobacter sp.	2
22	*Pseudomonas aeruginosa*	5	*Pseudomonas aeruginosa*	2
			Stenotrophomonas maltophilia	3
27	*Enterobacter cloacae*	5	*Enterobacter cloacae*	2
			Serratia marcescens	3
Total de colônias discrepantes				14

Legenda a. Identificação original: identificação fornecida no laudo final do Laboratório de Bacteriologia Clínica. b. Identificação final: identifcação durante a realização do presente estudo após realização de testes bioquímicos para investigação de cada subpopulação. c. Os pacientes 14 e 17 tiveram perda de uma subpopulação cada.

Com relação à diversidade de biótipos, seis pacientes apresentaram variação no perfil bioquímico (tabela 7 e 8). Os testes de fermentação da lactose, produção de gás de glicose e utilização de citrato foram os que apresentaram variação dentre as enterobactérias em seis LBAs avaliados. Na tabela 9 são apresentados os pacientes com as devidas variações. Houve um predomínio de diversidade de biótipos em *S. marcescens*. Dentre os BGNNFG não ocorreu diversidade de biótipos.

Tabela 7. Resultados dos testes de identificação utilizados na diferenciação de 85 subpopulações de enterobactérias

Teste de Identificação	Número (%) de subpopulações com teste positivo						
	K. pneumoniae (total =26)	*K. oxytoca* (total = 9)	*S. marcescens** (total = 25)	*C. freundii* (total = 8)	*P. mirabilis* (total = 5)	*E. cloacae* (total = 2)	*E.aerogenes* (total = 10)
Oxidase	0	9 (100)	25 (100)	8 (100)	5 (100)	2 (100)	10 (100)
Fermentação da lactose	26 (100)	9 (100)	5 (20,8)[b]	8 (100)	0	2 (100)	10 (100)
Gás a partir de glicose	26 (100)	9 (100)	4 (16,7)[c]	8 (100)	5 (100)	2 (100)	10 (100)
Produção de H_2S	0	0	0	8 (100)	5 (100)	0	0
Produção de indol	0	9 (100)	0	0	0	0	0
Motilidade	0	0	25 (100)	8 (100)	5 (100)	2 (100)	10 (100)
Utilização de citrato	26 (100)	9 (100)	25 (100)	8 (100)	2 (40)[d]	2 (100)	10 (100)
Lisina descarboxilase	26 (100)	9 (100)	25 (100)	0	0	0	10 (100)
Ornitina descarboxilase	0	0	25 (100)	0	5 (100)	2 (100)	10 (100)
Arginina diidrolase	0	0	0	8 (100)	0	2 (100)	0
Fenilalanina desaminase	0	0	0	0	5 (100)	0	0
Vermelho de Metila	0	0	0	8 (100)	5 (100)	0	0
Voges-Proskauer	26 (100)	9 (100)	25 (100)	0	0	2 (100)	10 (100)
Produção de urease	26 (100)	9 (100)	0	0	5 (100)	0	0
Fermentação de adonitol	26 (100)	9 (100)	0	NR	NR	NR	NR
Produção de DNAse	0	0	25 (100)	0	0	0	0
Fermentação de L-sorbose	26 (100)	9 (100)	NR	NR	NR	NR	NR
Crescimento a 10ºC	0	9 (100)	NR	NR	NR	NR	NR
Assimilação de histamina	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
Assimilação de D-Melezitose	0	9 (100)	NR	NR	NR	NR	NR
Fermentação de D-sorbitol	NR[a]	NR	25 (100)	NR	NR	NR	NR
Fermentação de L-arabinose	NR	NR	0	NR	NR	NR	NR

Legenda: a . NR. Não realizado, b. três subpopulações de pacientes diferentes e duas subpopulaçãos do mesmo paciente; c. quatro subpopulações de pacientes diferentes, d. duas subpopulações do mesmo pacientes.
*Três subpopulações de *S. marcescens* não foram incluídas na genotipagem.

Tabela 8. Resultados dos testes de identificação utilizados na diferenciação de 137 subpopulações de BGNNFG[a]

Teste de Identificação	Número (%) de subpopulações com teste positivo			
	P. aeruginosa (total = 100)	*Acinetobacter* spp.* (total = 29)	*S. maltophilia** (total = 7)	*Chryseobacterium spp** (1 amostra)
Oxidase	100 (100)	0	0	1
Fermantação da lactose	0	0	0	0
Gás a partir de glicose	0	0	0	0
Produção de H_2S	0	0	0	0
Produção de indol	0	0	0	1
Motilidade (gota pendente)	100 (100)	0	7 (100)	0
Utilização de citrato	100 (100)	29 (100)	0	1
Lisina descarboxilase	0	0	7 (100)	0
Ornitina descarboxilase	0	0	0	0
Arginina diidrolase	100 (100)	29 (100)	0	0
Fenilalanina desaminase	0	0	0	0
Produção de urease	0	0	0	0
Produção de DNAse	0	0	7 (100)	1
OF glicose 1%	OX[b]	OX	OX	OX
Hemólise AS[d]	NR[c]	0	NR	NR
Crescimeto a 42°C	100 (100)	0	NR	NR
Crescimento a 44ºC	NR	29 (100)	NR	NR

Legenda: a. BGNNFG.Bastonete Gram-negativo não fermentador de glicose. b. OX. oxidativo c. NR. Não realizado, d. AS ágar sangue.
*Duas subpopulações de *Acinetobacter* spp e todas *S. maltophilia* e *Chryseobacterium* spp.não foram incluídos na genotipagem

Tabela 9: Pacientes com subpopulações apresentando diferentes biótipos

Código do Paciente	Microrganismo	Número de subpopulações avaliadas	Subpopulações com diversidade de biótipos	Testes com variação
8	*Serratia marcescens*	5	1	Lac[a]
11	*Serratia marcescens*	5	1	Gás[b]
15	*Serratia marcescens*	4	1	Lac
			1	Gás
22	*Serratia marcescens*	3	1	Lac
			1	Gás
28	*Serratia marcescens*	3	2	Lac
			1	Gás
17	*Proteus mirabilis*	5	2	CIT[c]

Legenda: a. LAC: fermentação da lactose; b. Gás: produção de gás a partir de glicose,
c. CIT: utilização de citrato.

Com relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, foram observados 80 (36%) fenótipos de resistência distintos na avaliação das 222 subpopulações. No anexo IV estão listados os perfis de susceptibilidade encontrados e a detecção de beta-lactamases. Dentre os 9 gêneros de microrganismos estudados, foram encontrados múltiplos perfis de resistência com predomínio de *P. aeruginosa* que apresentou 19 subpopulações (obtidas de 22 amostras) com múltiplos perfis de resistência e *K. pneumoniae* com 7 subpopulações (obtidas de 6 amostras) com múltiplos perfis de resistência. A freqüência de pacientes com múltiplos perfis de resistência está descrito na tabela 10. Susceptibilidade à polimixina foi detectada em todas as amostras de *P. aeruginosa.*

Tabela 10: Freqüência de múltiplos perfis de resistência

Microrganismo	Número de			
	Pacientes com o agente	Pacientes com MPR[a] (%)*	Subpops[b] avaliadas	Subpops com MPR (%)*
Pseudomonas aeruginosa	18	8 (44,4)	100	19 (19)
Acinetobacter sp	7	2 (28,5)	29	4 (13,7)
Klebsiella pneumoniae	6	2 (33,3)	26	7 (26,9)
Serratia marcescens	5	3 (60,0)	25	6 (24,0)
Citrobacter freundii	2	1 (50,0)	8	2 (25,0)
Enterobacter aerogenes	2	1 (50,0)	10	2 (20,0)
Enterobacter cloacae	1	1 (100)	2	2 (100)
Proteus mirabilis	1	1 (100)	5	2 (40,0)
Klebsiella oxytoca	2	0	9	0

Legenda: a. MPR: Múltiplos Perfis de Resistência observados no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos; b. Subpops: subpopulações.
*Os percentuais são calculados sobre os pacientes com o respectivo agente.

A produção de beta-lactamases foi investigada em 158 subpopulações. Produção de ESBL foi investigada em 85 (38,2%) subpopulações (20 amostras) de enterobactérias. Produção de M*bla* foi investigada em 26 (12%) subpopulações (7 amostras) de *P. aeruginosa*, 18 (8,1%) (4 amostras) de *Acinetobacter* sp. e 29 (13%) (7 amostras) de enterobactérias. ESBL foi detectada em 20 (9%) subpopulações de 4 amostras de enterobactérias obtidas de quatro espécimes de LBA de quatro pacientes, e M*bla* foi detectada em cinco (2,3%) subpopulações de uma amostra de *P. aeruginosa* obtida de um LBA. Em todas as cinco subpopulações, o PCR para a presença do gene $bla_{spm.}$ foi positivo. Na tabela 11 são apresentadas às amostras positivas para as beta-lactamases.

Tabela 11: Pacientes com microrganismos produtores de beta-lactamase

Código do Paciente	Número do LBA	Microrganismo	Número de subpopulações	*bla*
5	1	*Pseudomonas aeruginosa*	5	M*bla*
6	1	*Klebsiella pneumoniae*	5	ESBL
17	1	*Proteus mirabilis*	5	ESBL
19	1	*Enterobacter aerogenes*	5	ESBL
23	1	*Klebsiella pneumoniae*	5	ESBL
Total de subpopulações			25	

5.3 Caracterização genotípica das subpopulações

Um total de 200 subpopulações foi avaliado quanto à caracterização genotípica. Dentre as 22 subpopulações excluidas desta análise, 9 subpopulações não haviam apresentado crescimento, e 13 eram discrepantes com relação ao microrganismo identificado na cultura original, ou seja, do laudo obtido do laboratório de Bacteriologia. Entretanto, a amostra de número cinco (*K. pneumoniae*) do paciente 18, apesar de não ter sido isolada na cultura original, foi incluída nessa avaliação porque o microrganismo discrepante pertencia ao mesmo gênero do microrganismo original. Nesse caso, a subpopulação classificada como uma espécie diferente poderia representar apenas uma variação fenotípica de um mesmo genótipo, e não ser, em verdade, uma espécie diferente. O total de subpopulações avaliadas está demonstrado na tabela 12.

Tabela 12: Total de subpopulações incluídas na análise molecular

Microrganismos	Nº subpopulaçoes avaliadas (%)	Número de pacientes	Número de LBAs
Pseudomonas aeruginosa	94 (47,0)	17	22
Acinetobacter sp.	26 (13,0)	6	6
Klebsiella pneumoniae	26 (13,0)	6	6
Serratia marcescens	21 (10,5)	4	5
Enterobacter aerogenes	10 (5,0)	2	2
Klebsiella oxytoca	9 (4,5)	2	2
Citrobacter freundii	8 (4,0)	2	2
Proteus mirabilis	4 (2,0)	1	1
Enterobacter cloacae	2 (1,0)	1	1
Total	200 (100)		

De um total de 80 subpopulações de 20 amostras de enterobactérias estudadas, 54 foram avaliadas através da técnica de ERIC-PCR, 26 através do RAPD-PCR, (incluindo 21 subpopulações de *S. marcescens* e cinco de *E. aerogenes*). O tipo de iniciador selecionado para análise foi aquele que apresentou um perfil de bandas que permitisse maior facilidade de interpretação (Tenover *et al,* 1997). Todas as subpopulações de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* foram avaliadas por RAPD-PCR.

Para a análise dos agrupamentos, foram obtidos dendrogramas através do programa GelCompar II versao 4.0 utilizando o coeficiente Dice. Após as análises iniciais, observou-se que uma similaridade de ao menos 80% correspondia a uma diferença de até duas bandas, sendo esse critério adotado para definir os agrupamentos (*clusters*). Na figura 2 são apresentados exemplos dos perfis de bandas obtidos nos testes de PCR *fingerprinting*. Nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7 são apresentados os dendrogramas gerados para análise dos perfis de bandeamento.

No presente estudo, foram detectados 52 genótipos em 26 pacientes avaliados. As amostras do espécime clínico de LBA de 19 (73,1%) pacientes eram monoclonais, enquanto que de 7 (26,9%) pacientes eram policlonais, incluindo quatro amostras de *P. aeruginosa*, uma de *Acinetobacter* spp., uma de *K. oxytoca* e uma de *K. pneumoniae*,

descritos a seguir.

Dentre os 17 pacientes com amostras de *P. aeruginosa* (isoladas em 22 LBAs), foram obtidas quatro (18,2%) amostras (cada uma de um paciente) que apresentaram composição policlonal.

Dentre os 6 pacientes com amostras de *Acinetobacter* spp. (isoladas em 6 LBAs), foi obtida apenas uma (16,7%) com composição policlonal. Dois pacientes apresentaram LBA com o mesmo genótipo de *Acinetobacter*.

Dentre os 6 pacientes com amostras de *Klebsiella* sp (isoladas em 6 LBAs), foram obtidas duas (33,3%) amostras (cada uma de um paciente) que apresentaram composição policlonal. Um destes pacientes apresentou LBA com uma amostra de *K. pneumoniae* que incluía dois genótipos (Kp*b* e Kp*f*). O outro paciente apresentou LBA com uma amostra de *Klebsiella* que incluía quatro subpopulações de *K. oxytoca* (com dois genótipos: Ko*a* e Ko*b*) e uma subpopulação era *K. pneumoniae* (genótipo Kp*e*). Esses dados são apresentados na tabela 13, juntamente com os perfis de resistência das subpopulações discrepantes.

Dentre outros achados dignos de nota, ressaltamos o achado de 21 subpopulações de *S. marcescens* isoladas em cinco espécimes de LBA obtidos de quatro pacientes. Todas as 21 subpopulações foram incluídas em um único genótipo, sugerindo a ocorrência de transmissão cruzada deste microrganismo entre os quatro pacientes.

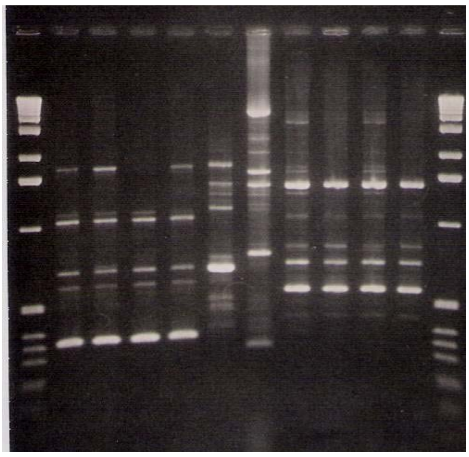
Tabela 13: Pacientes com subpopulações policlonais.

Código do paciente	Microrganismo	Nº de subpopulações	Genótipo	Perfil de resistência
1	*Acinetobacter* spp.	4	Ac*c*	0
		1	Ac*d*	Atm
7	*Pseudomonas aeruginosa*	2	Pa*d*	Ami Atm Caz Cip Cpm Gen Tim
		2	Pa*c*	Ami Atm Caz Cip Cpm Gen Tim
8	*Pseudomonas aeruginosa*	2	Pa*l*	Ami Atm Cip Cpm Gen Imp Mer Ptz Tim
		1	Pa*l*	Ami Atm Cip Gen Imp Mer Tim
		2	Pa*o*	Ami Atm Cip Gen Tim
14	*Pseudomonas aeruginosa*	1	Pa*c*	Ami Atm Caz Cip Cpm Gen Mer Tim
		1	Pa*m*	Ami Atm Cip Gen Tim
		1	Pa*u*	0
18	*Klebsiella oxytoca*	3	Ko*a*	0
		1	Ko*b*	0
	Klebsiella pneumoniae	1	Kp*e*	Cfl Cfo Ctx
21	*Pseudomonas aeruginosa*	4	Pa*s*	0
		1	Pa*q*	0
24	*Klebsiella pneumoniae*	4	Kp*f*	0
		1	Kp*b*	Cfl Cip Gen Sut

Legenda. 0: amostra susceptível a todos os antimicrobianos; Ami: amicacina, Atm: aztreonam; Caz; Ceftazidima, Cfl: cefalotina, Cfo: cefoxitina, Cip: ciprofloxacina, Cpm: cefepime, Ctx: cefotaxima, Gen: gentamicina, Imp: imipenem, Mer: meropenem, Ptz: piperacilina/tazobactam, Tim: ticarcilina/ác. Clavulânico.

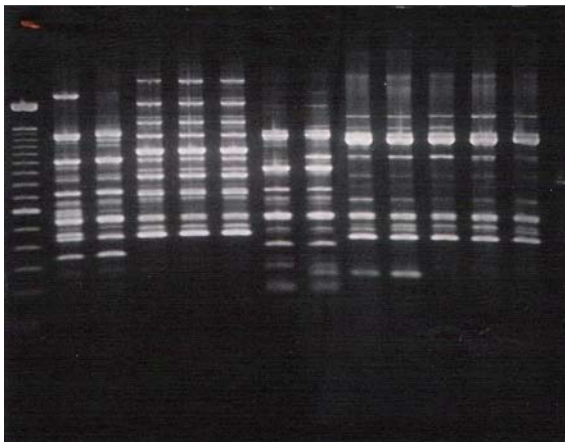
Figura 2: Figuras representativas dos padrões de bandas obtidos para enterobactérias, *P. aeruginosa*., *S. marcescens* e *Acinetobacter* spp.

M 31 32 33 34 35 C 36 37 38 40 M



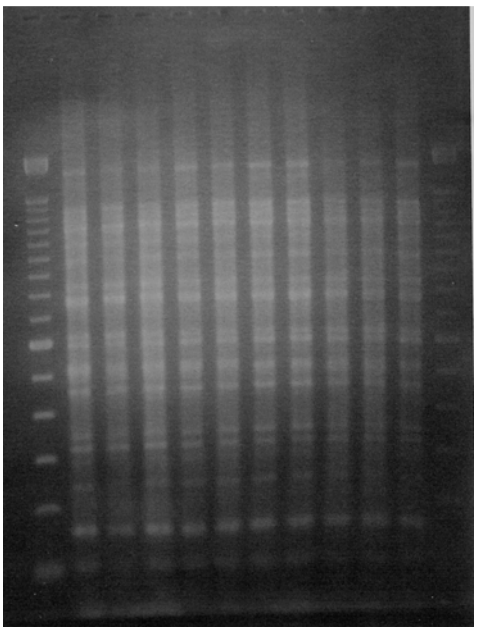
Legenda: M: marcador de peso molecular, 31 a 35 *Klebsiella pneumoniae* C: cepa ATCC, 36 a 40 *Proteus mirabilis*..

M C C 89 90 91 92 93 99 100 101 102 103 M



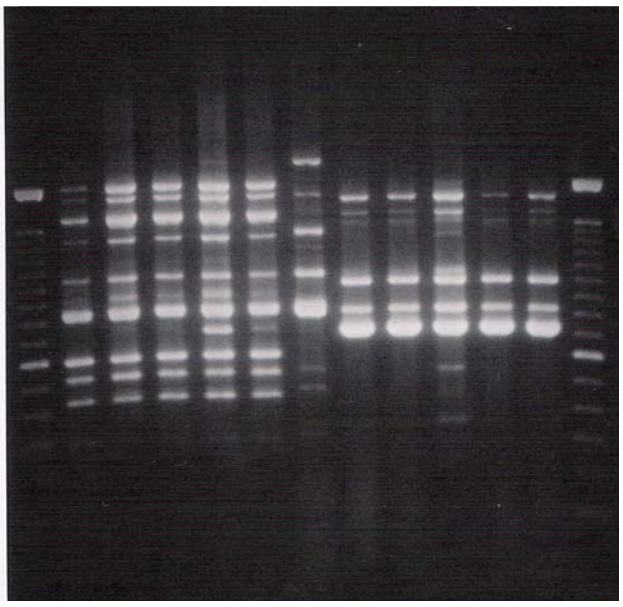
Legenda: M: marcador de peso molecular, C: cepa ATCC, 89 a 103 *Pseudomonas aeruginosa*.

M 41 42 43 44 45 46 53 47 48 52 M



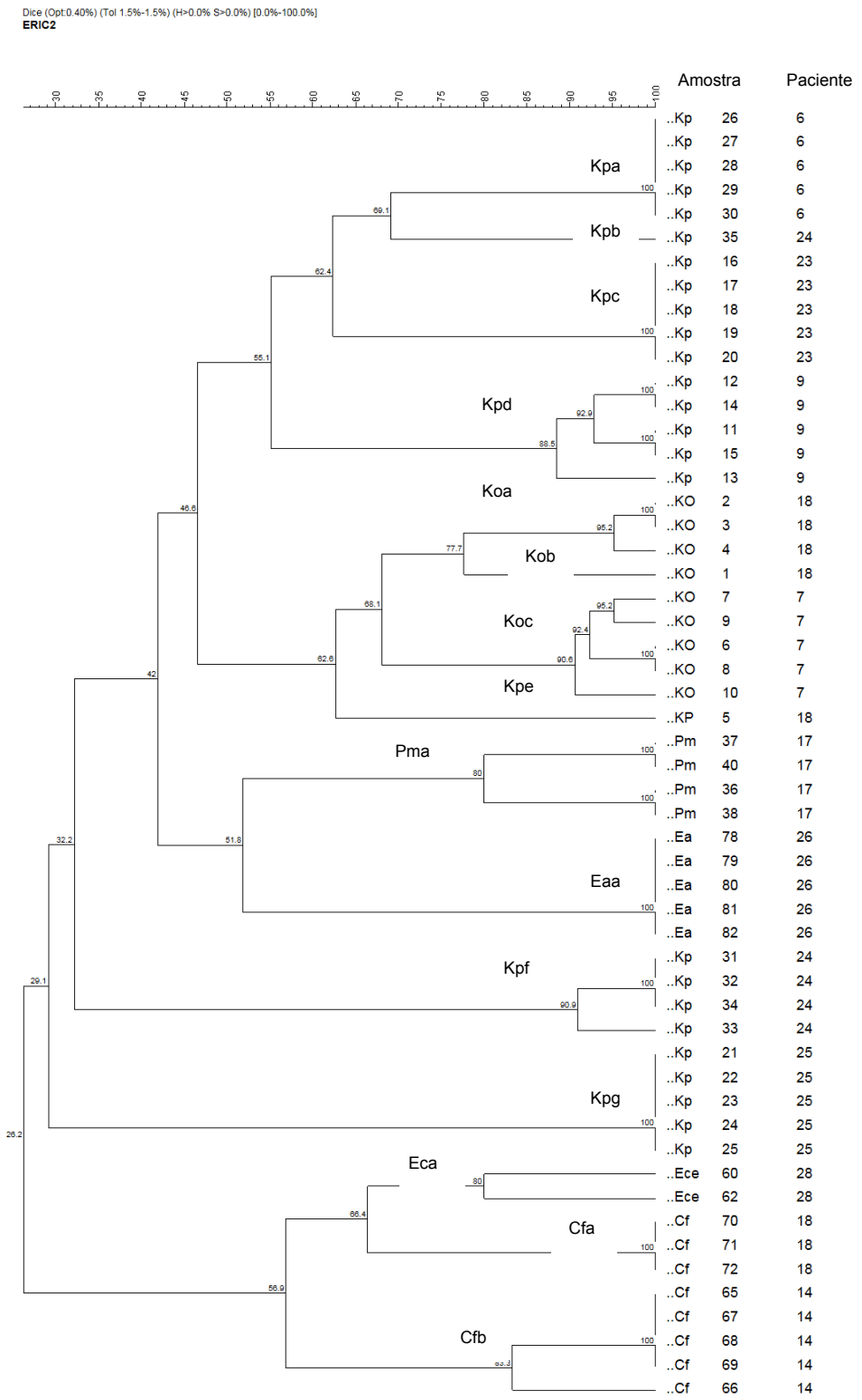
Legenda: M: marcador de peso molecular, 41 a 52 *Serratia marcescens*

M 188 189 190 191 192 C 193 194 195 196 197 M



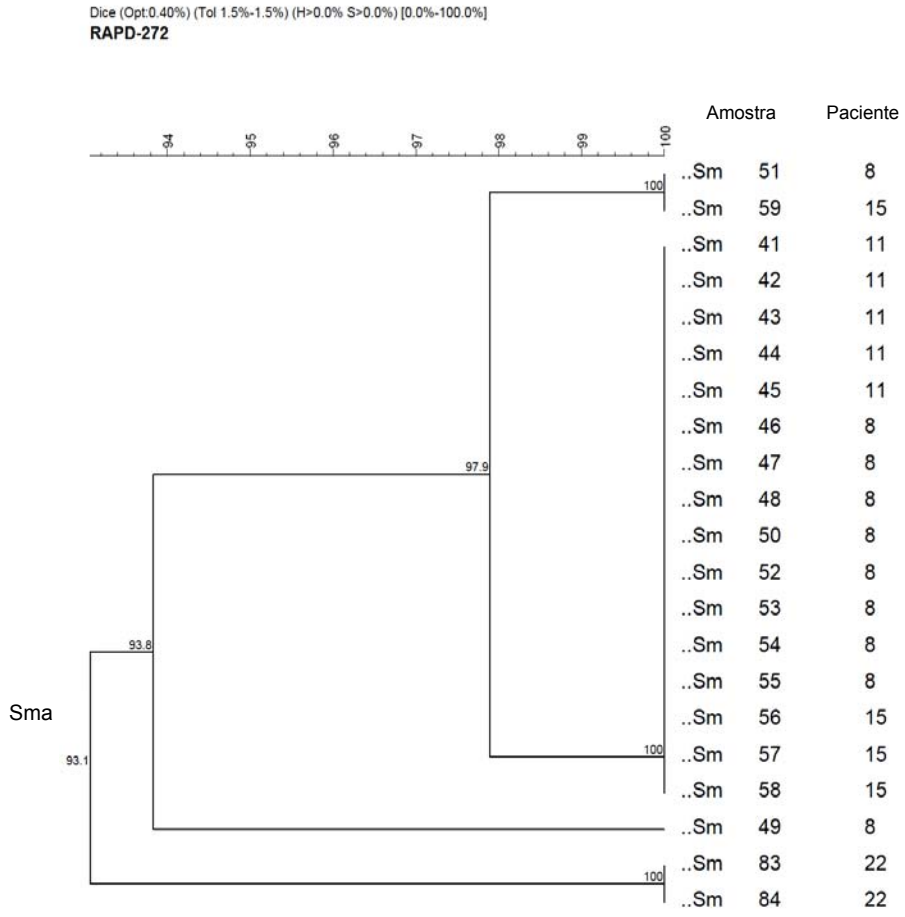
Legenda: M: marcador de peso molecular, 188 a 197 *Acinetobacter* spp. C: cepa ATCC.

Figura 3: Dendrograma das enterobactérias avaliadas pelo ERIC-PCR:



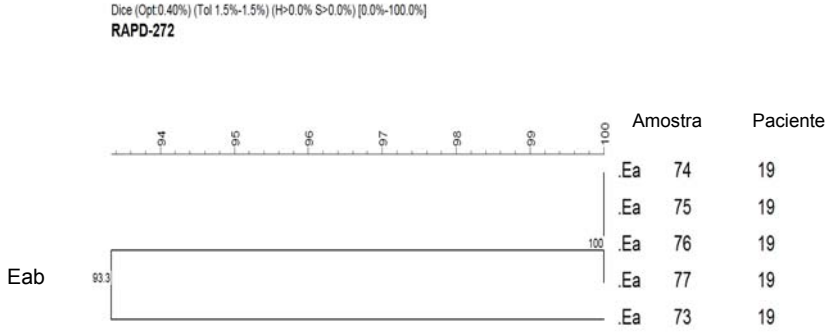
Legenda:Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Ko: *Klebsiella oxytocca*; Pm: *Proteus mirabilis*; Ea: *Enterobacter aerog*enes; Ec: *Enterobacter cloacae*; Cf: *Citrobacter freundii*.

Figura 4: Dendrograma das amostras de *S. marcescens* avaliadas pelo RAPD:



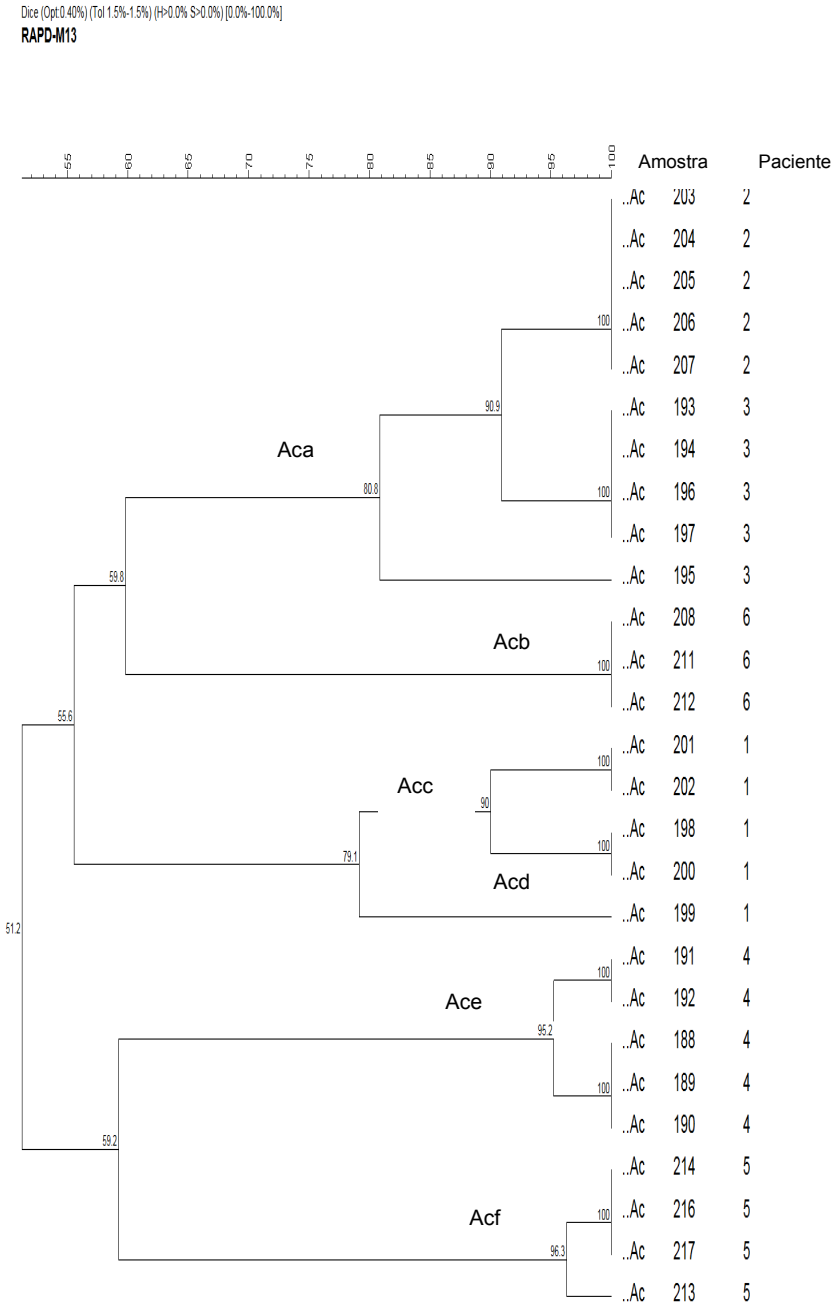
Legenda: Sm: *Serratia marcescens*.

Figura 5: Dendrograma das amostras de *E. aerogenes* avaliadas pelo RAPD:



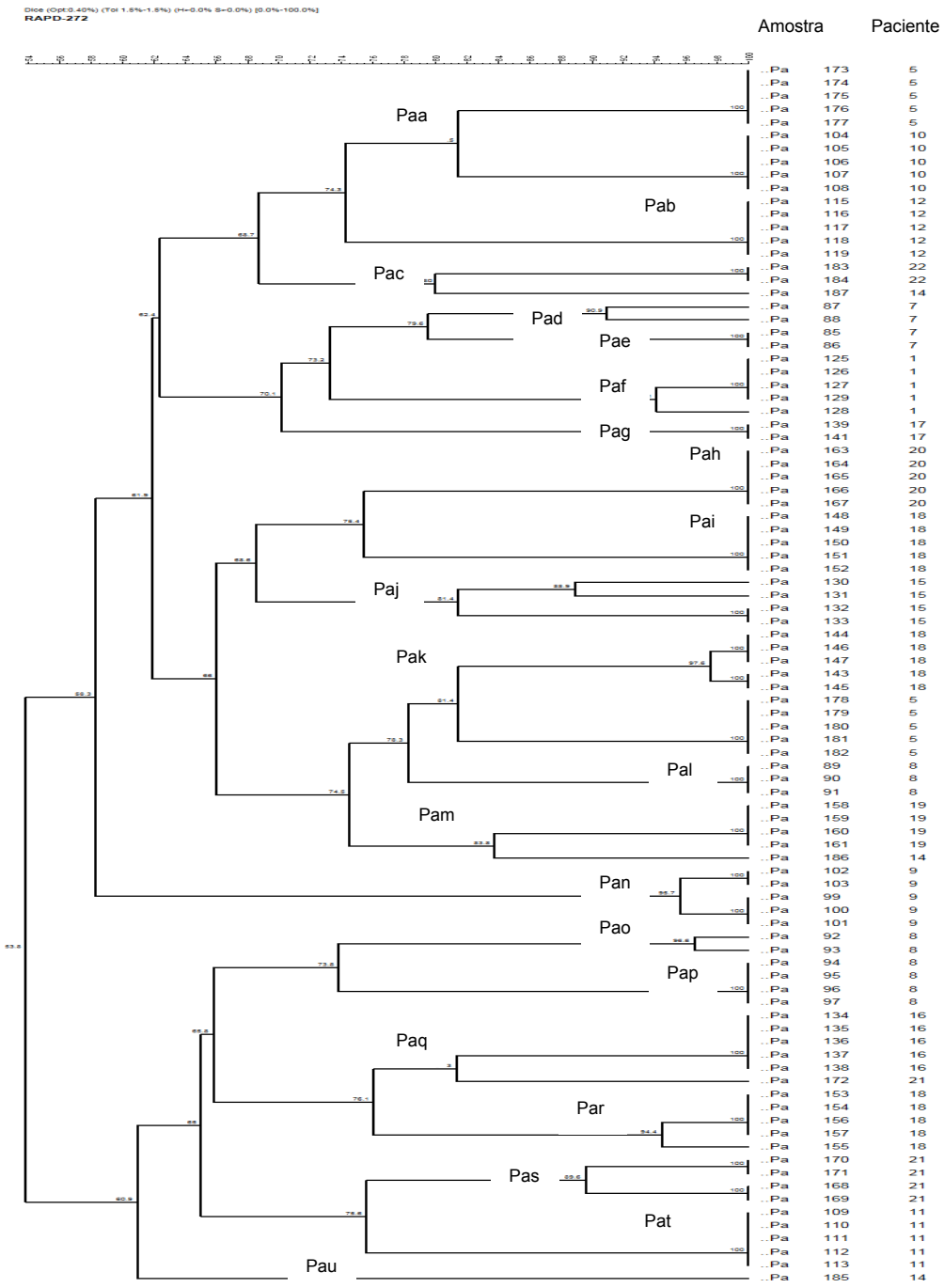
Legenda: Ea*: Enterobacter aerogenes*.

Figura 6: Dendrograma das amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas pelo RAPD:



Legenda: Ac: *Acinetobacter*.

Figura 7: Dendrograma das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas pelo RAPD



Legenda: Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

6 DISCUSSÃO

Com o surgimento das técnicas de biologia molecular, houve a possibilidade da sua utilização como instrumento de observação da diversidade entre os microrganismos por meio da análise de similaridades e diferenças no genoma. Assim, foi descoberto que algumas bactérias tradicionalmente classificadas num mesmo grupo, poderiam ser tão divergentes que necessitariam de reclassificação. Outras vezes, bactérias que pertencem ao mesmo grupo podem apresentar diversidade quanto às características fenotípicas como forma de adaptação ao ambiente em que se encontram, e não apresentar variação no genótipo. Até então, toda avaliação e classificação bacteriana era baseada apenas em critérios fenotípicos. Com o advento dos estudos moleculares, criou-se uma nova perspectiva. Por exemplo, em numerosos estudos relacionados a surtos, classicamente considerados monoclonais, ficou evidenciada a natureza policlonal (Magalhães, *et al* 2003; Damjanovic & Van Saene 2003; David, *et al* 2006). Além disso, a investigação da freqüência da diversidade de fenótipos e genótipos pode contribuir para uma re-avaliação dos procedimentos utilizados em microbiologia clínica, para informações adicionais em pesquisa de colonização e avaliação de re-infecções pelo mesmo microrganismo.

No presente estudo foram incluídos apenas os bacilos Gram-negativos, pois estes são os predominantes em LBA no HUCFF. A prevalência de bacilos Gram-negativos como agentes de pneumonia relacionada aos cuidados com a saúde no HUCFF (78%) é semelhante àquela observada em outros hospitais brasileiros (Sader, 2000). Segundo o Consenso Brasileiro de Pneumonias em Indivíduos adultos Imunocompetentes (2001), a média de idade, utilização de TOT e VM e

antibioticoterapia prévia são fatores que aumentam a suscetibilidade dos pacientes às pneumonias bacterianas. Dentre os pacientes avaliados no estudo podemos observar que aproximadamente 95% enquadram-se nesses critérios.

Em relação às culturas monomicrobianas, os microrganismos predominantemente encontrados nos LBAs foram *P. aeruginosa* (30,3%) e *Acinetobacter* spp. (12,1%), achados que estão de acordo com aqueles descritos para pneumonia tardia pela ATS (2005). Esses mesmos microrganismos têm sido freqüentemente encontrados no ambiente hospitalar. Entretanto, cada vez mais, é freqüente a presença de mais de um microrganismo como agentes etiológicos de uma infecção (Sader *et al*, 2001; Johanson & Dever, 2003). A identificação correta desses agentes pode influenciar diretamente no tratamento do paciente, principalmente devido à associação de *P. aeruginosa* e *S. marcescens*, relatada em quadros de pneumonias necrotizantes em pacientes imunodeprimidos (Konemann *et al,* 1997[b]). No presente estudo, 15,2 % dos LBAs polimicrobianos eram causados por associação desses microrganismos.

Apenas dois microrganismos apresentaram amostras com mais de um biótipo no mesmo espécime de LBA (*S*. *marcescens* e *P. mirabilis*). Porém, essa diversidade não influenciou no processo de identificação desses microrganismos. Os testes que revelaram variabilidade apresentam percentuais de variação já conhecidos: é sabido que *S. marcescens* apresenta uma positividade de 55% no teste de produção de gás a partir da fermentação da glicose e 2% no teste de fermentação da lactose, e *P. mirabilis* apresenta positividade de apenas 65% no teste de utilização do citrato como única fonte de carbono (Oplustil, *et al*., 2004).

Discrepância na identificação bioquímica final, realizada durante o presente estudo, e a identificação original (realizada a partir de uma única colônia, ou

subpopulação na rotina do Laboratório de Bacteriologia) foi encontrada entre amostras de 7 pacientes. Infelizmente, devido a limitações inerentes ao desenho do presente estudo, não podemos determinar se o microrganismo identificado na(s) subpopulação(ões) discrepante(s) encontrava(m)-se no LBA em contagem indicativa de pneumonia (>10^4 UFC/mL). Um potencial problema fica evidente com este achado: caso a colônia da subpopulação discrepante fosse a escolhida para a identificação inicial (no Laboratório de Bacteriologia) da espécie envolvida como agente etiológico da pneumonia, o diagnóstico microbiológico estaria comprometido. Porém, não podemos dimensionar este problema porque nem sempre uma colônia apenas é selecionada no processo de identificação rotineira do agente presente no LBA. Diferentemente do processo estabelecido para realização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, no qual é estabelecida a necessidade de se tocar em 3-5 colônias (CLSI, 2003), o número de colônias escolhidas para a realização dos testes bioquímicos de identificação é variável, na dependência do tamanho da colônia. Curiosamente, a maioria das amostras com identificação discrepante era de não-fermentadores (6 no total de 8 amostras). Esta observação provavelmente reflete a maior dificuldade de identificação deste grupo de microrganismos que apresentam colônias mais semelhantes entre si do que é observado entre as enterobactéiras.

Uma discrepância digna de nota foi aquela encontrada no paciente 18, no qual quatro subpopulações foram identificadas como *K. oxytoca* (indol positivo) e uma subpopulação como *K. pneumoniae* (indol negativo). Nos laboratórios de bacteriologia clínica o teste de indol, que pode apresentar variações, é o único utilizado para diferenciar essas duas espécies bacterianas encontradas. De fato, Maslow e colaboradores (1993) descreveram o achado de duas amostras de *Klebsiella,* sendo uma indol negativa e outra indol positiva, num mesmo espécime de urina. Os autores

investigaram estas duas amostras em análise molecular: detecção do operon da triptofanase por meio de sonda, ribotipagem e tipagem por PFGE. As duas amostras pertenciam a um mesmo genótipo, porém, foi observada uma mutação no gene que codifica o triptofano na amostra que apresentava reação negativa para indol, o que alterava o resultado fenotípico. Entretanto, diferentemente, no presente estudo, a amostra que fora identificada como *K. pneumoniae*, além de não apresentar reação positiva para indol, teve sua identificação em espécie confirmada através de testes fenotípicos complementares, de acordo com os protocolos recomendados por Fisher e colaboradores (1989), Edwards & Ewing, (1986) e Monnet & Freney (1994), diferindo do estudo realizado por Maslow e colaboradores.

Considerando o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, *P. aeruginosa* apresentou maior número de amostras com resistência a múltiplas drogas, seguido de *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* sp. e *K. pneumoniae*. Estes resultados vêm de encontro com alguns estudos sobre bactérias multirresistentes. Por exemplo, Sader e colaboradores (2001), ao avaliar amostras de *P. aeruginosa* (n=158) em espécimes clínicos do trato respiratório inferior de pacientes com pneumonia encontraram altas taxas de resistência à maioria dos antimicrobianos testados para *P. aeruginosa.* Os antibióticos mais ativos foram a associação piperacilina / tazobactam (71,5% de sensibilidade) e o meropenem (69,0% de sensibilidade). Neste mesmo estudo, amostras de *Acinetobacter* spp. (n=68) e *Klebsiella* spp. (n=50) também apresentaram taxas elevadas de resistência. Para *Acinetobacter* spp. os carbapenemicos (imipenem e meropenem) mostraram-se os mais ativos (80,9%), seguido pela tobramicina, que inibiu apenas 39,7%. Já contra *Klebsiella* spp., o meropenem foi o antibiótico mais ativo (100% de sensibilidade), e *Serratia* spp.(n=21), que foi o microrganismo com menor predominância, apresentaram 100% de sensibilidade a cefepima e aos carbapenemicos

(imipenem e meropenem). Van Eldere (2003) avaliou 7.016 amostras de *P. aeruginosa* de 40 hospitais da Bélgica e Luxemburgo no período de abril a novembro de 1999. Este autor concluiu que a resistência nesse microrganismo a penicilinas, cefalosporinas, fluorquinolonas e aminoglicosídeos pode variar de acordo com a localização, mas o desenvolvimento rápido da resistência é comum em todos os lugares. Nóuer e colaboradores (2005), avaliando fatores de risco relacionados à infecção ou colonização por *P. aeruginosa* multirresistentes, identificou o uso prévio de determinados antimicrobianos (quinolonas e cefepima) como preditor de colonização ou infecção por *P. aeruginosa*. Outros estudos demonstram que amostras clínicas de *Klebsiella* spp. são freqüentemente multirresistentes, com uma proporção crescente daquelas produtoras de ESBL (Livermore, 1995; Podschun & Ulmann, 1998; Sader *et al.*, 2004).

No presente estudo, policlonalidade foi detectada em 7 pacientes: quatro pacientes com *P. aeruginosa*, um paciente com *K. oxytoca*, um paciente com *K. pneumoniae* e um paciente com *Acinetobacter* spp. Dentre os 7 pacientes com policlonalidade, também foi observada a presença de diferenças no perfil de resistência em 4 pacientes. Portanto, apenas dois pacientes que apresentaram diversidade clonal não tinham diversidade quanto ao perfil de resistência, demonstando uma correlação entre genótipo e fenótipo quando levado em consideração o perfil de resistência.

Segundo Berdal e colaboradores (2006), em um estudo para avaliar a dinâmica da colonização das vias aéreas em pacientes em uso de VM, observou-se a existência de correlação entre os microrganismos encontrado no LBA com contagem significativa (10^4 UFC/mL), traqueal e orofaringe, com predominio da monoclonalidade nas enterobacterias (exceto dois clones de *P. mirabilis*) e BGNNFG. Considerando-se o presente estudo, encontramos um predomínio da policlonalidade em BGNNFG (*P. aeruginosa*), diferentemente do estudo acima citado. Um outro estudo avaliou a

colonização do trato digestivo (Moustaoi, *et al* 2004) por enterobacterias produtoras de ESBL (14 *K. pneumoniae*, 10 *E. coli* e 5 *C. diversus*), em pacientes de UTI cirúrgica para avaliar o método de disseminação dessas amostras. Esse estudo, detectou através da técnica de PFGE a presença policlonal das *Klebsiellas* (9 genótipos), *E. coli* (4 genótipos) e *C diversus* (2 genótipos). Análise do perfil do plasmídeo de produção de ESBL, demonstrou que 7 amostras das 14 amostras de *Klebsiella* apresentavam o plasmídeo (quatro plasmídeos diferentes), três plasmídeos foram detectados em *E. coli* e dois em *C. diversus*. Nesse mesmo estudo pode correlacionar que uma das amostras de *E.coli* transferiu por conjugação o plasmídeo para as demais *E. coli* e para quatro das 7 *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Esse achado é interessante se levarmos em conta que *Klebsiella* foi o único gênero de enterobactéria avaliado no presente estudo que apresentou policlonalidade e que uma subpopulação em contato com outra que pode ser de um mesmo microrganismo ou não, pode transferir mecanismos de resistência.

Um fato curioso foi a presença de apenas um genótipo entre as amostras de *S. marcescens* obtidas em cinco LBAs de quatro pacientes, sugerindo a ocorrência de transmissão cruzada entre estes pacientes. Contaminação de broncosópio já foi descrita como fonte de infecção cruzada por este microrganismo entre pacientes (Kirschke, *et al* 2003) e pode ter ocorrido durante a realização do presente estudo. Entretanto, apenas dois destes pacientes estavam internados num mesmo local (UTI); os outros dois encontravam-se internados nos setores 8D e ECI. Outros estudos mais detalhados seriam necessários para uma melhor compreensão da dinâmica da transmissão destes microrganismos.

De forma semelhante, dois pacientes dentre 6 que apresentaram isolamento de *Acinetobacter* spp. apresentaram amostras de um mesmo genótipo. Um paciente

encontrava-se na emergência e o outro na UTI. Assim como para *S. marcescens*, estudos adicionais seriam necessários para determinar a origem deste genótipo.

A produção de M*bla* foi detectada em apenas uma amostra de *P. aeruginosa*. Em estudo realizado com amostras dos anos 1999-2000, uma elevada taxa de produção de M*bla* foi detectada em amostras de *P. aeruginosa* do HUCFF (Pellegrino *et al*., 2002).

Segundo Damjanovic e colaboradores (2005), em situação de stress uma população de microrganismo pode iniciar uma “hipermutação”, que corresponderia a uma mutação vigorosa com fins adaptativos e resultando em policlonalidade e contribuindo para multirresistência.

Estudos sobre a diversidade de fenótipos e genótipos tornam-se necessários para a avaliação da população de microrganismos importantes na microbiologia clínica, sejam eles membros da microbiota ou causa de infecção. É possível que o uso de antibióticos, e até mesmo as dificuldades de implementação de medidas de controle de infecção, entre outros, sejam fatores.

Em resumo, na população de 27 pacientes investigada no presente estudo, um total de 15 (55,5%) pacientes apresentou identificação de espécies ou gêneros bacterianos diferentes daqueles originalmente observados e/ou variação nos fenótipos de resistência nas subpopulações bacterianas presentes no espécime estudado para diagnóstico microbiológico de pneumonias. A presença destas discrepâncias e variações pode gerar falhas graves no laudo microbiológico, que poderiam tornar o exame microbiológico numa ferramenta inadequada para guiar o tratamento antimicrobiano. Por outro lado, os microrganismos de um total de 7 (26,9%) pacientes apresentaram variação nos genótipos encontrados em um mesmo espécime. A presença desta variação pode resultar em dificuldades na tipagem de cepas durante a investigação de surtos. Estudos com maior número de pacientes e em outros espécimes

clínicos são necessários para investigar melhor o fenômeno da diversidade e avaliar se os achados do presente estudo são relacionados apenas a espécimes respiratórios ou estão presentes em outros espécimes clínicos ou associados a microrganismos específicos.

7 CONCLUSÕES

- Um total de 22,2% dos pacientes apresentou diversidade de biótipos.
- Múltiplos perfis de resistência foram observados em 41,6% dos pacientes.
- Diversidade clonal no LBA foi observada em 26,9% dos pacientes.
- Esta diversidade correspondeu a diferentes perfis de susceptibilidade, principalmente em *P. aeruginosa.*
- Porém, 11 (42,3%) pacientes apresentavam diversidade de fenótipos de resistência sem diversidade clonal.
- Um total de 4 (15,3%) pacientes apresentavam diversidade de fenotipos de resistência associada a diversidade clonal.
- Por outro lado, 2 (7,7%) pacientes apresentavam diversidade clonal, porém sem variação no fenótipo de resistência.
- Estudos sobre diversidade (fenótipos e genótipos) são necessários para avaliação de amostras de microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, E.P. & Chain, E. (1940). “An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.” Reproduzido em 1988, Rev. Infect. Dis., 10:677-8.

American Thoracic Society Documents (2005). "Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia." Am J Respir Crit Care Med 171(4): 388-416.

Arakawa, Y., N. Shibata, et al. (2000). "Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds." J Clin Microbiol 38(1): 40-3.

Baraibar, J., H. Correa, et al. (1997). "Risk factors for infection by Acinetobacter baumannii in intubated patients with nosocomial pneumonia." Chest 112(4): 1050-4.

Baselski, V. S. and Wunderink, R. G. (1994). “Bronchoscopic diagnosisi of pneumonia”. Clin. Microbiol. Rev. 7(4): 533-558.

Behar, P., Kader, I.T.A.; et al (2001). “Extended spectrum β-lactamase (ESBL) detection in *Klebsiella pneumoniae* isolates in large hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXI, 2001, Foz do Iguaçu – PR – Brasil. Resumos. Rio de Janeiro: Armazém das Letras Gráfica e Editora Ltda, p.141.

Berdal, J. E., Bjornholt, J. et al (2006) “Patterns and dynamics of airway colonization in mechanical-ventilated patients”.Clin Microbiol Infect. 13:476-480.

Bonnet, R.; Sampaio, J.L.; et al (2000a)“A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil”. Antimicrob. Agents Chemother 44:3061-8.

Bonnet, R.; Sampaio, J.L.; et al (2000b). “A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. Antimicrob“. Agents Chemother., 44:1936-42.

Bonnet, R.; Dutour, C.; et al (2001). “Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 to Gly“. Antimicrob. Agents Chemother., 45:2269-75.

Bois, C.; Davin-Regli, et al (1999). “Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone”. J. Clin. Microbiol., 37:2165-9.

Bradford, P.A. (2001). “Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat”. Clin. Microbiol. Rev., 14:933-51.

Bush, K.; Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. (1995). “A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure”. Antimicrob. Agents Chemother., 39:1211-33.

CDC (1997) Center for Diseases Control. Atlanta, Georgia. “Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia”. MMWR 46:1-80.

CDC (2004) Center for Diseases Coltrol. Atlanta, Georgia. “Guidelines for preventing health-care associated pneumoniae – 2003. MMWR 53(RR03): 1-36

Céspedes, C., B. Said-Salim, et al. (2005). "The clonality of Staphylococcus aureus nasal carriage." J Infect Dis 191(3): 444-52.

Chastre, J., Fagon, J. Y., et al (1988). “Diagnosis of nosocomial bacterial pneumonia in intubated patients undergoing ventilation: Comparation of the usefulness of bronchoalveolar lavage and the protected specimen brush.” Am. J. Med. 85:499-506

Chastre, J., J. L. Trouillet, et al. (1998). "Nosocomial pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med 157(4 Pt 1): 1165-72.

Cipriano, R.; Da Fonseca, E. L.; Soares, M. G. A.; Moura, M. C. L.; Vieira, V. V.; Vicente, A. C. P.. (2007) “Recurrent infections caused by Pseudomonas aeruginosa strains in a unique patient”. Am. J. Infect. Control 35(1):69-71.

Clinical and Laboratory Standars Institute. (2005) “Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test”. 25ed. Approved standars: M100 – S15 CLSI / NCCLS, Wayne, Pensylvania.

Clinical and Laboratory Standars Institute. (2006) “Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test”. 26ed. Approved standars: M100 – S16 CLSI / NCCLS, Wayne, Pensylvania.

Clinical and Laboratory Standars Institute. (2007) “Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test”. 27ed. Approved standars: M100 – S17 CLSI, Wayne, Pensylvania.

Consenso Brasileiro de Pneumonias em Indivíduos adultos Imunocompetentes (2001). J. Pneumol. 25 (supl 1) S22-S41.

Damjanovic, V. and Van Saene, H. K. F. (2003). “Polyclonal outbreaks-more common than you expect.” Letters to the Editor. J. Hosp. Infect. 76-77.

David, M. D., Weller, T. M. A., et al (2006). “An outbreak of *Serratia marcescens* on the neonatal unit: a tale of two clones”. J. Hosp. Infect. 63: 27-33.

de Silva, M. I. and S. J. Rubin (1977). "Multiple biotypes of Klebsiella pneumoniae in single clinical specimens." J Clin Microbiol 5(1): 62-5.

Edwards, P.R. and Ewing, W.H. (1986). “Identification of *Enterobacteriaceae*”. 4th ed., New York: Elsevier Science Publishing Co.

Fagon, J. Y., J. Chastre, et al. (1989). "Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a

protected specimen brush and quantitative culture techniques." Am Rev Respir Dis 139(4): 877-84.

Farmer, J. J.III, and Davis, B. R. et al (1984). “Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaciae* isolated from clinical specimens.” J. Clin. Microbiol. 21:46-76.

Farmer, J. J. (1995). “Enterobacteriaceae: Introduction and Identification.” In: Murray’s Manual of Clinical Microbiology. 6ed. ASM Press. Washington DC. p. 438-449.

Fischer, R.; Penner, J.L.; et al. (1989). “Usefulness of trehalose fermentation and L-glutamic acid decarboxylation for identification of biochemically aberrant *Providencia stuartii* strains”. J. Clin. Microbiol., 27:1969-72.

Gales, A. C., Reis, A. O., et al (2001). “Contemporary assessment od antimicrobial susceptibility testing methods for polimyxin B and colistin: Review of available interpretative criteria and quality cintril guidelines.” J. Clin. Microbiol. 39 (1): 183-190.

Gales, A. C. Menezes, L. C., et al (2003). “Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-ß-lactamase.” J. Antimicrob. Chemother 52:699-702.

Garner, J. S. et al. (1988) “CDC definitions for nosocomial infections.” Am. J. Infect. Control. 16:128-140.

Gori, A., Espinasse, F. et al. (1996). “Comparison of pulsed-field gel eletrophoresis and bandomly amplifield DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum ß-lactamase-production *Klebsiella pneumoniae*”. J. Clin. Microbiol. 34:2448-2453.

Griffin, J. J. and Meduri, G. U. (1994) “New Approaches in the diagnosis of nosocomial pneumoniae”. In: Medical Clinics of North America. p. 1091-1111 .

Grundmann, H. J., Towner, K. J. et al (1997). “Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp.” J. Clin. Microbiol. 35(12): 3071-3077

Guimaraes, M. M. and J. R. Rocco (2006). "Prevalence of ventilator-associated pneumonia in a university hospital and prognosis for the patients affected." J Bras Pneumol 32(4): 339-46.

Gusmão, M. E. N., Dourado, MS. I., et al (2003). “Nosocomial pneumonia in the intensive care unit of a Brazilian university hospital: Na analysisi of the time span from admission to diseas onset”. Associ. Profess. Infect. Control Epidemiol. 32(4): 209-214.

Harris, A., Torres-Vieira, C. and Venkataraman, L. (1999). “Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*.” Clin. Infect. Dis. 28:1128-1133.

Isenberg, H. D. (1998). “Processing and interpretation of respiratory tract cultures”. In: Essential Procedires for Clinical Microbiology. ASM Press. Washington, DC. p. 77-80.

Jarlier V. *et al.* (1988) “*Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns”. Rev. Infec.s Dis., 10(4):867-878.

Johanson, W. G., Pierce, A. K., et al (1969). “Changing oropharyngeal flora of hospitalization patients”. N. Engl. J. Med. 281:1137-1140.

Johanson, W. G. and L. L. Dever (2003). "Nosocomial pneumonia." Intensive Care Med 29(1): 23-9.

Jones, R. N., Sader, H. S., et al (2003). “Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18.569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001)”. Int. J. Antimicrobiol. Agents 22: 551-556.

Jones, R. N. (1998). “Important and emerging ß-lactamases – mediated resistance in hospital based pathogens: The ampC enzymes”. Diag. Microbiol Infect Dis 31:461-466.

Kirby, J. T., Sader, H. S., et al (2004). “Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a Worldwide collection of Chryseobacterium spp.: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997 -2001)”.J. Clin. Microbiol. 42(1): 445-448.

Kirschke, D. L., Jones,T .F.,et al (2003). “Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens contamination associated with a manufacturing defect in bronchoscopes.” New Eng. J.Med. 348:214-220.

Koeman, M., Van der Ven, A.J.A. M., et al (2001). “Ventilator-associated pneumonia: recent issues on pathogenesis, prevention and diagnosis.” J. Hos. Infect. 49:155-162.

Koneman, E. W., Allen, S. D., et al. (1997). “The nonfermentative gram-negative bacilli”. In: Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Philadelphia Lippincolt. p. 253-309.

Koneman, E. W., Allen, S. D., et al. (1997)b. “Guidelines for the collection, transport, processing, analysis, and reporting of cultures from specific specimen sources”. In:Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Philadelphia Lippincolt. p. 121-131.

Levison, M. E. (2002). “Pneumonia, incluindo as infecções pulmonares necrosantes”. In: Harrinson’s Medicina Interna. 15th. McGraw Hill Press 2:1559-1569.

Lincopan, N.; McCulloch, J.A.; et al (2005). “First isolation of metallo-β-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil”. J. Clin. Microbiol., 43:516-519.

Liu, P. Y .F.; Lau, Y. J.; et al (1995). “Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods.” J. Clin. Microbiol., 33:1779-1783.

Loureiro, M.M.; Moraes, B.A.; et al (2001). “Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil”. Rev. Latinoam. Microbiol., 43:88-95.

Luna, M. C., Videla, A., et al (1999). “Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia”. Chest 116: 1075-1084

Livermore, D.M. (1995). “β-lactamases in laboratory and clinical resistance”. Clin. Microbiol. Rev., 8:557-84.

Mac Faddin, J.F. (1976). “Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria”. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 312p.

Magalhães, M., Doherty C., et al (2003). “Polyclonal outbreak of Burkholderia cepacia complex bacteraemia in haemodialysis patients. J. Hosp. Infect. 54:120-123.

Mahenthiralingam, E., Campebell, M. E. et al (1996). “Random amplifield polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolateds recovered from patients with cystic fibrosis. “J. Clin. Microbiol 34(5): 1129-1135.

Mandell, L. A. and G. D. Campbell, Jr. (1998). "Nosocomial pneumonia guidelines: an international perspective." Chest 113(3 Suppl): 188S-193S.

Manges, A. R., Johnson, J. R., et al (2001). “Widespread distribution of urinary tract infection caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clinal group. New Engl. J. Med. 345:1007-1013.

Martinez, M. B., Taddei, C. R. (2005). “Métodos de diagnóstico”. In: Trabulsis’s Microbiologia. 4ed. Atheneu. p. 117-125.

Martins, I. S., Pessoa-Silva, C. L. et al (2006). Endemic extended- spectrum ß-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at na intensive care unit: Risk factors for colonization and infection.” Microbial Drug Resist. 12(1): 51-58.

Martins, I.S. (2001). “Aquisição de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ß-lactamase de espectro estendido em pacientes admitidos no centro de terapia intensiva de um hospital universitário do Rio de Janeiro”. 2001. 98 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro.

Maslow, J. N., S. M. Brecher, et al. (1993). "Relationship between indole production and differentiation of Klebsiella species: indole-positive and -negative isolates of Klebsiella determined to be clonal." J Clin Microbiol 31(8): 2000-3.

Mendes, R. E., Castanheira, M., et al. (2006). “Metalo – ß- lactamases.” J. Bras. Patol. Med. Lab. 42(2): 103-113

Monnet, D.; Freney, J.; Brun, et al. (1991). "Difficulties in identifying *Klebsiella* strains of clinical origin". Zentralbl. Bakteriol., 274:456-64.

Moustaoui, N., Soukri, A et al. (2004) “Molecular biology of extended-spectrum ß-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* responsible for digestive tract colonization”. J. Hosp. Infect. 57:202-208.

National Committe for Clinical Laboratory Standards (2003) “Perfomance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests”, Approves standars: M2-A8 CLSI / NCCLS Wayne, Pensylvania.

National Committe for Clinical Laboratory Standards (2004) “Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test”. 24ed. Approved standars: M100 – S14 CLSI / NCCLS, Wayne, Pensylvania.

NNISS (2004). "National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-June 2004 issued October 2004." Am J Infect Control 38(8): 470-85.

Nouér, S. A. (2005). “Aspectos clínicos e fatores de ricos relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.” 2005. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro p.70-80.

Oliveira, S. M.; Fernandes, M. J. B.C. and Almeida, D. (2001). “Extended spectrum β-lactamase produced by *Klebsiella spp* from neonatal intensive care unit - a preliminary study”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXI, 2001, Foz do Iguaçu - PR - Brasil. Resumos. Rio de Janeiro: Armazém das Letras Gráfica e Editora Ltda, p.150.

Oplustil, C. P., Zoccoli, C. M. et al (2004). “Interpretação do crescimento na cultura primária e identificação de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos.” In: Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Ed. Sarvier. 2ed p.51.

Ordõnez, J. G. (2005). “Taxonomia Bacteriana.” In: Trabulsi’s Microbiologia. 4ed. Atheneu. p. 51-55.

Pacheco, A. B. F., Guth, B. E. C., et al (1997). “Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specifc clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans”. J. Clin. Microbiol. 35:1521-1525.

Pechère, J. C. and Joly, J. (1986). “Pneumonias agudas do adulto.” Pechère’s In: Como reconhecer, entender e tratar as infecções. 2ed. Andrei. p. 105-119.

Pellegrino, F. L., L. M. Teixeira, et al. (2002). "Occurrence of a multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil." J Clin Microbiol 40(7): 2420-4.

Pessoa-Silva, C.L.; Toscano, C.M.; et al (2002). “Infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Infantis in a neonatal unit” J. Pediatr., 141:381-7.

Pinner, R. W., S. M. Teutsch, et al. (1996). "Trends in infectious diseases mortality in the United States." Jama 275(3): 189-93.

Pruckler, J. M.; Mermel, L. A.; et al (1995). “Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations”. J. Clin. Microbiol., 33:2872-5.

Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). “Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens”. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11:349-52.

Quinn, J. P., Di Vincenzo, C. A. and Foster, J. (1987). “Emergence of resistance to ceftazidime during therapy for *Enterobacter cloacae* infections”. J.Infect. Dis. 155:942-947

Reimer, L. G. and K. C. Carroll (1998). "Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of lower respiratory tract infections." Clin Infect Dis 26(3): 742-8.

Rello, J., M. Gallego, et al. (1997). "The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia." Am J Respir Crit Care Med 156(1): 196-200.

Renders, N., Römling, U., et al (1996). “Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel eleteophoresis of DNA macrorestrinction fragments”. J. Clin. Microbiol. 34:3190-3195.

Richards, M. J., Edwards, J. R., et al (2000). “Nosocomial infections in combined medical -surgical intensive care units in the United State. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1:510 515.

Rossi, F. and Andreazzi, D. B. (2005). “Bacilos gram-negativos: Beta-lactamases.” In: Rossis’s Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma. Atheneu. p. 65-94.

Rouby,J. J., Laurent, P., et al. (1994). “Risk factor and clinical relevance of nosocomial maxillary sinusitis in the criticall ill. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 150(3):776-783.

Sader, H. S., A. C. Gales, et al. (2001)[a]. "Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program." Braz J Infect Dis 5(4): 200-14.

Sader, H. S., Mendes, R. E. et al. (2001)b. “Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from the lower respiratory tract of inpatients with pneumonia in Brazilian hospitals – Results from the SENTRY surveillance program, 1997 and 1998. “J. Pneumol. 27(2): 59-67.

Sader, H.S. (2000). “Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies”. Braz. J. Infec. Dis., 4:91-9.

Sader, H.S.; Jones, R.N.; Gales, A.C.; Silva, J.B.; Pignatari, A.C. & the SENTRY Participants Group (Latin America). (2004). SENTRY “Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001”. Braz. J. Infec. Dis., 8:25-79.

Schleupner, C. J. and D. K. Cobb (1992). "A study of the etiologies and treatment of nosocomial pneumonia in a community-based teaching hospital." Infect Control Hosp Epidemiol 13(9): 515-25.

Sharma, M., K. Riederer, et al. (2001). "Molecular analysis of coagulase-negative Staphylococcus isolates from blood cultures: prevalence of genotypic variation and polyclonal bacteremia." Clin Infect Dis 33(8): 1317-23.

Silbert, S., A. L. Barth, et al. (2001). "Heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa in Brazilian cystic fibrosis patients." J Clin Microbiol 39(11): 3976-3981.

Silva, C. H. P. M. (1999). “Infecções pulmonares.” In: Silva’s Bacteriologia: Um texto ilustrado. Eventos. p. 491-494.

Speich, R., M. Hauser, et al. (1998). "Low specificity of the bacterial index for the diagnosis of bacterial pneumonia by bronchoalveolar lavage." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17(2): 78-84.

Spencer, R. C. (1996). "Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15(4): 281-5.

Tablan, O. C., L. J. Anderson, et al. (1994). "Guideline for prevention of nosocomial pneumonia. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control and Prevention." Infect Control Hosp Epidemiol 15(9): 587-627.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D. and Goering, R.V. (1997). “How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists”. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 18:426-39

The Canadian Critical Care Trials Group (2006). “A randomized trial of diagnostic techniques for ventilation-associated pneumonia”. New England J.Med. 355(25): 2619-2630.

Torres, A., J. Puig de la Bellacasa, et al. (1989). "Diagnostic value of quantitative cultures of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheters in mechanically ventilated patients with bacterial pneumonia." Am Rev Respir Dis 140(2): 306-10.

Van Eldere, J., W. E. Peetermans, et al. (2000). "Polyclonal Staphylococcal endocarditis caused by genetic variability." Clin Infect Dis 31(1): 24-30.

Van Eldere, J. (2003). “Multicentre surveillance of Pseudomonas aeruginosa susceptibility patterns in nosocomial infections”. J. Antim. Chemoth. 51(2): 347-352.

Versalovic, J.; Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991). “Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes”. Nucl. Acids Res., 19:6823-31.

Vincent, J. L., D. J. Bihari, et al. (1995). "The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee." Jama 274(8): 639-44.

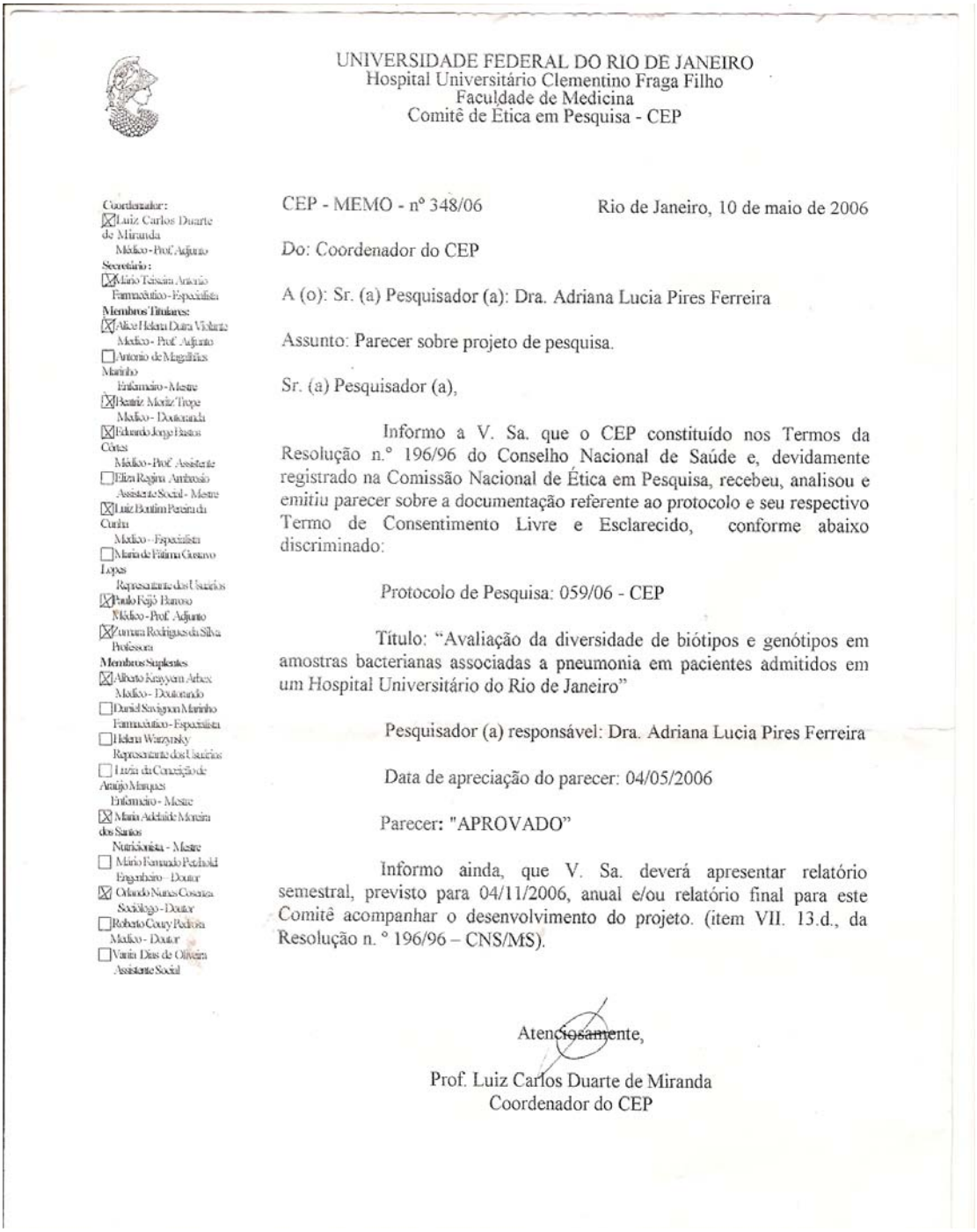
Warren, R. M., T. C. Victor, et al. (2004). "Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen." Am J Respir Crit Care Med 169(5): 610-4.

Wenzel, R. P. (1995). "The Lowbury Lecture. The economics of nosocomial infections." J Hosp Infect 31(2): 79-87.

Winn Jr., W. C.; Allen, S. D.; et al (2006). In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1535.

ANEXOS

Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:
☒ Luiz Carlos Duarte de Miranda
Médico - Prof. Adjunto
Secretário:
☒ Mário Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista
Membros Titulares:
☒ Alice Helena Dutra Vivante
Médico - Prof. Adjunto
☐ Antonio de Magalhães Marinho
Enfermeiro - Mestre
☒ Beatriz Moriz Trope
Médico - Doutoranda
☒ Eduardo Jorge Bastos Côrtes
Médico - Prof. Assistente
☐ Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre
☒ Luiz Botelho Pereira da Cunha
Médico - Especialista
☐ Maria de Fátima Gustavo Lopes
Representante dos Usuários
☒ Paulo Feijó Barroso
Médico - Prof. Adjunto
☒ Zuimara Rodrigues da Silva
Professora
Membros Suplentes
☒ Alberto Krayyem Arbex
Médico - Doutorando
☐ Daniel Savignon Marinho
Farmacêutico - Especialista
☐ Helena Warzynsky
Representante dos Usuários
☐ Lúcia da Conceição de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
☒ Maria Adelaide Moreira dos Santos
Nutricionista - Mestre
☐ Mário Fernando Prestold
Engenheiro - Doutor
☒ Orlando Nunes Cosenza
Sociólogo - Doutor
☐ Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor
☐ Vania Dias de Oliveira
Assistente Social

CEP - MEMO - nº 348/06 Rio de Janeiro, 10 de maio de 2006

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Adriana Lucia Pires Ferreira

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 059/06 - CEP

Título: "Avaliação da diversidade de biótipos e genótipos em amostras bacterianas associadas a pneumonia em pacientes admitidos em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro"

Pesquisador (a) responsável: Dra. Adriana Lucia Pires Ferreira

Data de apreciação do parecer: 04/05/2006

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 04/11/2006, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n. ° 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

Anexo II

Ficha Clínica:

1. Código de inclusão do paciente: _____ 2. Idade: _____ anos.

3. Data de Nascimento: ___/____/___ 4. Prontuário: _____.

5. Sexo: F ( ) 0 M ( ) 1

6. Data internação no HUCFF: ___/___/___ 6a: Localização: _____

---

7 Dados do LBA

7aColeta do LBA (1): ___/___/___ 7b: Localização: _____

7c: Microrganismo isolado: _____

7d Coleta do LBA (2):___/___/___ 7e Localização: _____

7f Microrganismo isolado: _____

7g Coleta do LBA (3): ___/___/___ 7h. Localização: _____

7i Microrganismo isolado: _____

---

8. Internação em outros setores do hospital antes da coleta do LBA? ( )Sim ( )Não

8a: Localização: _____8c: Localização: _____8e: Localização: _____

8b: admissão: __/___/__ 8d: admissão: __/___/__ 8f: admissão: ___/___/___

9: Motivo da internação em (6): _____

10: Doença de base principal: _____

10a. ( ) HIV 10c. ( ) DPOC 10e. ( ) DM

10b. ( ) TX (F/R/Pu/Pa/M) 10d. ( ) CA 10f ( ) neutropênico

Uso de: (relacionado ao LBA)

11. TOT ( ) 11a: Data do início: ___/___/___

12. VM ( ) 12a: Data do início: ___/___/___

13. NR ( )

14: Diagnóstico de pneumonia confirmado pelo médico? ( )Sim ( )Não

Tipo de Infecção:

15. Comunitária ( )

---

16. Hospitalar ( ) (Início dos sintomas após 48h de admissão)

17. Importado ( )

---

18. Antibioticoterapia antes do isolamento do LBA? ( )Sim ( ) Não

19. Tratamento antes do isolamento:

	Antibiótico	**Data do início**	**Data do término**
19a			
19b			
19c			
19d			

Anexo III Principais características dos 27 pacientes atendidos no HUCFF no período de outubro/02 a março/03

Código do Paciente	Idade	Sexo	TOT/VM[a]	Doença de Base	Tipo de Infecção	Localização[b]	Uso Atb. prévio	Data da Coleta	Microrganismo (número do LBA[c])	Número de: Colônias Estudadas	Número de: Código das Amostras
1	62	F	S/S	trauma hepático	H	UTI	S	18/11/02	*Acinetobacter* sp(1)	5	198 a 202
								28/12/02	*Pseudomonas aeruginosa(2)*	5	125 a 129
2	66	F	S/S	Pneumonia hospitalar	H	UTI	S	07/01/03	*Acinetobacter* sp	5	203 a 207
3	82	M	N/N	I	I	EMG	I	10/01/03	*Acinetobacter* sp	5	193 a 197
4	81	F	S/S	miocardipatia isquêmica	H	UTI	I	18/10/02	*Acinetobacter* sp	5	188 a 192
5	65	M	S/S	pneumonia	H	UTI	S	13/01/03	*Pseudomona. aeruginosa(1)*	5	173 a 177
									Acinetobacter sp(1)	4	213 a 217
								26/01/03	*Pseudomonas aeruginosa(2)*	5	178 a 182
6	41	M	S/S	mieloma múltiplo	H	UTI	S	28/10/02	*Acinetobacter* sp	3	208, 211 e 212
7	61	F	S/S	cirrose alcoólica	H	7F	S	16/10/02	*K.lebsiella pneumoniae*	5	26 a 30
									Pseudomonas aeruginosa	4	85 a 88
									*Chryseobacterium sp.**	1	00
									Klebsiella oxytocca	5	6 a 10
8	29	F	S/S	Neurotoxoplasmose e HIV	H	UTI	S	13/10/02	*Pseudomonas aeruginosa(1)*	5	89 a 93
									Serratia marcescens(1)	5	46 a 50
								21/10/02	*Pseudomonas aeruginosa(2)*	5	94 a 98
									Serratia marcescens(2)	5	51 a 52
9	77	M	S/S	úlcera duodenal	H	ECI	S	29/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	99 a 103
									Klebsiella pneumoniae	5	11 a 15
10	68	F	S/S	cardiomegalia	H	8D	S	17/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	104 a 108
11	62	M	S/S	cardiopatia (Chagas)	H	8D	S	22/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	109 a 113
									Serratia marcecens	5	41 a 45
12	73	F	S/S	volvo de sigmóide	H	UTI	S	24/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	115 a 119
13	57	M	S/S	pneumectomia	H	9C	S	21/01/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	120 a 124
14	57	M	S/S	AVE isquêmica	H	UTI	S	26/12/02	*Pseudomonas aeruginosa*	3	185 a 187
									*Stenotrophomonas maltophilia**	1	209
									Citrobacter freundii	5	65 a 69
15	44	M	S/S	síndrome anti-corpo anti-	H	ECI	S	26/11/02	*Pseudomonas aeruginosa*	4	130 a 133

Código do Paciente	Idade	Sexo	TOT/VM[a]	Doença de Base	Tipo de Infecção	Localização[b]	Uso Atb. prévio	Data da Coleta	Microrganismo (número do LBA[c])	Número de:	
										Colônias Estudadas	Código das Amostras
				fosfolipídeo							
									Serratia marcescens	4	56 a 59
									*Stenotrophomonas maltophilia**	1	210
16	76	F	S/N	aneurisma basilar	H	9D	N	10/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	134 a 138
17	75	F	S/S	tumoração	H	UC	S	18/12/02	*Proteus mirabilis(1)*	5	36 a 40
								29/01/03	*Pseudomonas aeruginosa(2)*	2	139 e 141
									*Stenotrophomonas maltophilia(2)**	2	140 e 142
18	66	M	S/S	I	H	UCC	S	25/11/02	*Pseudomonas aeruginosa(1)*	5	143 a 147
									Klebsiella oxytocca(1)	4	1 a 4
									*Klebsiella pneumoniae(1)**	1	5
								29/11/02	*Pseudomonas aeruginosa(2)*	5	148 a 152
									Citrobacter freundii(2)	3	70 a 72
									*Acinetobacter sp(2)**	2	215 e 218
								17/12/02	*Pseudomonasaeruginosa (3)*	5	153 a 157
19	70	F	S/S	trauma	H	UTI	S	03/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	158 a 162
									Enterobacter aerogenes	5	73 a 77
20	63	F	S/S	câncer de ovário	H	UTI	S	05/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	163 a 167
21	65	F	S/S	insuficiência renal	C	UTI	S	06/12/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	168 a 172
22	47	F	S/S	Pneumonia comunitária	H	UTI	S	20/11/02	*Pseudomonas aeruginosa*	2	183 a 184
									Serratia marcescens	3	83, 84 e 114
									*Stenotrophomonas maltophilia**	3	219 a 221
23	74	M	S/S	peritonite química	H	ECI	S	02/01/03	*Klebsiella pneumoniae*	5	16 a 20
24	42	M	S/S	insuficiência cardíaca	H	UC	S	18/11/02	*Klebsiella pneumoniae*	5	31 a 35
25	46	M	S/S	reticulite ulcerativa	H	UTI	S	07/11/02	*Klebsiella pneumoniae*	5	21 a 25
26	38	M	S/S	esternose mitral	H	UCC	S	26/12/02	*E.nterobacter aerogenes*	5	78 a 82
27	57	F	S/S	insuficiência mitral	H	UCC	S	24/01/03	*Enterobacter cloacae*	2	60 e 62
									*Serratia marcescens**	3	61, 63 e 64

Legenda: a.TOT/VM: tubo-oro-traqueal/ventilação mecânica; S/S: Sim/Sim; N/N: Não/Não; S/N: Sim/Não; b. H: hospitalar, c. comunitário, I: falta de informação, c. UTI:Unidade de tratamento intensivo; EMG: emergência; AMB: ambulatório,ECI: Enfermaria de cuidados intensivos;UC: unidade coronariana, UCC: Unidade, cardíaca,7F,8D, 9C e 9D: enfermarias; d: Atb.: antibiótico, e: LBA: lavado bronco-alveolar.

*Microrganismo não identificado na cultura original, portanto, não considerado como agente etiológico presente no LBA.

Anexo IV: Perfil de resistência e respectivos fenótipos dos microrganismos identificados em LBA de 27 pacientes.

Código do Paciente	Número do LBA[a] e Data da Coleta	Identificação	Número de colônias	Perfil de Resistência[b]	ßla[c]	Nº de fenótipos encontrados
1	1 – 18/11/02	*Acinetobacter spp*	4	0	-	2
			1	Atm Sut	-	
	2 – 28/12/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	Ami Cip Gen Atm	-	1
2	1 – 07/01/03	*Acinetobacter spp.*	5	Ami Atm Cip Cpm Sut Caz	-	1
3	1 – 10/01/03	*Acinetobacter spp.*	5	Ami Atm Cip Cpm Sut Caz	-	1
4	1 – 18/10/02	*Acinetobacter spp.*	5	Ami Gen Atm Cip Cpm Sut Caz	-	1
5	1 – 13/01/03	*Acinetobacter spp.*	2	0	-	2
			2	Atm	-	
		Pseudomonas aeruginosa	5	Ami Caz Cip Gen Imp Mer Cpm	M*bla*[d]	1
	2 – 26/01/03	*Pseudomonas aeruginosa*	3	Ami Cip Gen Atm	-	2
			2	Ami Cip Gen Tim Atm	-	
6	1 – 28/10/02	*Acinetobacter spp.*	3	Ami Gen Atm Cip Cpm Sut Caz	-	1
		Klebisiella pneumoniae	5	Cpm Caz Ctx Cfl Gen Ami Atm Sut Cip	ESBL[e]	1
7	1 – 16/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	4	Ami Caz Cip Gen Tim Cpm Atm	-	1
		Chryseobacterium sp.*	1	Ami Imp	-	1
		Klebsiella oxytocca	5	0	-	1
8	1 – 13/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	2	Ami Cip Gen Imp Ptz Tim Mer Cpm Atm	-	3
			2	Ami Cip Gen Tim Atm	-	
			1	Ami Cip Gen Imp Tim Mer Atm	-	
		Serrartia marcescens	3	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Sut	-	2
			2	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Sut Cip	-	
	2 – 21/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	4	Ami Cip Gen Atm	-	2
			1	Ami Cip Gen Tim Atm	-	
		Serratia marcescens	3	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Sut	-	2
			2	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Sut Cip	-	
9	1 – 29/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	Ami Caz Cip Gen Ptz Tim Cpm Atm	-	1
		Klebsiella pneumoniae	5	0	-	1
10	1 – 17/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	0	-	1
11	1 – 22/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	Ami Cip Gen	-	1
		Serratia marcescens	5	Cfo Cfl Amx Gen Ami Sut Cip	-	1
12	1 – 24/10/02	*Pseudomonas aeruginosa*	3	Ami Cip Gen Tim Cpm Atm	-	2

Código do Paciente	Número do LBA[a] e Data da Coleta	Identificação	Número de colônias	Perfil de Resistência[b]	ßla[c]	Nº de fenótipos encontrados
			2	Ami Cip Gen Tim Atm	-	
13	1 – 21/01/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	Ami Caz Cip Gen Imp Ptz Tim Mer Cpm Atm	-	1
14	1 – 26/12/02	*Pseudomonas aeruginosa*	1	Ami Caz Cip Gen Tim Mer Cpm Atm	-	3
			1	Ami Cip Gen Tim Atm	-	
			1	0	-	
		*Stenotrophomonas maltophilia**	1	0	-	1
		Citrobacter freundii	5	Cfo Cfl Amx Sut	-	1
15	1 – 26/11/02	*Pseudomonas aeruginosa*	3	Ami Caz Cip Gen Imp Tim Mer Cpm Atm	-	2
			1	Ami Caz Cip Gen Imp Ptz Tim Mer Cpm Atm	-	
		Serratia marcescens	4	Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Ptz Cip	-	1
		*Stenotrophomonas maltophilia**	1	0	-	1
16	1 – 10/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	5	0	-	1
17	1 –18/12/02	*Proteus mirabilis*	3	Ctx Cfl Gen Sut Cip	ESBL	2
			2	Cpm Ctx Cfl Gen Sut Cip	ESBL	
	2 - 29/01/03	*Pseudomonas aeruginosa*	2	Ami Caz Cip Gen Imp Ptz Tim Mer Cpm Atm	-	1
		*Stenotrophomonas maltophilia**	2	0	-	1
18	1 – 25/11/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	Tim Atm	-	1
		Klebsiella oxytocca	4	0	-	1
		*Klebsiella pneumoniae**	1	Ctx Cfo Cfl	-	1
	2 – 29/11/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	0	-	1
		Citrobacter freundii	2	Caz Cfo Cfl Amx	-	2
			1	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Atm	-	
		*Acinetobacter spp.**	2	0	-	1
	3 – 17/12/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	0	-	1
19	1 – 03/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	2	Ami Cip Gen Imp Mer	-	3
			2	0	-	
			1	Gen Imp Mer	-	
		Enterobacter aerogenes	3	Cpm Caz Ctx Cfo Cfl Gen Atm Ptz Cip	ESBL	2
			2	Cpm Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Atm Ptz Cip	ESBL	
20	1 – 05/02/03	*Pseudomonas aeruginosa*	4	Ami Cip Gen Imp Tim Mer Atm		2
			1	Ami Cip Gen Imp Tim Mer Cpm Atm		
21	1 – 06/12/02	*Pseudomonas aeruginosa*	5	0		1
22	1 – 20/11/12	*Pseudomonas aeruginosa*	2	Ami Cip Gen Tim Atm	-	1

Código do Paciente	Número do LBA[a] e Data da Coleta	Identificação	Número de colônias	Perfil de Resistência[b]	ßla[c]	Nº de fenótipos encontrados
		*Stenotrophomonas maltophilia**	2	Lvx Min	-	2
			1	0	-	
		Serratia marcescens	2	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Cip	-	2
			1	Caz Ctx Cfo Cfl Amx Gen Ami Sut Cip	-	
23	1 – 02/01/03	*Klebsiella pneumoniae*	1	Ctx Cfl Gen Ami Atm Ptz Sut Cip	ESBL	5
			1	Cpm Ctx Cfl Gen Ami Atm Ptz Sut Cip	ESBL	
			1	Cpm Caz Ctx Cfl Gen Ami Atm Ptz Sut Cip	ESBL	
			1	Caz Ctx Cfl Gen Ami Atm Ptz Sut Cip	ESBL	
			1	Cpm Caz Ctx Cfl Amx Gen Ami Atm Ptz Sut Cip	ESBL	
24	1 – 18/11/02	*Klebsiella pneumoniae*	4	0	-	2
			1	Cfl Gen Sut Cip	-	
25	1 – 07/11/02	*Klebsiella pneunoniae*	5	Sut	-	1
26	1 – 26/12/02	*Enterobacter aerogenes*	5	Cfo Cfl Amx	-	1
27	1 – 24/01/03	*Enterobacter cloacae*	1	Cfo Cfl Amx	-	2
			1	Cfo Cfl	-	
		*Serratia marcescens**	3	Cfl Amx	-	1

Legenda: a: LBA: Lavado bronco-alveolar. b: Perfil de resistência: Ver seção Material e Métodos para definição de antimicrobianos testados para cada grupo de microrganismos. Ami: amicacina,Amx: amoxacilina/ácido clavulânico, Atm: aztreonam,Caz:ceftazidima, Cpm: cefepima, Ctx: cefotaxima, Cfo: cefoxitina, Cfl: cefalotina, Cip: ciprofloxacina, Gen: gentamicina, Imp: imipenem, Lvx: levofloxacina, Min: minociclina, Mer: meropenem, Ptz: piperacilina /tazobactam, Sut: sulfametoxazol/trimetropim, Tim: ticarcilina/ácido clavulânico.. c: ßla: Beta-lactamase adquirida detectada; d: M*bla*: metalo -ß -lactamase detectada em bacilos gram negativos não-fermentadores e enterobactérias; e: ESBL: ß – lactamase de espectro estendido detectados em enterobactérias. *Microrganismo não identificado na cultura original, portanto, não considerado como agente etiológico presente no LBA.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo