



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Surto por *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao
imipenem nas Unidades de Terapia Intensiva/Adulto
de dois hospitais de Uberlândia-MG**

RENATA CRISTINA CEZÁRIO

UBERLÂNDIA
JULHO – 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Surto por *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao
imipenem nas Unidades de Terapia Intensiva/Adulto
de dois hospitais de Uberlândia-MG**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Renata Cristina Cezário

Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (orientador)

Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (co-orientadora)

UBERLÂNDIA
JULHO– 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C425s Cezário, Renata Cristina, 1975-
Surto por *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem em duas unidades de terapia intensiva de dois hospitais de Uberlândia / Renata Cristina Cezário. - 2008.
76 f. : il.

Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Infecção hospitalar - Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.98:615.478

Trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho, com auxílio financeiro da CAPES.

A Eletroforese em Campo Pulsado foi realizada no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini.

A pesquisa de proteínas de membrana externa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) da Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza.

*DEDICO ESTE TRABALHO COM
TODO AMOR E CARINHO AO MEU
ESPOSO ALEXANDRE, Á MINHA
MÃE NEUSA, MEU PAI
ANTÔNIO E MINHAS IRMÃS
ANA PAULA E PATRICIA PELO
APOIO E COMPREENSÃO
DURANTE ESTA CAMINHADA*

“...cada cientista tem a obrigação de expor-se para, no final, enriquecer-se com as críticas ou reconhecimentos de seus pares”

HAGUETTE, 1992

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelos pais que me deste, pela saúde e sabedoria para discernir o caminho certo;

Ao meu esposo pela amizade, carinho e companheirismo;

Aos meus pais pelo apoio, esforço, carinho, amizade;

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho pela paciência, dedicação e doutrina;

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini pelo apoio, colaboração, dedicação e paciência;

A Profa Dra. Maria Aparecida de Souza, Profa. Dra. Janethe D. Penna e ao Prof. Dr. Fábio Oliveira pela colaboração e dedicação;

Ao Prof. Geraldo Mello pela convivência e ensinamentos;

Às minhas amigas Cristiane, Dariana, Denise, Dayane, Helisângela, Karinne, Lilian, Lizandra, Rosineide e por dividirem comigo todos os momentos desta jornada;

À Joseane Cristina, Izabel Cristina (LEBEM) e Patrícia de Castilhos (BIOMOL) pela colaboração e amizade;

Aos colegas do laboratório: Juliana, Elias, Michel, Gláucio, Rodolfo, Renan, Alexandre, Cristiano, Luís Fernando, Monik, Daiane, Marcília, Jaqueline, Ana Paula pela convivência;

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do ARIMP, Claudete, Ricardo e Samuel, pela amizade;

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do HC-UFU, Tomás, Léa, Graça pela amizade e colaboração para que este fosse desenvolvido;

Ao Neto, Lucileide e Jorge pela amizade e paciência.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARIMP/UFU= Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia

BHI= “Brain Heart Infusion”

CI= “Confidence Intervals”

ESBL= “Extended-Spectrum β -lactamases”

HC-UFU= Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

HSC= Hospital Santa Catarina

IH= Infecções Hospitalares

MBL= Metalo- β -lactamase

MHA= “Muller Hinton Agar”

MHB= “Muller Hinton Broth”

MPA= “ 2-mercaptopropionic acid”

NNIS= “Nosocomial Infection Surveillance”

NPRS= “Nosocomial Pathogens Resistance Surveillance”

OR= “Odds Ratio”

PAV= Pneumonia associada à ventilação mecânica

PFGE= “Pulsed-field gel electrophoresis”

SDS-PAGE= Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

UFC/mL= Unidade Formadoras de Colônias por mililitro

UTI= Unidade de Terapia Intensiva

TSA= “Trypticase Soy Agar”

TSB= “Trypticase Soy Broth”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição temporal de pacientes infectados por <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem internados na UTI de adulto do hospital B, no período de novembro/03 a setembro/04.	23
Figura 2. Frequência dos fenótipos AmpC induzido, MLB-EDTA e MBL-MPA em isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem de pacientes internados no hospital B.	24
Figura 3. Distribuição temporal dos pacientes infectados por <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem internados na UTI de adulto do hospital A, no período de outubro/2003- outubro/2005.	26
Figura 4. Progressão dos casos de infecção por <i>P. aeruginosa</i> resistente a imipenem em função da relação especial/temporal na UTI de adulto no hospital A, no período de outubro/2003 a setembro/2005. Letras maiúsculas após os casos de infecção indicam o perfil clonal da linhagem de <i>P. aeruginosa</i> pela análise em PFGE	28
Figura 5. Frequência das amostras de <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem produtora de AmpC induzida, MBL-EDTA e MBL-MPA.	30
Figura 6. Análise eletroforética das proteínas da membrana externa das amostras de <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem	31
Figura 7. Resultado do dendrograma de uma análise computadorizada dos perfis do crDNA de <i>P. aeruginosa</i> em PFGE	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados por <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem internados na UTI do hospital B	22
Quadro 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados por <i>P. aeruginosa</i> internados na UTI do hospital A	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Infecções por <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem nos pacientes internados na UTI de adultos no hospital A e B, durante os períodos de novembro/03 a setembro/04 (B) e novembro/03 a julho/05 (A)	21
Tabela 2. Perfil de resistência de isolados de <i>P. aeruginosa</i> nos pacientes internados na UTI de adultos do hospital A, no período de novembro/03 a julho/05	29
Tabela 3. Prevalência de pacientes colonizados por <i>P. aeruginosa</i> na UTI de adultos do hospital A, durante o surto	32
Tabela 4. Contaminação de superfícies próximas aos pacientes colonizados/infectados por <i>P. aeruginosa</i> na UTI de adultos do hospital A	33
Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de colonização em pacientes e contaminação do ambiente no hospital A	33
Tabela 6. Análise univariada dos fatores de risco para infecções associadas à <i>P. aeruginosa</i> resistente a imipenem em pacientes da UTI de adultos do hospital A	34
Tabela 7. Análise multivariada de fatores de risco para aquisição de infecções associadas à <i>P. aeruginosa</i> resistente a imipenem em pacientes da UTI de adultos do hospital A	35
Tabela 8. Características epidemiológicas clássicas e moleculares dos 24 isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem proveniente de infecções em pacientes internados nos Hospitais A e B	37

SUMÁRIO

RESUMO	Xi
ABSTRACT	Xii
1-INTRODUÇÃO	1
2-JUSTIFICATIVA	7
3-OBJETIVOS	8
4-CASUÍSTICA E MÉTODOS	9
4.1-DESENHO DO ESTUDO	9
4.1.1-Hospitais e Unidades de Terapia Intensiva	9
4.1.2-Descrição do surto	9
4.1.3-Definições	
-Infecção hospitalar	10
-Pneumonia associada à ventilação mecânica	
4.1.4-Pesquisa de colonização nos pacientes e contaminação ambiental por <i>P. aeruginosa</i> na UTI de adulto do HC-UFU	10
4.2-TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	11
4.2.1-Coleta	11
4.2.2-Cultivo primário e identificação de <i>P. aeruginosa</i>	11
4.2.3-Estocagem	11
4.2.4-Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	12
4.2.4.1-Teste de Difusão em Agar	12
4.2.5-Detecção fenotípica de amostras produtoras de β -lactamases	12
4.2.5.1-Fenótipo de β -lactamases de espectro ampliado	12
4.2.5.2-Fenótipo AmpC induzida	13
4.2.5.3-Fenótipo Metallo- β -lactamase	14
4.3-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DA MEMBRANA EXTERNA	15
4.3.1-Extração das proteínas	15
4.3.2-Preparo e corrida do gel de poliacrilamida	16
4.4-TIPAGEM MOLECULAR	
4.4.1-Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE)	17
4.4.2-Extração do DNA genômico	17
4.4.3-Preparo do Gel de agarose	17
4.4.4-Eletroforese em Campo pulsado	18
5-ASPECTOS ÉTICOS da PESQUISA	19
6-ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
7-RESULTADOS	20
7.1-Surto por <i>P. aeruginosa</i> resistente ao imipenem em duas UTIs de adulto de dois hospitais de Uberlândia	20
7.2-Hospital Santa Catarina (B)	21
7.3-Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (A)	24
7.4-Pesquisa de resistência ao imipenem por mecanismo de perda de porina-análise das proteínas da membrana externa	30
7.5-Colonização de pacientes e contaminação ambiental por <i>P. aeruginosa</i> na UTI do hospital A	32
7.6-Investigação do surto por meio do estudo caso x controle no hospital	34
7.7-Análise do perfil de macrorestrição do crDNA de <i>P. aeruginosa</i> pela PFGE	35
8-DISCUSSÃO	38
9-CONCLUSÕES	46
10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
11-APENDICE	
11.1-Ficha infecção/colonização	63
12-ANEXOS	
12.1- Aprovação do Comitê de Ética	64

RESUMO

Foi investigado um surto por *Pseudomonas aeruginosa*, resistente ao imipenem quanto aos aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares, em duas UTIs mistas de adultos de dois hospitais de Uberlândia. No total, foram envolvidos 68 pacientes, 47 pacientes no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (A) e 21 no Hospital Santa Catarina (B), internados a partir de novembro/03 a julho/05, e setembro/04, respectivamente. Foi realizado um estudo caso-controle incluindo 47 pacientes infectados por *P. aeruginosa* (casos) e 122 pacientes internados no mesmo período sem infecção (controles), apenas no hospital (A), considerando dados demográficos, clínicos e epidemiológicos. As amostras de *P. aeruginosa* foram analisadas quanto ao espectro de resistência “in vitro” pela técnica de difusão em gel, a presença dos fenótipos: metalo- β -lactamase (MBL), AmpC induzida e presença de proteínas da membrana externa. Adicionalmente, foram realizadas culturas de ambiente e das mãos dos profissionais da unidade do hospital (A). O caso-índice identificado no hospital “A” correspondeu a uma paciente cirúrgica, transferida do hospital (B), sob ventilação mecânica, que desenvolveu pneumonia associada à ventilação (PAV) por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem. A relação temporal e espacial foi investigada para a maioria (94,0%) dos pacientes internados no hospital (A). Entre as infecções, as PAVs (77,0%) foram predominantes nas duas unidades. A maioria das amostras resistentes ao imipenem (94,0%) apresentou resistência aos outros antimicrobianos, exceto a polimixina. A resistência ao imipenem e demais β -lactâmicos ocorreu provavelmente, pela inativação enzimática por MBL (66,0%); hiper-produção de AmpC induzida (31,0%) somada a perda da porina D. A ventilação mecânica, traqueostomia e a prescrição de imipenem foram os fatores de risco significativos quando da análise multivariada. Foi detectada no hospital (A) uma policlonalidade com predomínio do clone A no primeiro ano de estudo e este mesmo foi identificado no hospital (B). A ocorrência de um surto relacionado a um clone predominante é sugestivo de uma disseminação horizontal intra e interhospitalar, resultante de práticas de controle e prevenção de infecções hospitalares inadequadas. Embora, as questões relativas à política de uso de antibióticos possam resultar numa pressão seletiva, bem como na presença de policlonalidade como documentado em infecções de natureza endêmica, estas não podem ser esquecidas em situações de surtos.

Palavras chaves: surto, *P. aeruginosa* resistente ao imipenem; metalo- β -lactamase, unidades de terapia intensiva.

ABSTRACT

One outbreak by imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, were investigated in regard to classic and molecular epidemiology aspects in two adult mixed intensive care unit (ICU) in two hospitals of Uberlandia. As a whole, 68 patients were involved: 47 from the Hospital de Clinicas (A) of the Universidade Federal de Uberlandia and 21 from the Hospital Santa Catarina (B), admitted in the period November/03 to October/05 and September/04, respectively. A control-case study was carried out: including 47 cases (patients infected by *P. aeruginosa*) and 122 controls (patients admitted and not infected by *P. aeruginosa* in ICU) only in the hospital (A), the epidemiologic, clinical and demographic data have been considered. The antibiotic susceptibility in vitro was analyzed by diffusion in gel technique, and phenotypes presence: metallo- β -lactamase (MBL), inducible AmpC and outer membrane protein. Research of environment contamination and health staff's hands in hospital (A) ICU were carried out, additionally. The index-case was detected in November/03, the surgical patient had been transferred to the hospital (B), who had been subjected to mechanical ventilation and developed ventilator-associated pneumonia (VAP) by imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the hospital (A). A temporal/special relationship was detected in most (94.0%) patients in hospital (A). The pneumonia was the predominant infection (77.0%) both units. The majority of the samples imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (94.0%) were resistant to other antimicrobials, except polymyxin. The imipenem-resistant and other β -lactams took place by means of enzymatic inactivation MBL (66.0%), the hyperproduction of inducible AmpC (31.0%) added to the loss of porins. The mechanical ventilation, tracheostomy and the imipenem prescription were significant risk factors in multivariate analysis. A polyclonality in the hospital (A) with prevailing the clone A in the first year of the research as well as in the hospital (B) was identified. The happening of the outbreak related to the predominant clone, suggests a horizontal transmission intra and interhospital induced by control practices and prevention measures of nosocomial infections inadequate. Although the questions related to the policies of the use of antimicrobials may produce a selective pressure as well as in the presence of polyclonality as confirmed by epidemic infections, these ones can not be forgotten in situations of outbreaks.

KEY WORDS: outbreak, imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- β -lactamase, intensive care units

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno hospitalar importante particularmente nas unidades de terapia intensiva (UTIs), de queimados e oncologia (RICHARDS et al, 1999; WALSH et al, 2005). Nestas unidades, é caracterizado como o principal patógeno nosocomial, relacionado à pneumonia, representando cerca de 50% das infecções hospitalares que na sua maioria estão associadas à utilização de ventilação mecânica, denominadas como pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) que se desenvolve após 48 horas de intubação endotraqueal e ventilação mecânica (CHASTRE, FAGON, 2002; RELLO et al , 2006).

No geral, as infecções hospitalares (IH) por *P. aeruginosa* correspondem a aproximadamente 10% das infecções, com participação importante nas infecções do trato urinário (12%), corrente sanguínea (10%) e de sítio cirúrgico (8%), além das pneumonias (17,4%) (KLUYTMANS, 1997; MAYHALL, 1997; POLLACK, 2003).

A internação em unidades críticas, quando acrescida ao imunocomprometimento, à idade avançada, ao tempo de hospitalização prolongado, as comorbidades como neoplasia, à gravidade da doença, ao uso de procedimentos invasivos, destacando à prótese ventilatória e ao período de uso da ventilação mecânica, a colonização prévia nas mucosas da orofaringe e intestinal dos pacientes críticos e adicionalmente, ao uso de antimicrobianos prévio são caracterizados como fatores pré-disponentes importantes para infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (HARRIS et al 2002; OHARA, ITOH, 2003; RICHET, 2003; ALOUSH et al, 2006).

Dados do “Nosocomial Pathogens Resistance Surveillance” (NPRS, 2003), referentes à China, classificam *P. aeruginosa* como o primeiro patógeno entre as bactérias Gram-negativas associado às infecções hospitalares. Segundo dados do “National Nosocomial Infection Surveillance” (NNIS), este ocupa a quinta posição entre todos os patógenos hospitalares, sendo o segundo patógeno causador de pneumonia, o terceiro em infecções do trato urinário e o

quarto em infecções de sítio cirúrgico em diversas UTIs de hospitais norte-americanos (RICHARDS et al, 1999). Nos hospitais brasileiros, também é o principal patógeno em UTI responsável por pneumonia (45,7%), seguida de infecção de corrente sanguínea (28,5%) e urinária (21,9%) (SADER et al, 2001; KIFFER et al, 2005).

Estudos epidemiológicos, realizados em hospitais de diferentes países, relatam que as infecções são na sua maioria endêmicas, usualmente consideradas de natureza exógena em pacientes colonizados/infectados considerados como o principal reservatório desse microorganismo (BERTRAND et al, 2001a; PELLEGRINO et al, 2002; THUONG et al, 2003; PARAMYTHIOTOU et al, 2004). Até o momento, não há um consenso quanto ao modo de transmissão, mas as evidências são direcionadas para as mãos dos profissionais de saúde como a principal via (BERTRAND et al, 2001b; DUBOIS et al, 2001). Entretanto, há indícios da participação de fontes ambientais com destaque para água e superfícies (BONTEN et al, 1999; RUIZ et al, 2004; KIKUCHI et al, 2007).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* são na sua grande maioria graves e há uma dificuldade no tratamento por causa de sua susceptibilidade limitada aos agentes antimicrobianos, em função da emergência de amostras resistentes durante o tratamento e que resulta no aparecimento de surtos em hospitais de diversas regiões do mundo (CARMELI et al, 1999; BUKHOLM et al, 2002; CRESPO et al, 2004; MAJUMDAR et al, 2004; PAGANI et al, 2005). No Brasil, a ocorrência de surtos foi descrita em hospitais de diferentes regiões como as do sul, sudeste e nordeste; a maioria dos isolados estão associados a casos de pneumonia em pacientes sob ventilação mecânica internados em UTI. (GALES et al, 2004; ZAVASCKI et al, 2005-b, CIPRIANO et al, 2007).

O uso intenso, pouco judicioso e empírico dos antibióticos, incluindo as drogas pseudomonicidas, favorece à colonização de pacientes críticos por *P. aeruginosa* e outras bactérias epidemiologicamente importantes, predominantemente de linhagens

resistente/multiresistentes, favorecendo a seleção destas amostras e tornando um problema terapêutico em diferentes unidades clínicas (GOOSSENS, 2003; MARRA et al, 2007).

P. aeruginosa possui mecanismos de resistência intrínsecos e capacidade para adquirir resistência à maioria dos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções, incluindo: penicilinas associadas aos inibidores de β -lactamase (piperacilina e tazobactam), cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (CARMELI et al, 1999; ARAKAWA et al 2000; LIVERMORE, 2002; ROSSOLINI, MANTENGOLI, 2005).

Em relação à primeira resistência intrínseca, destaca-se a produção de cefalosporinases (AmpC) de origem cromossômica. Estas enzimas, classificadas como da classe C são codificadas pelo gene cromossômico *ampC*, presente em algumas espécies da família Entrobacteriaceae do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marsescens* e *Proteus mirabilis*) e *P. aeruginosa*. As AmpC são expressas em baixos níveis naturalmente, mas podem ser induzidas e expressas em níveis elevados, quando na presença de antibióticos β -lactâmicos, sendo resistentes à ação dos inibidores de β -lactamases como sulbactam, clavulanato ou tazobactam (GIWEREMAN et al, 1990; LIVERMORE, 1995; JUAN et al, 2005). Outro grupo de β -lactamase produzida por este microrganismo, é a β -lactamase de amplo espectro (ESBL, “*Extended Spectrum β -Lactamases*”), classificada como do grupo A de Ambler (NIKAIDO et al, 1995; PUMBWE, PIDDOCK, 2003; LIVERMORE, 2002; HOCQUET et al., 2003). Estas enzimas conferem resistência à maioria dos β -lactâmicos, sendo bloqueadas por inibidores de β -lactamases e codificadas por genes plasmidiais (NIKAIDO et al, 1995; PUMBWE, PIDDOCK, 2003; LIVERMORE, 2002; HOCQUET et al., 2003).

Nos últimos anos, a produção de Metallo- β -lactamase (MBL) por *P. aeruginosa* com capacidade de hidrolisar todos os grupos de β -lactâmicos assumiu grande importância epidemiológica em relação a este patógeno. A expressão dessas enzimas está associada a

elementos móveis incluindo integrons e transposons (WASH et al, 2005; MENDES et al, 2006). Atualmente, são conhecidas cinco subclasses: IMP (Imipenemase), VIM (Verona), SPM-1 (São Paulo), GIM (“German”) e SIM-1 (“Seul”) (WALSH et al., 2005; MENDES et al, 2006). A epidemiologia, referente à diversidade enzimática dessas amostras produtoras destas MBLs, são reconhecidas internacionalmente na Ásia, Europa, assim como nas Américas do Sul e Norte, sugerindo uma rápida disseminação dos genes de resistência (ROSSOLINI, MANTENGOLI, 2005; WASH et al, 2005).

No Brasil, a identificação de MBL em *P. aeruginosa* ocorreu em 2001, e as subclasses mais prevalentes são IMP-1 e SPM-1 (MENDES et al, 2006). A presença de SPM-1 em isolados de *P. aeruginosa*, até o momento é descrita somente no Brasil, em diferentes regiões geográficas como: São Paulo, Paraná, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Pernambuco e Maranhão (GALES et al, 2003; CIPRIANO et al, 2007; GASPARETO et al, 2007). Sader et al (2004) e Zavascki et al (2004) revelam taxas de resistência ao imipenem (49,0% e 59,0%) e ceftazidima (40,5% e 49,0%) preocupantes, respectivamente, relacionadas com a presença de *P. aeruginosa* produtora de MBL subclasse SPM obtidas de isolados em hospitais de diferentes regiões do Brasil.

A partir da última década, verificou-se que muito dessa resistência intrínseca, em amostras de *P. aeruginosa*, está associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa em função da perda ou diminuição da expressão da proteína de membrana externa, denominada porina D (OprD) ou ainda à hiper expressão de bombas de efluxo caracterizadas como da família “Resistance Nodulation-Division” (RND), constituída por 12 sistemas no seu genoma; porém somente seis (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexGHI-OprD, MexJK, MexXY e MexEF-OprN) são confirmados experimentalmente associados à resistência (SCHWEIZER, 2003).

O efluxo pela bomba MexAB-OprM é o sistema de maior importância, pois remove da célula bacteriana drogas como β -lactâmicos, clorafenicol, fluoroquinolonas, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim, assim como vários corantes e anti-sépticos (POOLE, 2001; LIVERMORE, 2002; SCHWEIZER, 2003). Não somente a

resistência inerente observada em *P. aeruginosa*, mas também as resistências adquiridas geram uma preocupação no ambiente hospitalar, pois esta última pode ser transferida de um microrganismo para outro por meio de integrons, contendo genes cassetes recombinados que expressam resistência aos antimicrobianos (LIVERMORE, WOODFORD, 2000; WALSH et al, 2005, PATZER et al, 2004).

A presença de microrganismos resistentes no ambiente hospitalar pode estar relacionada com a pressão seletiva causada pelo uso intenso de antibióticos ou da disseminação horizontal, associados à transmissão clonal, quando na presença de um único clone ou policlonal (PATERSON, 2002; FIGUEIREDO-MENDES et al, 2005), como observado em infecções por *P. aeruginosa* multiresistentes (PELLEGRINO et al, 2002; KOH et al, 2004; ORTEGA et al, 2004; FIGUEIREDO-MENDES et al, 2005). Situação oposta ao observado em isolados de *Staphylococcus aureus*, resistente a oxacilina, onde clones representativos apresentam o gene *MecA*, este é prevalente no Brasil e em outros países do mundo (TRINDADE, 2005; KLUYTMANS-VANTERDERGH, KLUYTMANS, 2006)

Independente da característica epidemiológica das infecções, a descrição dos isolados por técnicas moleculares é imprescindível no conhecimento da epidemiologia dessas infecções (PELLEGRINO et al, 2002; PATERSON, 2002; FIGUEIREDO-MENDES et al, 2005). As técnicas empregadas para caracterização epidemiológica de amostras hospitalares de *P. aeruginosa*, incluem as seguintes: a ribotipagem (BENNEKOV et al, 1996), RAPD-PCR que é a amplificação aleatória do DNA (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”, RAPD) (WANG et al, 1993; RENDERS et al,1996), o polimorfismo de fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”, RFLP) (NOCIARI et al, 1996) e a eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”-PFGE) (WANG et al,1993; BENNEKOV et al, 1996).

A presença de diferentes mecanismos de resistência identificados em *P. aeruginosa* são codificados por genes associados a vetores de resistência, com destaque para plasmídeo e

integrons, expressa em determinados clones, favorecendo a sua disseminação em UTIs e podem ser detectados e identificados por técnicas fenóticas e moleculares (LIVERMORE, 2002; FIGUEIREDO-MENDES et al, 2005, MENDES et al, 2006)

A transmissão de infecções endêmicas e epidêmicas por *P. aeruginosa* permanece controvertida (RICHET, 2003) com evidências de infecções tanto endógenas quanto exógenas (BONTEN et al, 1999; ZABORINA et al, 2006). Entretanto, há suspeitas que as mãos dos profissionais de saúde tenham uma participação importante (BERTRAND et al, 2001a). A higiene das mãos de enfermeiras, médicos e outras categorias de funcionários na unidade de terapia intensiva de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia é inadequada, sendo realizada em apenas 30% das oportunidades segundo descrito por Borges et al (2006).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a ocorrência de infecções por amostras de *P. aeruginosa* multiresistente em hospitais de diferentes regiões do Brasil, a investigação de um surto por *P. aeruginosa* em UTIs de dois hospitais de Uberlândia, utilizando técnicas epidemiológicas clássicas e moleculares, embasando-se nos aspectos freqüentes nas unidades como: deficiência de diagnóstico microbiológico e conseqüentemente uma terapêutica empírica para o tratamento de infecções por microrganismos resistentes, representa um desafio e uma oportunidade para melhor conhecimento nas áreas de Microbiologia, Infectologia e Epidemiologia.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a epidemiologia de um surto por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem em Unidades de Terapia Intensiva de adulto em dois hospitais na cidade de Uberlândia, considerando a relação temporal e espacial entre os casos de infecção além de identificar o caso-índice do surto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Identificar os casos diagnosticados com a infecção por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem, os procedimentos invasivos utilizados e a evolução do pacientes dos dois hospitais.

2-Realizar inquéritos de prevalência de colonização dos pacientes, contaminação de superfícies próximas ao paciente, mãos dos profissionais da saúde, soluções anti-sépticas e ralos de pia no HC-UFU.

3-Analisar a multirresistência aos antimicrobianos, a presença dos seguintes fenótipos de resistência: ESBL, AmpC induzido e MBL, e a presença de proteínas (porinas) da membrana externa nas amostras de *P. aeruginosa*;

4- Definir a natureza clonal ou policlonal das amostras de *P. aeruginosa* multiresistentes e produtoras de metalo- β -lactamases por análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do DNA cromossômico pela eletroforese em campo pulsado.

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

4.1.1-HOSPITAIS E UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA-ADULTO

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), caracterizado como (A), é uma instituição de ensino que oferece assistência de nível terciário e que possui 503 leitos, e no Hospital Santa Catarina (HSC) caracterizado como (B), privado de nível de assistência terciária, com 150 leitos. As duas unidades de Terapia Intensiva-adulto (UTIA) são mistas, clínico-cirúrgicas, sendo a do hospital (A) composta por 15 leitos e do (B) 13 leitos.

4.1.2-DESCRIÇÃO DO SURTO

Foi realizado o estudo de um surto, a partir de um caso-índice, identificado como uma paciente de 77 anos com pneumonia por *P. aeruginosa* multiresistente, diagnosticada nas primeiras 48hs de internação na UTI de adultos do HC-UFU (A), transferida da UTIA do HSC (B) para o hospital B, com diagnóstico de entrada de insuficiência respiratória e abdômen agudo obstrutivo, e em uso de cefalosporina de terceira geração, em novembro de 2003. A partir do caso-índice foram diagnosticados novos casos de infecção por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem em pacientes internados nas duas UTIA do Hospital (A) e (B), nos períodos de novembro/2003 a julho/2005, e novembro/2003 a setembro/2004, respectivamente.

Por meio de dados dos pacientes infectados (n=47), um estudo caso-controle foi realizado no hospital A, sendo o grupo controle (n=122) pacientes internados no mesmo período do estudo sem diagnóstico de infecções, somado a inquéritos de prevalência no período de incidência das infecções neste hospital. Foi preenchida uma ficha individual com

dados demográficos, clínicos, microbiológicos e epidemiológicos para cada paciente presente no prontuário clínico (Apêndice I); estes foram acompanhados até alta ou óbito.

4.1.3-DEFINIÇÕES

- **Infecção hospitalar:** toda manifestação clínica de infecção que não está presente ou em incubação no momento da admissão do paciente no hospital, manifestando-se a partir de 48 horas após a internação (GAMER, et al,1988; HUGONNETT et al, 2004).

- **Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV):** infecção que inicia-se após 48 horas de ventilação mecânica, cujo diagnóstico é estabelecido a partir de dados clínicos, radiológicos e microbiológicos (RELLO et al, 1995; TROUILLET et al.,1998).

Os diagnósticos microbiológicos das infecções por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem foram realizados pelos Laboratórios de Microbiologia dos Hospitais (A) e (B) e as amostras foram transportadas para futura análises no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia.

4.1.4-PESQUISA de COLONIZAÇÃO nos PACIENTES e CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL por *P. aeruginosa* na UTI de ADULTO do HC-UFU.

Foram realizados seis inquéritos de prevalência de colonizações anal e de orofaringe dos pacientes internados na UTI do HC-UFU no período de janeiro/2004 a outubro/2005. A colonização por *P. aeruginosa* foi definida pela presença do microrganismo em material clínico não associado com infecção (THUONG et al, 2003). A pesquisa de contaminação por este microrganismo também foi realizada nas mãos dos profissionais de saúde da unidade, em soluções líquidas para higienização (sabões e soluções antissépticas), superfícies localizadas próximas ao paciente (respirador dos pacientes intubados e cabeceira da cama de todos os pacientes) e ralos de pias. Para cada paciente, incluído no inquérito, foi preenchida uma ficha

com dados demográficos e clínicos (Apendice I) e o termo de consentimento para a inclusão no estudo foi realizado verbalmente.

4.2. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

4.2.1. COLETA

As coletas de material clínico, a partir das mucosas da orofaringe e perianal dos pacientes internados, mãos de profissionais de saúde na UTI e de superfícies contaminadas foram realizadas durante os inquéritos de prevalência com o auxílio de “swabs”, transportados ao laboratório de Microbiologia da Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia-ARIMP-UFU, em tubos contendo “Trypticase Soy Broth” (TSB –DIFCO®).

4.2.2. CULTIVO PRIMÁRIO e IDENTIFICAÇÃO de *P. aeruginosa*

As amostras coletadas durante os inquéritos de prevalência, bem como, os isolados de infecção foram inoculados em Ágar Pseudomonas (DIFCO®) pela técnica de esgotamento, seguido de incubação a 37°C, por 24 horas (KISKA, GILLIGAN, 1999).

As colônias foram identificadas como *P. aeruginosa* pelos seguintes testes: reação de citocromo-oxidase positiva, oxidação da glicose pelo teste de Oxidação e Fermentação, atividade de diidrólise da arginina e hidrólise de acetamida. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo (KISKA, GILLIGAN, 1999).

4.2.3. ESTOCAGEM

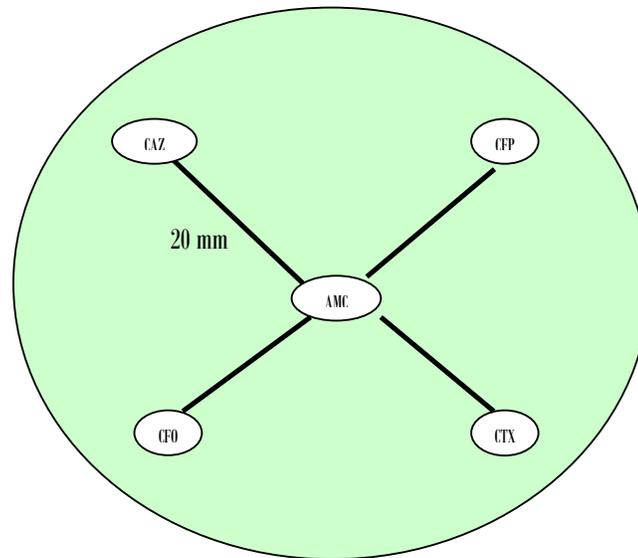
As colônias de *P. aeruginosa* foram subcultivadas em caldo “Broth Heart Infusion” (BHI – DIFCO®), acrescido de 15% de glicerol, incubando-se a 37°C, por 24 horas, e a suspensão resultante estocada a –20°C.

4.2.4. TESTES de SUSCEPTIBILIDADE aos ANTIMICROBIANOS

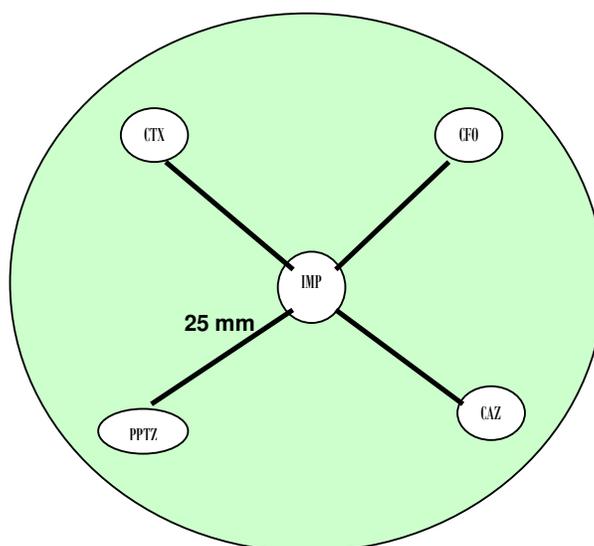
4.2.4.1. Teste de Difusão em Agar: As amostras estocadas foram subcultivadas em Ágar “Trypticase Soy Agar” (TSA -DIFCO[®]) pela técnica de esgotamento, e encubadas a 37°C, por 24 horas. Cerca de 3 a 5 colônias foram semeadas em 5mL de caldo TSB, incubando-se a 37° C até a uma turvação equivalente à concentração padrão da escala 0,5 de McFarland, que corresponde a 1 a 2x10⁸ UFC/mL; em seguida, as amostras foram semeadas na superfície do Ágar Müller-Hinton (MHA-DIFCO[®]) com auxílio de um “swab”, de modo a obter crescimento confluyente. Os discos de antimicrobianos foram aplicados sobre a superfície do meio de cultura seguindo-se de incubação a 37° C, por 24 horas de acordo com o “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*” (NCCLS, 2004a). Os seguintes discos de antimicrobianos (CECON[®]) foram utilizados: aztreonam (30µg), ceftazidima (30µg), cefoxitina (30µg), cefepima (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), piperaciclina-tazobactam (10/100µg) e polimixina B (300 UI). Como cepa padrão foi utilizada *P. aeruginosa* ATCC 27853.

4.2.5. DETECÇÃO FENOTÍPICA de AMOSTRAS PRODUTORAS de β-LACTAMASES

4.2.5.1. Fenótipo ESBL (β-lactamase de espectro ampliado): as amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram resistência à ceftazidima e/ou à cefepima foram submetidas ao teste de detecção de produção de ESBL. Em uma placa de MHA, foram aplicados os seguintes discos de antimicrobianos (CECON[®]): ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), aztreonam (10µg), amoxicilina com ácido clavulânico (10/100µg), cefepima (30µg) dispostos a uma distância de 20 mm de centro a centro de cada antibiótico (NCCLS, 2004b). Após a incubação por 24 hs a 37°C, a observação do crescimento da zona de inibição, com áreas de distorção entre os discos, demonstrando sinergismo, foi indicativa da produção de ESBL. Como cepas controles foram utilizadas *E. coli* ATCC 25922 (controle negativo) e *K pneumoniae* micro 23 (controle positivo).

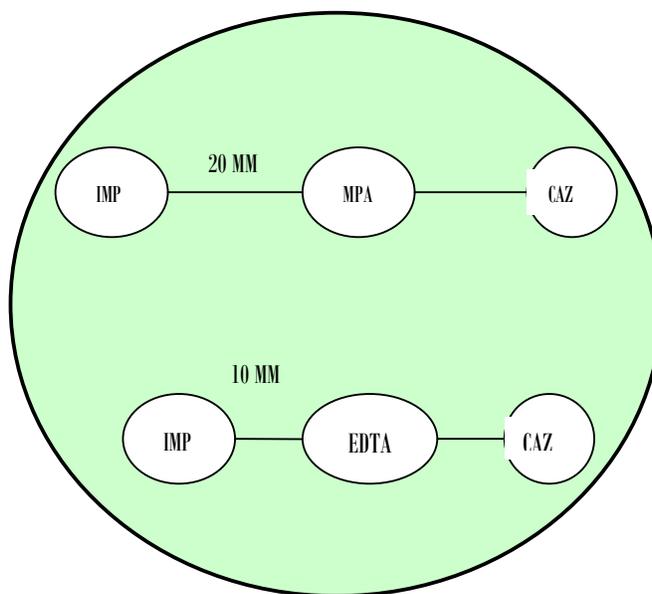


4.2.5.2.Fenótipo AmpC induzida: foram submetidas ao teste de aproximação de disco “teste D” que favorece a indução da enzima AmpC. Uma placa de Petri, contendo MHA, foi utilizada para semear a suspensão bacteriana equivalente a escala de 0,5 de McFarland para obtenção de um crescimento confluyente, e discos de imipenem (30 μ g) como indutor e os seguintes substratos: (CECON[®]) ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), piperacilina+tazobactam (10/100 μ g) foram acrescentados equidistantes 25 mm do indutor (definida de centro a centro). Depois de incubada por 24 hs a 37° C, foi caracterizado como teste positivo a presença de um antagonismo entre o indutor e um dos substratos caracterizado pela forma de um D, com uma zona de inibição de \geq 20mm na área induzida do substrato. Como cepas padrão foram utilizadas *P. aeruginosa* ATCC 27853 (controle positivo) e *E. coli* ATCC 25922 (controle negativo) (DUNNE, HARDIN, 2005).



4.2.5.3. Fenótipo Metallo- β -lactamase: as amostras bacterianas que apresentaram resistência à ceftazidima e/ou imipenem foram submetidas ao teste de sinergismo com duplo disco; como inibidores foram utilizadas soluções de 2 ácido-mercaptopropiônico (2-MPA) e ácido-etil-diamino-tetrácetico (EDTA) e como indicadores os discos de imipenem (10 μ g) e ceftazidima (30 μ g) (ARAKAWA, 2000). As amostras foram subcultivadas em caldo TSB e a suspensão foi incubada a 37° C até atingir a turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, em seguida foram semeadas em placas de “Petri” contendo MHA com auxílio de “swab” de modo a obter um crescimento confluyente. Foram acrescentados um disco de ceftazidima (30 μ g) e imipenem (10 μ g) distantes 25 mm de um disco de papel-filtro esterilizado; em seguida sobre o disco de papel-filtro foi adicionado 3 μ L de ácido mercaptopropiônico (2-MPA) e incubados a 37°C, por 24 hs. O outro substrato quelante foi o EDTA a 500 mM na quantidade de 10 μ L na presença equidistante de 10 mm dos discos de imipenem (10 μ g) e ceftazidima (30 μ g). A determinação de um aumento na zona de inibição ou a presença de um halo de inibição em torno do disco de ceftazidima (30 μ g) e imipenem (10 μ g) caracteriza o teste positivo para a presença de metalo- β -lactamase (ARAKAWA et al, 2000). Como cepas controles, foram utilizadas *P. aeruginosa* ATCC

27853 (controle negativo) e *P. aeruginosa* P-319 (controle positivo-Cepa doada pela Dra. Gales-UNIFESP).



4.3- EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DA MEMBRANA EXTERNA

4.3.1-Extração das proteínas

A extração de proteínas da membrana externa das bactérias selecionadas foi baseada no perfil de resistência fenotípica quanto à presença de metalo- β -lactamase e ou AmpC.

Após o isolamento da bactéria em ágar *Pseudomonas*, aproximadamente 20 colônias foram suspensas em 5mL de “Müeller-Hinton Broth” (MHB) e incubadas a 37° C, por 24 hs, este preparo foi realizado segundo Masuda et al (1995) com modificações. A solução de 2 mL foi transferida para tubos tipo “eppendorfs” esterilizados e submetidos à centrifugação a 7.000x g por 10 min. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O precipitado foi suspenso em 1 mL “Sodium dodecyl sulfate” SDS (INVITROGEN®) a 10%, em seguida foi agitado energeticamente e submetido a nova centrifugação a 7.000 xg por 10 min, o sobrenadante formado foi novamente desprezado. O precipitado foi suspenso em 1 mL SDS a 10%, em

seguida foi agitado energeticamente. Cada amostra foi sonicada em sonicador automático em pulsos de 10s por um tempo de 2 min em banho de gelo. Os precipitados foram novamente centrifugados a 7.000xg por 10 min e o sobrenadante foi aspirado e utilizado para o preparo da amostra.

4.3.2-Preparo e corrida do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida a 14% foi preparado de acordo com o protocolo do laboratório de Biologia molecular com 10 poços; em seguida foi aplicado no primeiro poço, numa quantidade de 7 μL o padrão de baixo peso molecular (10 a 200 kDA) (BenchMark-INVITROGEN[®]- cód.: 10748-010), no último poço, 7 μL do padrão de alto peso molecular (30 a 460 kDA) (HiMark-INVITROGEN[®]-cód.: LC5699) e nos demais poços 20 μL do sobredanadante das amostras preparadas anteriormente. Foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (controle positivo), em função da susceptibilidade a todos os antibióticos pseudomonicidas, que pode ser relacionada com a hiper-expressão de porina D e expressão reduzida de OprM; *P. aeruginosa* produtora de SPM (controle negativo) por apresentar resistência ao imipenem associado a possível ausência da porina D. A seqüência de cada amostra colocada em cada poço dos géis foi anotada para facilitar a identificação. Em seguida os géis foram submetidos à corrida eletroforética por um tempo de 40 min em uma amperagem de 60 mA e 200 V; após corrida os géis foram corados com Comassie Blue e/ou coloração por nitrato de prata quando na ausência de visualização de bandas. O peso molecular das bandas testadas foram estipulados com base no teste estatístico realizado pelo programa KODAK 1D imagem[®].

4.4-TIPAGEM MOLECULAR

4.4.1-ELETROFORESE em CAMPO PULSADO (PFGE)

Foram analisadas, quanto ao perfil de macrorestrição do crDNA com a enzima *SpeI*, após PFGE, 24 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes dos dois hospitais, sendo 18 do hospital A e 06 do hospital B. A escolha dos isolados para esta análise molecular foi baseada na positividade do teste fenotípico para produção de metalo- β -lactamase. Para as amostras bacterianas do hospital (B), com relação temporal no período do surto, incluindo o mês subsequente; enquanto que, para o hospital (A), a amostra do caso-índice e amostras distribuídas ao longo dos dois anos de inquérito.

4.4.1-Extração do DNA genômico

Constatando o crescimento em cultura pura de cada amostra bacteriana, as mesmas foram inoculadas em 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37° C durante 24 hs com agitação constante, de modo a atingirem sua fase exponencial de crescimento. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo “eppendorf” e centrifugada por 2 min a 12.000 rpm a 4°C. As células foram lavadas em 500 μ L de PIV (10 Mm Tris, 1.0M NaCl), novamente centrifugadas, e o sobrenadante descartado. O “pellet” foi suspenso em 200 μ L de PIV e 150 μ L foram transferidos para um novo tubo “eppendorf” colocado em banho-maria à 48°C por 5 a 10 min para o equilíbrio da temperatura.

4.4.3-Preparo do gel de agarose

Em seguida, 150 μ L de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure), foram adicionados rapidamente ao tubo. Os discos de agarose foram confeccionados e colocados em uma solução de lise EC (6 mM Tris, pH 8,0; 1M NaCl; 100 mM EDTA, 0,2% sódio deoxicolato; 0,5% sódio

lauryl sacarsina; 0,5% Brij 58) acrescentado-se RNase a uma concentração final de 20µg/mL e incubados por 4 a 5 hs a 37^o C. Ao final deste período, o tampão EC foi substituído por tampão ES (EDTA pH 9, sarcosil 1%) acrescido de proteinase K, incubando-se por um período de 18-24 hs a 50^o C. Os discos de agarose foram lavados 5 vezes com 13 mL do tampão TE 1x (10Mm Tris, pH 7,5;1 mM EDTA, pH 8.0), sendo de 30 min. o tempo. Um único disco foi colocado em 100µL de tampão 1x e deixado a 37^oC por 30 min. Em seguida, a solução foi substituída por tampão fresco e adicionado 30 unidades de enzima de restrição *Spe-I* seguindo-se incubação em banho de água por 18 a 20 hs a 37^oC. Foram preparados 150 mL de gel a 1% (Agarose Ultra Pure) em TBE 0,5x (0,89 M Tris; 0,89 Ácido Bórico; 0,25 EDTA, pH 8.0).

4.4.4- Eletroforese em campo pulsado

A eletroforese foi realizada em aparelho Gene Navigator (Pharmacia), utilizando-se o tampão TBE 0,5x e temperatura de 14^o C por 20 hs, com pulsos de 5 s por 20 hs e 15 s por 1 min utilizando-se uma corrente elétrica de 164 V, no modo interpolation. Após esse procedimento o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) por 30 min e descorado em água destilada por 30 min e fotografado com filme Photoman.

Os padrões de PFGE foram observados visualmente e considerados idênticos se coincidentes em todas as bandas, similares (subtipos) se diferiram em uma ou duas bandas claramente visíveis e diferentes quando houve diferenças em três ou mais bandas (TENOVER et al, 1995).

As amostras foram analisadas estatisticamente quanto à similaridade genômica pelo programa Multi Variate Statistic Package (MVSP 7.0).

5- ASPECTOS ÉTICOS da PESQUISA

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (nº 189/04) em anexo I. O termo de consentimento foi realizado verbalmente.

6- ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os dados epidemiológicos foram analisados pelo programa “Statistic 4.5 for Windows” (COPYRIGHT, 1993) e Epi-Info, versão 5.0 (DEAN, 2000).

Os testes X^2 e o Exato de Fisher foram utilizados para analisar as proporções e o t de Student para as diferenças entre médias. Os fatores de risco potenciais para aquisição de colonização/infecção por *P. aeruginosa* foram avaliados pela dicotomização, considerando variável significativa quando $p \leq 0,05$; as variáveis contínuas foram comparadas pelo teste Forward.

7.1. Surto por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem em UTIs de adulto de dois hospitais

O caso-índice do surto descrito foi uma paciente de 77 anos com pneumonia por *P. aeruginosa* multiresistente, diagnosticada nas primeiras 48hs de internação na UTI de adultos do HC-UFU (A). Ela veio transferida da UTI do HSC (B) para o hospital B, com diagnóstico de insuficiência respiratória e abdômen agudo obstrutivo, e em uso de cefalosporina de terceira geração, em novembro de 2003 (paciente 1-Figura 4).

A paciente permaneceu na UTI do hospital (A) por dois meses e meio, período em que fez uso de imipenem e polimixina B. A seguir, foi transferida para a enfermaria da clínica médica e após uma semana de internação, evoluiu para o óbito devido à PAV e à falência de múltiplos órgãos.

Após o caso-índice foram diagnosticados 67 novos casos, sendo 68,6% (46/67) dos pacientes internados na UTI do hospital (A) (Figura 4) e 31,3% (21/67) no hospital (B), todos infectados por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem.

Entre as infecções (Tabela 1), a pneumonia foi a mais freqüente (70,6%), seguida de infecção urinária (11,7%), infecção de corrente sanguínea (8,8%) e do sítio cirúrgico (8,8%). Verificou-se uma maior proporção de bacteremia no hospital (A) (10,6% vs 4,8%) e de infecção de sítio cirúrgico no (B) (14,8% vs 6,7%).

Outro aspecto relevante foi à alta freqüência de mortalidade total, com aproximadamente 60,0% (41/60), particularmente na UTI do hospital (A) 79,0% (11/14).

Tabela 1. Infecções por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem nos pacientes internados na UTI de adultos no hospital (A) e (B), durante os períodos de novembro/03 a setembro/04 (B) e novembro/03 a julho/05 (A)

Hospital*	Pacientes infectados N=68 (%)				
	Bacteremia/Sepse	Pneumonia	Inf. urinária	Inf. sítio cirúrgico	Total
	6 (8,8)	48 (70,6)	8 (11,7)	6 (8,8)	68 (100,0)
(A)	5 (10,6)	34 (72,3)	5 (10,6)	3 (6,7)	47 (69,1)
(B)	1 (4,8)	14 (66,6)	3 (14,3)	3 (14,3)	21 (30,1)

*(A)-Hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, (B)-Hospital Santa Catarina

7.2-Hospital Santa Catarina (B)

As características demográficas e clínicas dos 21 pacientes infectados por *P. aeruginosa* neste hospital, estão no Quadro 1, observando-se o predomínio de pacientes com idade superior a 60 anos (71,4%), sexo masculino (62,0%), doença pulmonar obstrutiva crônica como a doença de base mais freqüente (19,0%) e a maioria dos pacientes (95,2%) sob ventilação mecânica e em uso de cateter vascular central.

Quadro 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem internados na UTI de adultos do hospital (B)

Paciente	Sexo	Idade (dias)	Doença de base*	Infecção	Procedimentos invasivos***	Evolução
1	M	77	Cardíaco	Cutânea	CVC, VM, SV, Cirurgia	Óbito
2	M	ND	Neoplasia	ITU**	CVC, VM, Oostomia	Alta
3	F	74	DPOC	Pneumonia	CVC, VM, SV,	Óbito
4	M	76	IAM	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
5	M	60	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	ND
6	M	67	Neoplasia	Pneumonia	CVC, VM, SV, Cirurgia	Óbito
7	F	49	Neoplasia	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
8	F	63	DPOC	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
9	M	84	Hidrocefalia	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNE	Óbito
10	M	89	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
11	F	65	AVC	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNE, Cirurgia	Óbito
12	M	ND	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV, Dreno	Óbito
13	M	66	ND	ITU	CVC, VM, SV	ND
14	F	59	Pancreatite	Abdominal	CVC, VM, SV, Dreno	ND
15	M	74	ND	Cutâneo	CVC, VM, SV	ND
16	M	56	ND	ITU	CVC, SV	ND
17	M	79	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV,	ND
18	F	74	DPOC	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
19	M	74	DPOC, AVC	Pneumonia	CVC, VM, SV, SOG	Óbito
20	F	85	AAP	Sepse	CVC, VM, SV	Alta
21	F	ND	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV,	ND

*AAP-Abdomem agudo perfurado; AVC-Acidente vascular cerebral; DPOC-Doença pulmonar obstrutiva crônica; IAM - infarto agudo do miocárdio;

**ITU- Infecção do trato urinário

***CVC - Cateter vascular central; VM - Ventilação mecânica; SV - Sonda vesical, SOG- Sonda Orogástrica

ND- não definido.

A distribuição temporal dos pacientes infectados por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem internados no hospital (B) e a presença do clone “A” é mostrada na Figura 1. A maioria dos casos (66,7%) ocorreu no período de dezembro/2003 a fevereiro/2004. O clone “A” foi observado nos meses de janeiro, fevereiro, maio e julho/2004.

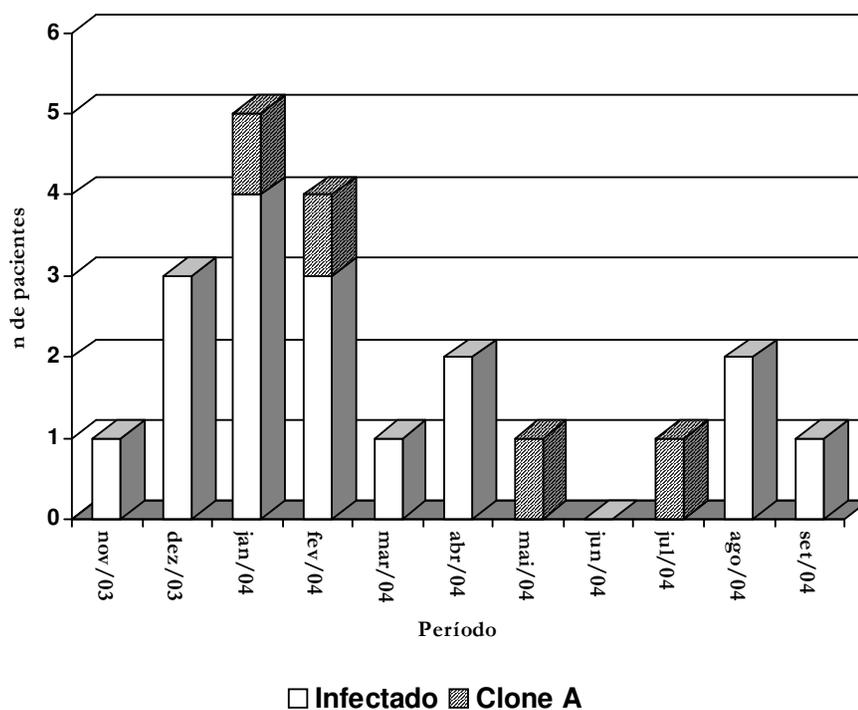


Figura 1. Distribuição temporal e a predominância do clone “A” em pacientes infectados por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem internados na UTI adulto do hospital (B), no período de novembro/03 a setembro/04.

Todas as amostras de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem apresentaram resistência aos seguintes antibióticos: gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, ceftazidima, piperaciclina + tazobactam e meropenem, com susceptibilidade apenas a polimixina.

Os isolados de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem que apresentaram uma multirresistência foram submetidos aos testes fenotípicos para determinação da produção das enzimas MBL e AmpC induzida, com os seguintes resultados: produção de MBL-MPA, MBL-EDTA em 85,7% e 90,5%, respectivamente, AmpC induzida em 47,7% (Figura 2).

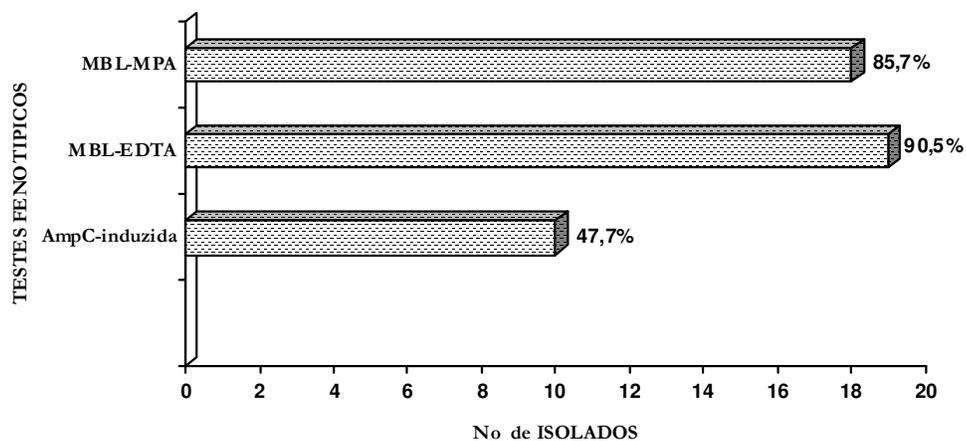


Figura 2. Frequência dos fenótipos AmpC induzida, MBL-EDTA e MBL-MPA em isolados de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem de pacientes internados no hospital B.

7.3- Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (A)

Após o caso-índice foram diagnosticados 68,7% (46/67) pacientes internados na UTI com infecções por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem.

As características demográficas e clínicas desses pacientes infectados estão no Quadro 2, com predominância entre os pacientes: idade menor que 60 anos (79,0%), e politraumatismo (92,5%) como diagnóstico de entrada. A ventilação mecânica e uso de cateter vascular central foram procedimentos invasivos comum a todos os pacientes.

Quadro 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem internados na UTI do hospital (A).

Paciente	Gênero	Idade	Diagnóstico de entrada*	Infecção	Procedimentos Invasivos**	Evolução
1	F	73	IRA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
2	F	43	IRC	Pneumonia	CVC, VM	Alta
3	M	64	IRA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
4	M	47	AAP	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
5	M	19	ND	Sepse	CVC, VM, SV	Óbito
6	M	52	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
7	M	43	SB	Cirúrgica	CVC, VM, SV	Alta
8	F	56	AVC	Urina	CVC, VM, SV	Óbito
9	M	77	IRC	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
10	F	40	IRA, LUPUS	Pneumonia	CVC, VM	Alta
11	M	51	ND	Cirúrgica	CVC, VM, SV	Óbito
12	F	48	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
13	M	21	ND	Cirúrgica	CVC, SV, DRENO	Alta
14	M	69	NEO	Urina	CVC, SV	Alta
15	M	46	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
16	F	38	LEU, IRA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
17	M	ND	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
18	M	56	CARDTA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
19	F	68	DPOC	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
20	F	43	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
21	F	57	IRA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
22	M	59	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
23	F	98	ND	Sepse	CVC, DRENO, TET	Óbito
24	F	65	PTMA	Sepse	CVC, VM, SV	Óbito
25	M	26	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
26	F	52	TR	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
27	M	42	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
28	F	56	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
29	M	53		Urina	CVC, DRENO, VM, SV	Alta
30	M	45	ND	Urina	CVC, SV	Óbito
31	M	65	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
32	F	58	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
33	M	55	IRA	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNG	Óbito
34	M	60	CARDPATA	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNG DRENO,	Óbito
35	M	53	NEOPLASIA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
36	M	72	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Alta
37	F	56	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNG SNE	Alta
38	M	52	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNG SNE	Alta
39	M	30	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV, SNG OOSTOMIA	Óbito

Continuação da quadro 2

Paciente	Sexo	Idade	Diagnóstico de entrada*	Infecção	Procedimentos Invasivos**	Evolução
40	M	33	PTMA	Pneumonia	CVC, VM, SV, DRENO, OOSTOMIA	Alta
41	F	18	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
42	M	41	SIDA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
43	M	65	CARDTA	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito
44	M	55	ND	Sepse	CVC, VM, SV	Alta
45	F	39	ND	Urina	CVC, SV, VM	Óbito
46	M	45	ND	Sepse	CVC, VM, SV, SNG	Óbito
47	M	54	ND	Pneumonia	CVC, VM, SV	Óbito

*AAP Abdomo agudo perfurado; AVC - Acidente vascular cerebral; DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica; CARDTA- cardiopata; IAM - infarto agudo do miocárdio, IRA- insuficiência respiratória aguda; IRC- insuficiência renal crônica; LEU- leucemia; PTMA-Politrauma; SIDA-síndrome da imunodeficiência adquirida; TR- transplante renal;

**CVC - Cateter vascular central; VM - Ventilação mecânica; SV - Sonda vesical; SNE-sonda nasogástrica, TET-traqueostomia; ND-não definido.

A distribuição temporal destes pacientes infectados e os óbitos estão representados na figura 3, com a presença de dois picos de incidência mais expressivos, nos períodos de janeiro a julho/2004 e fevereiro a julho/2005, respectivamente.

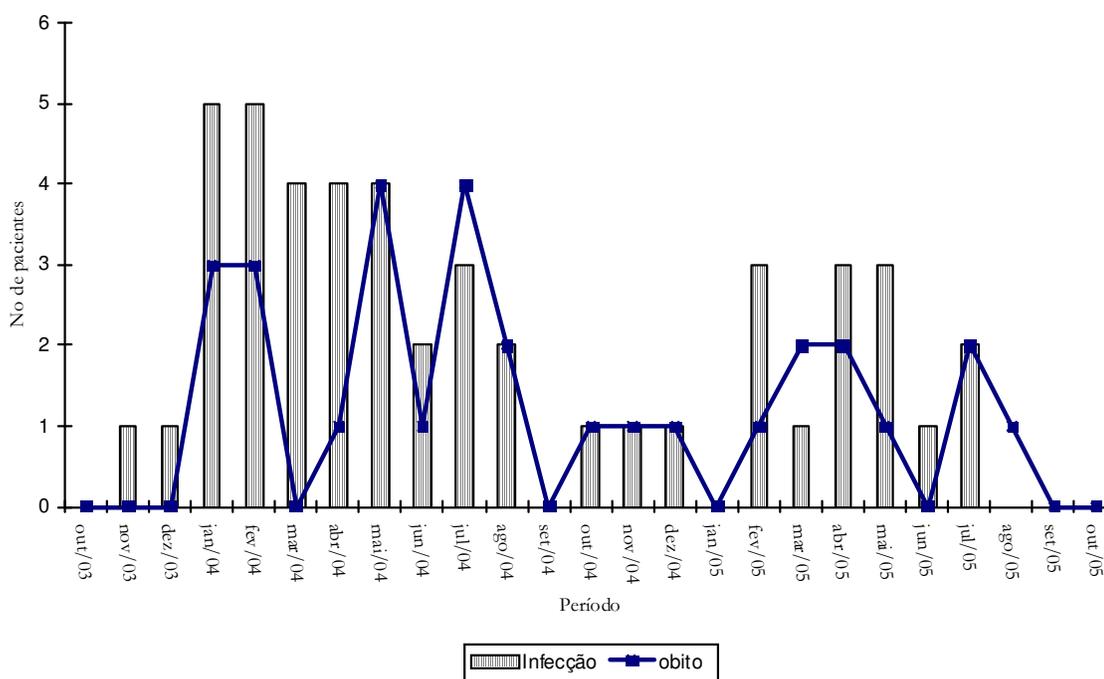


Figura 3. Distribuição temporal dos pacientes infectados por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem internados na UTI do hospital (A), no período de outubro/2003-outubro/2005

No hospital (A) observou-se uma relação temporal e espacial entre os casos de infecções por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem internados na unidade a partir da internação do caso-índice durante o período de novembro/2003 a julho/2005; diante da análise da macrorestrição do crDNA determinou-se a presença de vários clones, porém o perfil clonal “A” foi predominante a partir do caso-índice até outubro/2004 período correspondente a maior concentração dos casos (Figura 4).

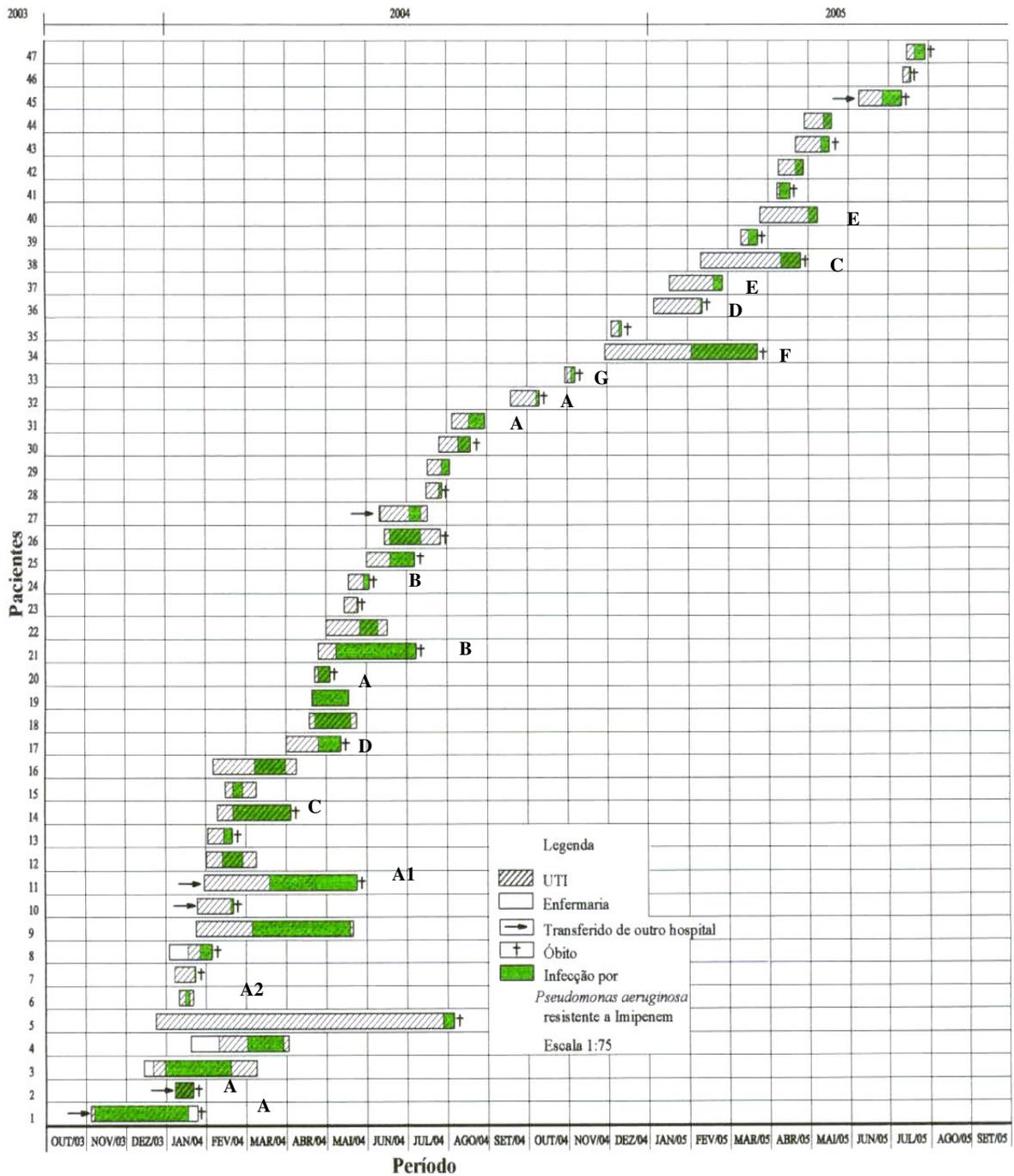


Figura 4. Progressão dos casos de infecção por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem em função da relação espacial/temporal na UTI adulto no hospital (A), no período de outubro/2003 a setembro/2005. Letras maiúsculas após os casos de infecção indicam o perfil do crDNA em linhagem de *P. aeruginosa* pela análise em PFGE

Das amostras de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem proveniente de casos de infecções na UTI desse hospital, a maioria (75,0%) foram multirresistentes aos antimicrobianos pseudomonícidias com susceptibilidade apenas para polimixina B (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de resistência de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem isolados de pacientes internados na UTI do hospital (A), no período de novembro/03 a setembro/05

Isolados	Antimicrobianos* (%)								
	AZT	AMI	GEN	CEF	CIP	LEV	CAZ	PTZ	Pol B
Resistente IMP(44)	39 (88,6)	34 (77,3)	41 (93,1)	38 (66,3)	40 (90,9)	41 (93,1)	34 (77,2)	36 (61,6)	0 (0,0)
Resistente MER (3)	3 (100,0)	1 (33,3)	1 (33,3)	2 (66,6)	1 (33,3)	2 (66,6)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total (47)	42(89,3)	35 (74,5)	42(89,3)	40 (80,1)	41(91,1)	43(91,4)	35(74,5)	36(76,6)	0 (0,0)

*AZT-aztreonam, AMI-amicacina, GEN-gentamicina, CEF- cefpima, CIP–ciprofloxacina, LEV-levofloxacina, CAZ-ceftazidima, PTZ-piperacilina–tazobactam, IMP-imipenem, MER-meropenem, PolB- Polimixina B.

Os testes fenotípicos para a produção de ESBL, AmpC induzida e MBL foram realizados em 38 amostras de *P. aeruginosa*, verificando-se a ausência do fenótipo ESBL nas amostras sensíveis a cefpima. Entretanto, a hiper-expressão de AmpC induzida foram observadas em 30,0% dos isolados e uma ausência de expressão visível nos demais isolados 73,7% (28/38) provavelmente pela baixa expressão de AmpC induzida. A produção de MBL foi mais alta pelo teste com EDTA 60,5% (23/38) quando comparado com a utilização do inibidor MPA 52,6% (20/38) como representado na figura 5.

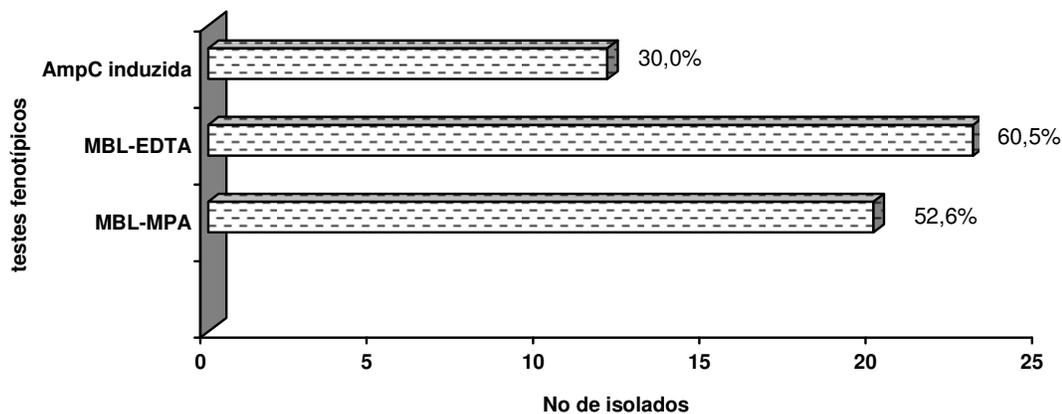


Figura 5. Frequência das amostras de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem produtora de AmpC induzida, MBL-EDTA e MBL-MPA

7.4- Pesquisa de resistência ao imipenem por mecanismo de perda de porinas - análise das proteínas de membrana externa

A presença de proteínas da membrana externa nas amostras de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem foram identificadas em géis de poliacrilamida a 14,0% pelo teste de SDS-PAGE com agentes desnaturantes e os mesmos foram comparados com o perfil eletroforético de uma cepa susceptível de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), na qual observamos a presença de uma proteína com o peso de aproximadamente de 45 kDa, correspondendo a porina D que confere susceptibilidade ao imipenem e uma baixa expressão ou ausência da porina M (constitutiva). Durante a avaliação observou-se a presença de uma proteína com baixa expressão e peso molecular de 45 kDa em 14,0% (2/14) das amostras de *P. aeruginosa* coincidindo com o peso da porina D, e uma segunda proteína com peso molecular de 49 kDa em 4/14 (29,0%) das amostras correspondendo ao peso molecular da proteína OprM (Figura 6).

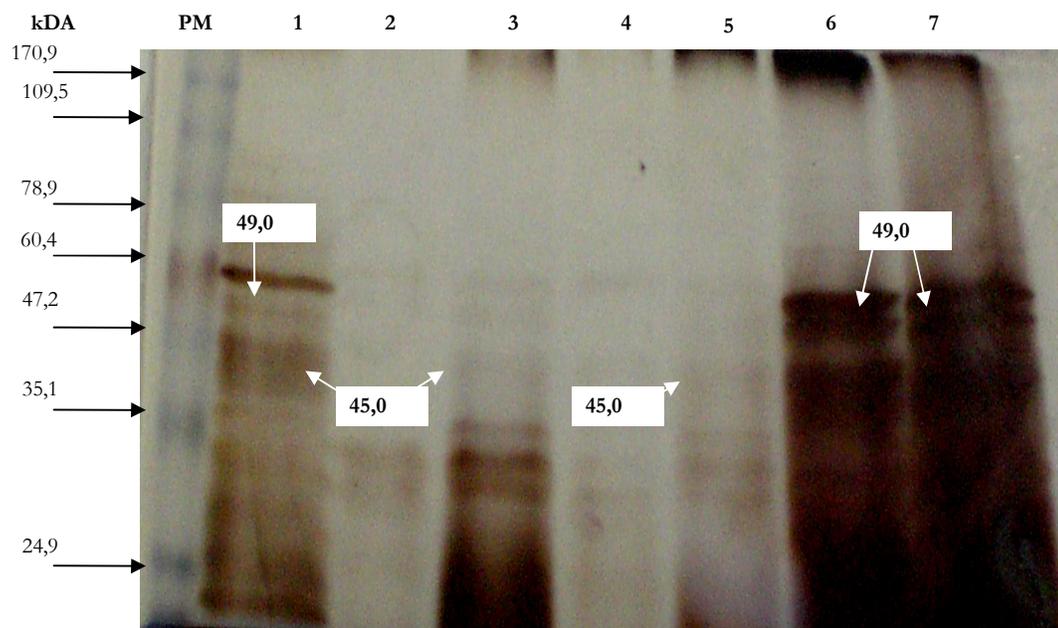


Figura 6. Análise eletroforética das proteínas da membrana externa: Padrão de baixo PPM, coluna 1: *P. aeruginosa* sensível; coluna 2: *P. aeruginosa* multiresistente; coluna 3: *P. aeruginosa* 17/HC-UFU, coluna 4: *P. aeruginosa* 3/HC-UFU, coluna 5: *P. aeruginosa* 38/HC-UFU; coluna 6: *P. aeruginosa* 6/HC-UFU; coluna 7: *P. aeruginosa* 10/HC-UFU

7.5- Colonização de pacientes e contaminação ambiental por *P. aeruginosa* na UTI do hospital (A)

Os sete inquéritos de prevalência pontual de colonização e contaminação por *P. aeruginosa* foram realizados entre janeiro/04 e outubro/05, coincidentes com a ocorrência do surto (Tabela 5). Durante o primeiro semestre de 2004, foram realizados três inquéritos incluindo 43 pacientes, com 53,4% (23/43) colonizados na mucosa da boca e/ou intestino, sendo 35,0% (15/43) com infecção por *P. aeruginosa* e 43,4% (10/23) dos pacientes colonizados apresentaram-se também infectados. No semestre seguinte, foram realizados mais dois inquéritos incluindo 28 pacientes, identificando-se apenas um paciente (7,7%) colonizado e infectado pelo microrganismo. Nos dois inquéritos realizados em 2005, a frequência de colonização foi de 13,3%, desses somente dois pacientes colonizados e infectados, concomitante.

Tabela 3. Prevalência de pacientes colonizados por *P. aeruginosa* na UTI de adultos do hospital (A), durante o surto

Períodos (n*)	Paciente	
	Infectado n (%)	Colonizado n (%)
1º-19/02/04 (15)	6 (40,0)	8 (26,7)
2º-23/03/04 (14)	5 (35,7)	8 (21,0)
3º-24/04/04 (14)	4 (29,0)	7 (43,0)
4º-27/10/04 (13)	1 (7,7)	1 (7,7)
5º-15/12/04(15)	0 (0,0)	0 (0,0)
6º- 01/04/05(15)	2 (13,3)	4 (26,7)
7º- 01/09/05(15)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total (101)	18 (17,8)	28 (27,7)

* n= número de pacientes

Não foi detectada a presença de *P. aeruginosa* nas mãos dos profissionais de saúde, em soluções anti-sépticas e ralos de pias. No entanto, este microrganismo foi recuperado da superfície do respirador 14,8% (9/61) e cabeceira do leito 4,0% (4/101) (Tabela).

Tabela 4. Contaminação por *P. aeruginosa* em superfícies próximas aos pacientes internados na UTI de adultos do hospital A

Período	Superfície	
	Cabeceira do leito n* (%)	Respirador n* (%)
1º-19/02/04	15/1 (66,7)	12/4 (33,3)
2º-23/03/04	14/2 (14,3)	10/2 (20,0)
3º-24/04/04	14/1 (7,1)	13/2 (15,3)
4º-27/10/04	13/0 (0,0)	10/1 (0,0)
5º-15/12/04	15/0 (0,0)	6/0 (0,0)
6º- 01/04/05	15/0 (0,0)	8/0 (0,0)
7º- 01/09/05	15/0 (0,0)	10/0(0,0)
Total	101/4 (4,0)	61/9 (14,8)

* n= número total de pesquisados /número de positivos

No total, entre os 41 isolados de *P. aeruginosa* correspondentes à colonização de pacientes e contaminação de ambiente apresentaram resistência ao imipenem 65,9% (27/41) e aos demais antimicrobianos (67,4%), exceto a polimixina (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de colonização em pacientes e contaminação do ambiente

Antimicrobianos	Amostras		
	Colonização n=28(%)	Ambiente n=13(%)	Total de amostras resistentes n=41(%)
Aztreonam	17 (60,7)	9 (69,2)	26 (63,4)
Amicacina	25 (89,9)	13 (100,0)	48 (92,7)
Gentamicina	23 (82,1)	10 (52,6)	43 (80,4)
Cefoxitina	17 (60,7)	9 (69,2)	26 (63,4)
Ceftazidima	16 (57,1)	10 (76,9)	26 (63,4)
Ciprofloxacina	16 (57,1)	10 (78,9)	26 (65,9)
Imipenem	17 (60,7)	10 (76,9)	27 (65,9)
Levofloxacina	17 (60,7)	10 (76,9)	27 (65,5)
Meropenem	15 (53,6)	9 (69,2)	24 (58,5)
Piperacilina+tazobactam	17 (60,7)	6 (46,1)	23 (56,0)
Polimixina	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

As taxas dos fenótipos resistentes aos β -lactâmicos de importância epidemiológica nestas amostras foram: MBL- 57,7% e 46,1% pelos testes com EDTA e MPA, respectivamente, e AmpC induzida - 19,2%.

7.6-Investigação do surto por meio do estudo caso x controle no hospital (A)

Os fatores de risco significativos identificados em análise univariada ($p \leq 0,05$) nos casos de infecção por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem foram: idade ≥ 60 anos, hospitalização ≥ 7 dias, cirurgia, uso de CVC, presença de ventilação mecânica, ventilação mecânica ≥ 7 dias e uso prévio de antimicrobianos como cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenêmicos e vancomicina (Tabela 6).

Tabela 6. Análise univariada dos fatores de risco para infecções associadas à *P. aeruginosa* resistente ao imipenem em pacientes da UTI do hospital (A)

Fatores de risco	Paciente		P*	OR**	IC _{95%} ***
	Infectado n=47 (%)	Não infectado n=122 (%)			
Gênero					
Feminino	17 (36,2)	62 (50,8)			
Masculino	30 (63,8)	60 (49,2)	0,12	0,65	0,39-1,89
Idade (anos)					
≥ 60	11 (23,4)	50 (41,0)	0,05	1,85	1,02-3,36
Tempo de hospitalização, dias					
≥ 7	44 (93,6)	3 (16,4)	<0,001	0,27	0,14-0,53
Comorbidades					
Diabetes mellitus	03 (6,0)	07 (5,7)	1,00	1,08	0,41-2,89
Cardíaca	03 (6,0)	27 (22,0)	0,02	0,32	0,11-0,95
AIDS	02 (4,2)	00 (0,0)	0,07	3,71	2,89-4,76
Procedimentos invasivos					
Cateter venoso Central	30 (63,8)	110(90,2)	<0,001	0,37	0,24-0,57
Drenos	12 (25,5)	33 (27,0)	0,995	0,94	0,54-1,65
Ventilação mecânica (VM)	47 (100,0)	80 (11,5)	<0,001	7,92	2,00-31,30
Tempo de VM, dias					
≥ 7	40 (85,1)	14 (11,5)	<0,001	0,10	0,04-0,22
Trauma	12 (25,5)	22 (18,0)	0,381	1,36	0,80-2,33
Cirurgia	28 (59,5)	30 (24,6)	<0,001	2,82	1,73-4,60
Uso de antibióticos					
≥ 2	28 (59,6)	48 (39,3)	0,08	1,59	0,98-2,59
Cefalosporinas (3/4ª geração)	30 (64,0)	48 (39,3)	0,007	2,06	1,23-3,44
Carbapenêmicos	22 (46,8)	04 (3,2)	<0,001	4,84	3,27-7,16
Quinolonas	05 (10,6)	07 (5,7)	0,14	1,95	0,95-4,02
Vancomicina	13 (27,6)	14 (11,5)	0,019	2,01	1,23-3,28

* $P \leq 0,05$; **OR-Odds ratio; ***IC_{95%}-Intervalo de Confiança.

O uso de ventilação mecânica ≥ 7 dias ($p \leq 0,001$; OR 7,2; IC_{95%} 1,2-13,7), a traqueostomia ($p = 0,02$; OR= 4; IC_{95%} = 2,7-19,1) e de imipenem ($p=0,02$; OR= 2,7; IC_{95%} 2,7-

19,1) foram fatores contribuintes para as infecções por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem quando de análise multivariada (Tabela 7).

Tabela 7. Análise multivariada de fatores de risco para aquisição de infecções associadas à *P. aeruginosa* resistente ao imipenem em pacientes da UTI-do hospital (A)

Fator de risco	<i>P</i> *	OR**	IC _{95%} ***
Tempo de uso de VM \geq 7 dias	0,001	7,2	1,2-13,7
Traqueostomia	0,02	4	2,7-19,1
Uso de imipenem	0,02	2,7	2,7-19,1

* $P \leq 0,05$, **OR-Odds ratio; ***IC_{95%}-Intervalo de Confiança.

7.7- Análise do perfil de macrorestrição do crDNA de *P. aeruginosa*

Foram estudadas 24 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem, quanto ao perfil de macrorestrição do crDNA pela técnica de PFGE; correspondentes a 18 isolados de pacientes do hospital (A), e seis do hospital (B). Foram evidenciados sete clones: clone “A” (46,0%) foi predominante; seguido do “B” (25,0%), o clone “C” foi identificado em 3 isolados, os clones “D”, “E”, “F” e “G” em 2 isolados e 1 isolado (respectivamente) representados no dendrograma (Figura 6).

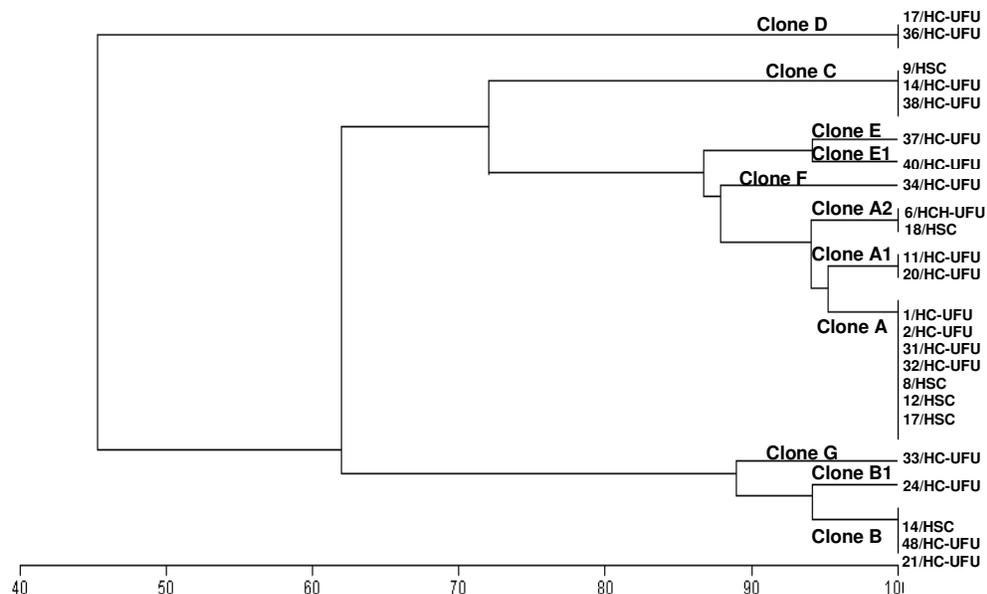


Figura 6. Resultado do dendrograma de uma análise computadorizada dos perfis do crDNA de *P. aeruginosa* em PFGE.

A Tabela 8 relaciona as 24 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem representadas de casos de infecções e colonizações nas duas unidades. Foram detectados sete perfis clonal no hospital (A) e três perfis no hospital B. A presença da porina M foi identificada predominantemente no clone A presente em amostras de *P. aeruginosa* provenientes do HSC e do HC-UFU e da porina D foi observada em amostras de *P. aeruginosa* sensível a meropenem. O fenótipo AmpC induzida foi identificado em 10 amostras particularmente nas pertencentes do clone A

Tabela 8. Características dos 24 isolados de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem produtoras de metalo- β -lactamase proveniente de infecções em pacientes internados nos Hospitais HC-UFU e HSC

<i>P. aeruginosa</i> / Hospital	Origem		Presença de porinas OprD, OprM	Perfil PFGE	PERFIL DE RESISTENCIA										AmpC induzida
	Data do isolamento	Infecção/ Colonização			AZT	CAZ	CFO	CPM	CIP	GET	IMP	MER	PIP/TZ	POL	
1-HC-UFU	10/11/2003	Infecção	Não testado	“A”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Positivo
2-HC-UFU	6/1/2004	Infecção	OprM	“A”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
8/HSC	22/1/2004	Infecção	OprM	“A”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
12/HSC	12/2/2004	Infecção	OprM	“A”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
17/HSC	5/5/2004	Infecção	Ausente	“A”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
31-HC-UFU	18/8/2004	Infecção	Ausente	“A”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
32-HC-UFU	8/10/2004	Infecção	Não testado	“A”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
11-HC-UFU	18/3/2004	Infecção	Ausente	“A1”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
20-HC-UFU	29/4/2004	Infecção	Não testado	“A1”	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	Negativo
6-HC-UFU	21/1/2004	Infecção	OprM	“A2”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Negativo
18/HSC	6/7/2004	Infecção	Ausente	“A2”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
14/HSC	13/3/2004	Infecção	Não testado	“B”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
48/HC-UFU	23/3/2004	Colonização	Não testado	“B”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
21-HC-UFU	9/5/2004	Infecção	Ausente	“B”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
24-HC-UFU	30/5/2004	Infecção	Não testado	“B1”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
9/HSC	23/1/2004	Infecção	Não testado	“C”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Positivo
14/HC-UFU	19/2/2004	Infecção	Não testado	“C”	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	Positivo
38/HC-UFU	11/4/2005	Infecção	OprD	“C”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Positivo
17/HC-UFU	24/4/2004	Colonização	OprD	“D”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
36/HC-UFU	11/2/2005	Infecção	Ausente	“D”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
37/HC-UFU	21/2/2005	Infecção	OprM	“E”	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	Negativo
40/HC-UFU	1/5/2005	Infecção	Não testado	“E1”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
34/HC-UFU	28/1/2005	Infecção	Não testado	“F”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo
33/HC-UFU	6/11/2004	Infecção	Ausente	“G”	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Negativo

Foi descrito um surto de infecção hospitalar por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem, em duas UTIs mistas de adultos nos hospitais (A) e (B), envolvendo um total de 68 pacientes, a maioria internada no hospital (A). Os aspectos da epidemiologia clássica, incluindo o caso-índice e as relações temporal e espacial, bem como a participação de profissionais de saúde e do ambiente foram considerados somente no hospital (A); e aqueles relativos a epidemiologia molecular nas amostras proveniente dos dois hospitais.

Cerca de 10% das infecções hospitalares são causadas por *P. aeruginosa*, sendo que, em UTIs, esse patógeno é o principal responsável por estas infecções (VINCENT et al, 1995; JONES et al, 2004). A infecção mais freqüente é a pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV), mas sua importância na etiologia de infecções de corrente sanguínea, trato urinário e sítio cirúrgico também é significativa (SPENCER, 1996; RICHARDS et al, 1999; GALES et al, 2001)

Embora essas infecções sejam usualmente endêmicas, há relatos de surtos por este microrganismo com resistência aos carbapenêmicos, sobretudo ao imipenem, nos quais predomina a pneumonia associada a ventilação mecânica (CRESPO et al, 2004; MAJUMDAR et al, 2004; PAGANI et al, 2005; ZAVASCKI et al, 2006). O surto descrito em nossa investigação incluiu mais de dois terços (70,6%) de pneumonias associadas à ventilação mecânica, seguindo-se pela ordem decrescente o trato urinário (11,7%), corrente sanguínea (8,8%) e sítio cirúrgico (8,8%). As PAVs por este patógeno estão associadas a uma taxa expressiva de mortalidade, evidenciada por Vallés et al (2005) na Espanha, Zavascki et al, 2006, no Brasil, e Ruiz, et al (2007) no Chile, onde relatam freqüências de mortalidade total em pacientes com PAVs por *P. aeruginosa* de 42,3%, 60,0%, 56,0%, respectivamente, em condições endêmicas. Em nossa investigação a mortalidade observada no hospital “B” foi maior (92,0%-11/12) quando comparada ao hospital (A) (73,0%-22/30), mas ambas muito

elevadas. O caso-índice do surto do hospital (A) correspondeu a uma PAV diagnosticada no (A), em novembro em uma paciente transferida do hospital (B) sem indício de infecção na ocasião.

A ocorrência de surtos por esse patógeno foi relatada em todos os continentes (DUBOIS et al, 2001; GIBB et al, 2002; CRESPO et al, 2004, PAGANI et al, 2005; KIKUCHI et al, 2007), incluindo no Brasil (GALES et al, 2001, ZAVASCKI et al, 2005). A situação é preocupante, considerando que essas amostras são multirresistentes aos antibióticos apresentando susceptibilidade somente a polimixina, antibiótico menos potente e mais tóxico (CARMELI et al, 1999; ROSSOLINI, MANTEGOLI, 2005) comprometendo o prognóstico quando da terapêutica.

O surto nas duas unidades iniciou-se a partir de novembro/03, sendo solucionado mais precocemente, em outubro/04, no hospital (B), por meio do fechamento da unidade, novas intervenções e desinfecção terminal. No hospital (A) as medidas de prevenção e controle instituídas resultaram numa diminuição de casos entre setembro/2004 a janeiro/2005 com um novo pico ocorrendo a partir de fevereiro/2005. Verificou-se uma relação temporal bem documentada entre os pacientes infectados na UTI deste último hospital com uma relação entre os pacientes.

A emergência e aquisição de microrganismos resistentes no âmbito hospitalar estão relacionadas com a pressão seletiva (PATERSON, 2002), exercida pelo uso de antibióticos de forma empírica e/ou sua disseminação horizontal, particularmente em UTIs onde, usualmente, há uma alta densidade de prescrição de antibióticos potentes e de largo espectro; sendo que, muitas vezes, sua utilização ocorre de maneira empírica (MACGOWANN, 1995; MOREIRA, 2008). A distinção entre estas formas de aquisição pode ser constatada pela tipagem molecular, sendo que a detecção de um único clone é sugestiva de transmissão horizontal, ao passo que a presença de vários é caracterizada pela pressão seletiva devido ao uso não racional de antibiótico ou contaminação endógena do paciente

(PATERSON, 2002). A prevalência de clones de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem foi observada em hospitais nos Estados Unidos (NNIS, 2004), bem como no Brasil (PELLEGRINO et al, 2002; FIGUEREDO-MENDES et al, 2005). Vários estudos descrevem a ocorrência de infecções relacionadas com a presença de um único clone ou clones predominantes em unidades distintas provenientes de diferentes regiões do Brasil (FIGUEREDO-MENDES et al, 2005) ou em diferentes unidades na mesma instituição (SADER et al, 1993; ARRUDA et al, 1999, FONSECA et al, 2006). No surto descrito no nosso estudo, em Uberlândia, foi relacionado com um clone predominante “A”.

No hospital B, de seis *P. aeruginosa* estudadas quanto ao perfil de macrorestrição do crDNA quatro apresentaram o perfil “A”, sugerindo uma disseminação clonal de *P. aeruginosa* de janeiro a julho/ 2004.

Entre as linhagens de *P. aeruginosa* com perfil “A” dos dois hospitais, 4 do hospital (B) e 7 do hospital (A), três delas apresentaram o gene *spm*, pela amplificação por PCR (dados não mostrados).

No hospital (B), também foi observado *P. aeruginosa* com o perfil “B” e “C” em março/2004 e janeiro/2004, respectivamente; estes mesmos perfis foram constatados no hospital (A) em março e maio/2004 (“B”) e fevereiro/2004 e abril/2005 (“C”), mas sem transferência dos pacientes relacionados.

O perfil de PFGE “C” foi detectado em *P. aeruginosa* isolada em fevereiro/2004 no hospital A e persistiu neste hospital até abril/2005 e pela amostragem estudada por PFGE, houve apenas estes dois casos de infecção por *P. aeruginosa* desse perfil neste hospital.

O perfil “D” ocorreu inicialmente em paciente colonizado em março/2004 e um ano após, foi constatada infecção em outro paciente por *P. aeruginosa* com este mesmo perfil.

O perfil PFGE “E” iniciou no hospital (A) em fevereiro/2005 e foi evidenciado em um caso de infecção em maio do mesmo ano. Os demais perfis de macrorestrição do crDNA

após PFGE (“F, G”) foram pontuais, relacionados com a colonização e infecção, respectivamente.

Cerca de um terço dos pacientes hospitalizados fazem uso de antibióticos desses, aproximadamente 50,0%, desnecessariamente; o consumo excessivo de antibióticos na UTI do hospital (A), incluindo carbapenêmicos é superior em DDDs (MOREIRA, 2008), ao das UTIs americanas (NNIS, 2004) e o uso pouco judicioso de antibióticos como terapêutica predominantemente empírica com ausência de um descalonamento (ROCHA et al, 2008) certamente contribuíram para a aquisição de amostra epidêmica pelos pacientes.

A importância do ambiente é valorizado por alguns pesquisadores (BERTRAND et al, 2001, CRESPO et al, 2004) e não pode ser descartada. O fim do surto no hospital (B) se deu após o fechamento da unidade seguida de desinfecção terminal, ao contrário do observado no hospital (A), no qual as medidas não foram adotadas, e atualmente, o microrganismo é endêmico e presente também nas unidades não críticas (CARVALHO, 2007).

Entre os fatores de risco a idade ≥ 60 anos, gravidade da doença (DEFEZ et al, 2004, NOÛER et al, 2005, ZAVASCKI et al 2005b) e o uso de procedimentos invasivos como prótese ventilatória por mais que quatro dias nas PAVs (RELLO et al, 2006) e cateter vascular central nas infecções de corrente sanguínea (MARRA, 2007) destacam-se nas infecções por *P. aeruginosa*. No surto investigado, a idade superior a 60 anos nos pacientes do hospital (B) foi mais freqüente; entretanto os procedimentos invasivos como ventilação mecânica e cateter vascular central foram observados em todos pacientes.

Quando da avaliação de pacientes com infecções por *P. aeruginosa* resistente ao imipenem, o uso de antimicrobianos, hospitalização prévia, gravidade da doença, ocorrência de cirurgia e imunossupressão (ARRUDA et al, 1999; CAO et al, 2004, NOÛER et al, 2005), além dos procedimentos invasivos, são os fatores predisponentes mais associados (NOÛER et al, 2005). Como foi referido no parágrafo anterior a idade >60 anos foi um fator de risco

para os episódios de infecções por este microrganismo no nosso estudo, a exemplo do relatado por Zavascki et al (2005) em investigação realizada no Rio Grande do Sul.

Adicionalmente, a hospitalização prolongada, uso de cateter vascular central, ventilação mecânica e cirurgia também foram significativamente relacionados com as infecções por esse microrganismo a exemplo do descrito por outros autores (HARRIS et al, 2002; CAO et al, 2004; ALOUSH et al, 2006).

A utilização do imipenem está relacionada com a emergência de *P aeruginosa* resistente ao imipenem (TROILET et al, 1998; FORTALEZA et al, 2006), bem como o de cefalosporinas de amplo espectro (ALOUSH et al 2006), aminoglicosídeos (HARRIS et al, 2002; ALOUSH et al, 2006), vancomicina (HARRIS et al, 2002; NOÛER et al, 2005), e fluorquinolonas (NOÛER et al, 2005). Em nosso estudo, o uso de carbapenêmico, cefalosporinas de amplo espectro e vancomicina foram fatores de risco significativos na análise univariada, mas quando da análise multivariada apenas o uso de prótese ventilatória por ≥ 7 dias, traqueostomia e a prescrição de imipenem foram relacionados às infecções por *P. aeruginosa* resistente a este β -lactâmico, achados semelhantes aos relatados por outros estudos (CAO et al, 2004; FORTALEZA et al, 2006; NOÛER et al 2005, ZAVASKI, et al, 2005b, ALOUSH et al, 2006)

A resistência em *P. aeruginosa* aos agentes pseudomonicidas: β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas aumentou consideravelmente com a utilização desses antimicrobianos no tratamento empírico de infecções por esse microrganismo em pacientes de UTIs (GALES et al, 2001; ANDRADE, et al, 2003; LAGATOLLA et al, 2004; ZAVASCKI et al, 2004; LANDMAN et al, 2005; NOÛER et al, 2005; LODISE et al, 2007a). A prevalência de amostras multirresistentes diminui as opções de tratamento de infecções por esse microrganismo (LODISE et al, 2007b) e a introdução dos carbapenêmicos em função do aumento de bactérias da família Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa* produtoras de β -lactamases

de amplo espectro (NORDMANN, 2002) reduziu ao emprego da associação piperaciclina com tazobactam e polimixina no tratamento de infecções por estes microrganismos multirresistentes (LEVIN et al, 1999; CARMELI et al, 1999; ROSSOLINI, MANGATEGOLI, 2005) em função da resistência adquirida ao primeiro que tornou-se comum (LIVERMORE, 2001; ROSSOLINI, MANGATEGOLI, 2005), enquanto que a polimixina é considerada tóxica e apresenta menor potência (ROSSOLINI, MANGATEGOLI, 2005)

Dados do programa SENTRY relatam uma taxa de resistência a imipenem em isolados de *P. aeruginosa* de 49,0% no Brasil e de 37,8% em outros países da América Latina (SADER et al, 2004). As frequências de resistência nas amostras de infecções em nosso estudo, foram mais elevadas correspondendo a 95,6%, com susceptibilidade apenas para polimixina.

A resistência adquirida aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* está relacionada à presença de vários mecanismos, cujos genes responsáveis estão associados a vetores de resistência com destaque para os integrons de classe 1 e transposons (LIVERMORE et al, 2002; DEPARDIEU et al, 2007; QUEENAN, BUSH, 2007). A resistência aos β -lactâmicos decorre principalmente da produção de β -lactamases, sobressaindo as de amplo espectro (ESBL, AmpC e MBL) (NORDMANN, POIREL, 2002; ROSSOLINI, MANGATEGOLI, 2005). Adicionalmente, a diminuição na permeabilidade da membrana pela perda de porinas da membrana externa e a expressão de bombas de efluxo contribuem para resistência a estes antibióticos (LIVERMORE, 2002; QUEENAN, BUSH, 2007).

As ESBLs são β -lactamases mais freqüentemente identificadas em amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LIVERMORE, 1995; DEPARDIEU et al, 2007), porém, nas últimas décadas o aumento do uso de cefalosporinas de amplo espectro em terapêutica empírica nos pacientes críticos resultou na emergência de *P. aeruginosa* produtora de enzimas variantes TEM, SHV, PER-1 e GES (CARMELI, 1999; NORDMANN et al, 1998;

DOCQUIER et al, 2001, PELLEGRINO et al, 2002). Em nosso estudo, não detectamos fenotipicamente a presença de ESBL nos isolados.

Diferente do observado para as ESBLs, a prevalência de amostras de *P. aeruginosa* produtora de AmpC induzida é pouco detectada fenotipicamente excetuando-se na Índia onde sua frequência é crescente com relatos de 17,3% (SHAHID et al, 2003), 20,0% (ARORA et al, 2005), e 22,0% (BHATTACHARJEE et al, 2008). A detecção desse fenótipo é mais difícil, sendo assim dependente da utilização de testes genotípicos, o que justifica os poucos dados (DUNNE JR, HARDIN, 2005). Em nosso estudo, a pesquisa desse fenótipo entre as amostras de *P. aeruginosa* foi realizada pelo teste descrito por Dunne Jr, Hardin (2005), com 37,0% positivas para esse fenótipo.

Atualmente, a produção de metalo- β -lactamase é o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, além de hidrolisar todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (LIVERMORE, WOODFORD, 2000; WALSH et al, 2005; MENDES et al, 2006). Estas enzimas são codificadas por genes presentes em integrons principalmente de classe 1 que facilita sua disseminação no ambiente hospitalar (WALSH et al, 2005; MENDES et al, 2006).

A disseminação dos genes para MBL é resultante do consumo excessivo de cefalosporinas de largo espectro e principalmente de carbapenêmicos (imipenem) (LOMBARDI et al, 2002; LEE et al, 2003). A exemplo das β -lactamases, elas podem ser divididas em cromossomais e transferíveis, essas codificadas por genes presentes em transposon e integron, identificadas nas seguintes subclasses: IMP, SIM, VIM, GIM e SPM (LIVERMORE, WOODFORD, 2000; WALSH et al, 2005; MENDES et al, 2006) e apresentam distribuições geográficas particulares (LAURETTI et al, 1999; TOLEMAN et al, 2002; CASTANHEIRA et al, 2004).

As MBLs foram descritas em amostras de *P. aeruginosa* relacionadas com situações endêmicas e epidêmicas em todo o mundo como descrito previamente (GALES et al, 2003; CRESPO et al, 2004; PAGANI, et al 2005; LAGATOLLA et al, 2006; ZAVASCKI et al,,

2006; HUANG et al, 2007). No Brasil, há relatos da presença do fenótipo em percentuais que variam de 20,0% a 60,0% (GALES et al, 2003; MAGALHAES et al, 2005; ZAVASCKI et al, 2005a). Entretanto, por se tratar de amostras epidêmicas, no surto descrito em Uberlândia, aproximadamente 90,0% dos isolados foram caracterizadas como produtoras de MBL, e diferentemente do relatado na maioria dos estudos (GALES et al, 2003; SADER et al, 2005; VIEIRA et al, 2005) foram resistentes ao aztreonam. Zavascki et al (2006) também evidenciaram resistência a este monobactâmico em amostras de *P. aeruginosa* produtora de MBLs, proveniente de casos de infecção no hospital do Rio Grande do Sul.

No Brasil, Gales et al (2003) relataram amostras produtoras de MBL tipo SPM-1 disseminada em hospitais de diferentes regiões, enzima restrita apenas no Brasil. Sader e colaboradores (2005) também evidenciaram a ocorrência de MBL da classe IMP-1 e VIM-1 em pacientes internados em um hospital de São Paulo.

A resistência aos carbapenêmicos pode ser também associada à diminuição da expressão ou perda da porina OprD, conferindo resistência ao imipenem e uma baixa resistência ao meropenem (KÖHLER et al, 1999; LIVERMORE, 2002). Em algumas amostras, a expressão reduzida ou a perda dessa porina D somada à hiperprodução da bomba de efluxo MexAB-OprM, interfere na ação dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos favorecendo a multirresistência. Dentre as 14 amostras de *P. aeruginosa* submetidas à eletroforese em gel de poliacríamida, evidenciou-se a ausência de OprD em 86,0% (12/14) e a presença de uma banda mais forte e visível com peso molecular de 49 Kda correspondendo ao peso molecular da proteína OprM em 29,0%(4/14) amostras provavelmente associada com a ativação da bomba de efluxo MexAB-OprM em *P. aeruginosa*, dados semelhantes ao observado por Dubois et al (2001).

9-CONCLUSÕES

A partir do caso-índice detectado no hospital (A), proveniente de uma internação prévia no hospital (B), evidenciou-se uma relação temporal e espacial entre os pacientes do hospital (A). Pela análise multivariada evidenciou-se os seguintes fatores de risco significativos ($p \leq 0,05$) para aquisição de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem: ventilação mecânica ≥ 7 dias, traqueostomia e prescrição de imipenem. A taxa de mortalidade total foi muito alta (60,0%) reflexo dos fatores de risco observados e possivelmente das características da amostra epidêmica.

A multiresistência das amostras de *P. aeruginosa* resistente aos imipenem está associada à produção de metalo- β -lactamase, e possivelmente, somado a perda da porina D, presença de porina M e a atividade de AmpC induzida.

Observou-se uma policlonalidade entre as amostras do hospital (A) durante o período estudado com o predomínio do clone “A” detectado no caso-índice e nos primeiros 12 meses do surto e no hospital (B) entre os meses de janeiro e julho de 2005.

O surto resultou de uma transmissão horizontal entre os pacientes, possivelmente associado à baixa adesão nas práticas de higiene das mãos, apesar do microrganismo não ter sido recuperado de profissionais de saúde. A disseminação clonal de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem parece estar relacionada com a transferência interhospitalar do paciente índice, prática que é comum entre hospitais no país.

Em função da dimensão e a gravidade do surto somado aos dados epidemiológicos alertam para necessidade de uma reavaliação das práticas de prevenção e controle de IHS e uso racional de antimicrobianos principalmente nas unidades críticas

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALOUSH V., NAVON-VENEZIA S., SEIGMAN-IGRA Y., CABILI S., CARMELI Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.50, n.1, p.43-48, 2006.

ALP E., VOSS A. Ventilator associated pneumonia and infection control. **Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v.5, n.7, p.711-717, 2006.

ANDRADE SS, JONES RN, GALES AC, SADER HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American Medical Centers: 5 years report of the SENTRY antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.52, p-140-141. 2003

ARAKAWA Y., SHIBATA N., SHIBAYAMA K., KUROKAWA H., YAGI T., FUJIWARA H., GOTO M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase- producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. **Journal Clinical of Microbiology** Washignton. v.38, n.1, p.40-43, 2000

ARORA S., BAL M. AmpC β -lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. **Indian Medicine Resarch**, Índia, v.122, p.224-233,2005

ARRUDA EA., MARINHO IS., BOULOS M., SUMIKO SI., CAIAFFA HH., MENDES CM., OPLUSTIL CP., SADER H.,LEVY CE.,LEVIN AS. Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection Control Hospital Epidemiology**, United States, v.20, n.9, p.620-623, 1999.

BECKS VE., LORENZONI, NM. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit: a possible link to contaminated hand lotion. **American Journal of Infection Control**, United States , v.23, p.396-398, 1995.

BENNEKOV T., COLDING H., OJENIYI B., BENTZON MW., HØIBY N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **Journal Clinical of Microbiology**. Washignton, v.34,n. 1,p. 202-204, 1996.

*ELABORADA SEGUNDO NORMAS DA ABNT, 2008

BERTRAND X., THOUVEREZ M., PARTRY C., BALVAY P., TALON D. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.7, p.706-708, 2001a.

BERTRAND X., THOUVEREZ M., TALON D., BOILLOT A., CAPELLIER G., FLORIOT C., HÉLIAS JP. Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. **Intensive Care Medicine**, Berlin, 2001b.

BHATTACHARJEE A, ANUPURBA S, GAUR A, SEN MR Prevalence of inducible AmpC β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in northern India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, India, v.22, n.1, p89-90, 2008.

BINGEN ES., BONACORSI S., ROHRLICH P., et al. Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v.34, p. 3226-3229, 1996.

BONTEN MJM., BERGMANS DCJJ., SPEIJER H., STOBBERINGH EE., Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units, implications for infection control. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, New York, v.160, p.1212-1219, 1999.

BORGES LFA., ROCHA LA., GONTIJO FILHO PP. Adesão á pratica de higienização das mãos e sua associação ás taxas de infecção hospitalar em um hospital universitário mineiro. In **Anais do 2º Congresso Mineiro de Infectologia**, Uberlândia, 2006.

BUKHOLM G, TANNAES T, KJELSBORG ABB, SMITH-ERICHSEN N. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* associated with increased risk of patient death in an intensive care unit. **Infection Control Hospital Epidemiology**, United States, v.23, p.-441-446, 2002.

CAO B, WANG H, SUN H, ZHU Y, CHEN M. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal Hospital Infection**, London, v.57, p.112-118, 2004.

CARMELI Y., TROILLET N., ELIOPAULOS GM., Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different anti-pseudomonal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, p.1379-1382, 1999.

CARVALHO RH. Bactérias resistentes e multiresistentes a antibióticos nos pacientes internados em uma UTI de adultos de Hospital Universitário Brasileiro. 2007. Dissertação Mestrado em Imunologia e Parasitologia aplicadas) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p.50.

CASTANHEIRA M., MENDES RE., WALSH TR., GALES AC., JONES RN. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n.6, p.2344-2345, 2004.

CHASTRE J., FAGON JY. Ventilator-associated pneumonia. **American Journal Critical Care Medicine**, Baltimore, v.165, p.867-903, 2002.

CIPRIANO R, VIEIRA VV., FONSECA EL., RANGEL K., FREITAS FS., VIECENTE ACP., Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the bla_{SPM} clone, spread in Hospitals in a Brazilian Amazon city. **Microbial Drug Resistance**, United States, v.13, p.142-146, 2007.

CRESPO, M.P., WOODFORD N., SINCLAIR, A., KAUFMANN, M.E., TURTON J., GLOVER J., VELEZ JD., CASTAÑEDA, CR., RECALDE, M., LIVERMORE, DM.. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in tertiary care center in Cali, Colombia, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n.11, p.5094-5101, 2004.

COBBEN NAM., DRENT M., JONKERS M., WOUTERS EFM., VANECHOUTTE M., STOBBERINGH EE. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. **Journal Hospital Infections**, Atlanta, v. 33, p.63-70, 1996.

COPYRIGHT STATSOFT, Inc. 1993. *Statistic for Windows* 4.5.

CORTES, P, MARISCAL D., VALLÉS J., RELLO J., CALL P. Presence of polyclonal *Pseudomonas aeruginosa* in a intensive care unit: a 27 month prospective study on molecular epidemiology. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.22, p720-721, 2001.

DEAN, AG. Epi-Info, Versão 5.0: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Stone Monatain. G.A: USD, Ins;1995.

DEFEZ C., FABBRO-PERAY P., BOUZIGES N., GOUBY A., MAHAMAT A., DAURÈS JP., SOTTO A. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. **Journal of Hospital Infection**, London, v.57, p.209-216, 2004.

DEPARDIEU F., PODGLAJEN I., LECLERCQ R., COLLATZ E, COURVALINI P. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. **Clinical Microbiology Reviews**, London, v. 20, n. 1, p. 79–114, 2007.

DEPLANO A., DENIS O., PORIEL L., HOCQUET D., NONBOFF C., BYL B., NORDMAMM P., VICENT JL., STRUELENS MJ. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n3, p.1198-1204, 2005.

DOCQUIER JD., LUZZARO F., AMICOSANTE G., TONIOLO A., ROSSOLINI GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. **Emerging Infectious Diseases**, United states, v.7, n.5, p.910-911, 2001

DUBOIS, V., ARPIN, C., MELON, M., MELON, B., ANDRE, C., FRIGO, C., QUENTIN, C. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: Efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n.6, p.2072-2078, 2001.

DUNNE, W. M. Jr., HARDIN D. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patients isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, and *Serratia spp.*, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n 12, p 5945-5949, 2005.

FIGUEREDO-MENDES CM., SINTO S., MELLO-SAMPAIO JL., CARDOSO-LEÃO S., OPLUSTIL CP., TURNER P, VEIGA-KIFFER, CR. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, Espanha, v.23, n.7, p.402-405, 2005.

FONSECA EL.,VIEIRA VV.,CIPRIANO R.,VICENTE ACP. Emergence of *dhfr*XVb and *bla*_{CARB-4} gene cassettes in class I integrons from clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Amazon region. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, p.81-84, 2006.

FORTALEZA CMCB., FREIRE MP., MOREIRA FILHO DC., RAMOS MC. Risk factors for recovery of Imipenem-or ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among patients admitted to teaching hospital in Brazil. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.27, n.9, p.901-906, 2006.

FOSTER DH., DASCHNER FD. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Alemanha, v.17, p.73-77, 1998.

GALES AC., JONES RN., TURNIDGE J., RENNIE R, RAMPHAL R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical of Infections Diseases**, United States, v.32, suppl.2, p.146-155, 2001.

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

GALES AC, TORRES PL, VILARINHO DS, MELO RS, SILVA CF, CEREDA RF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. São Paulo, v. 8, n.4, p.267-71, 2004.

GAMER JS., JARVIS WR., EMORI T.G., HUGHES J. M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **American Journal Infection Control**, *New York*, v16, p 128-140 1998.

GASPARETO PB., MARTINS AF., ZAVASCKI, AP., BARTH, AL. Occurrence of bla_{SPM-1} and bla_{IMP-1} genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **The Brazilian Journal of Microbiology**, Salvador, v 38, p 108-109, 2007.

GIBB AP., TRIBUDDHARAT C., MOORE RA, LOUIE TJ., KRULICKI W., LIVRMORE DM., PALEPOU MF., WOODFORD N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a bla_{IMP} allele, bla_{IMP-7}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v.46, n.1, p.255-258, 2002.

GIWEREMAN B, LAMBERT PA, ROSDAHL VT, SHAND GH, HOIBY N. Rapid emergence of resistance *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed β -lactamase producing strains. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.26, p.247-259, 1990.

GOOSSENS, H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v.9, n.9, p.980-983, 2003.

GORBACH, S.L., BARTLETT, J.G., BLACKLOW, N.R. Epidemiology of nosocomial infection. In: GORBACH, S.L., BARTLETT, J.G., BLACKLOW, N.R **Infectious Diseases**. Philadelphia: W. B. Sanders Company, 1992. Cap.13, p.96-106.

GRAF, F.M., MARTIN, E. The intensive care physician and control of antimicrobial resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v.39, p.2961-2963, 2000.

HARRIS AD, SMITH D, JOHNSON JÁ, BRADHAM DD, ROGHMANN MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases, United States**, v.34, p.340-45, 2002.

HOCQUET, D., BERTRAND, X., KOHLER, T., TOLON, D., PLÉSIOT, P. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 47, n.6, p.1887-1894, 2003.

HUANG YT, CHANG SC, LAUDERDALE TL, YANG AJ, WANG JT. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, United States, v.59, n.2, p.211-216, 2007.

JONES RN., DESHPAND L., FRISTSCHE TR., SADER HS. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYTIC programme (USA, 1999-2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, United States, v.49, p.211-216, 2004.

JUAN C., MACIÁ MD., GUTIÉRREZ O., VIDAL C., PÉREZ JL., OLIVER A. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas*

aeruginosa clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 49, n.11, p.4733-4738, 2005.

KIFFER C, HSIUNG A, OPLUSTIL C, SAMPAIO J, SAKAGAMI E, TURNER P, MENDES C; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal Infections Diseases**, São Paulo, v.9, n.3, p.216-24, 2005.

KIKUCHI T, NAGASHIMA G, TAGUCHI K, KURAISHI H, NEMOTO H, YAMANAKA M, KAWANO R, UGAJIN K, TAZAWA S, MARUMO K. Contaminated oral intubation equipment associated with an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas* in an intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, London, v.65, n.1, p.54-57,2007.

KISKA DL., GILLIGAN PH. *Pseudomonas*. In: MURRAY PR., BARON MA., PFALLER, MA ., TEMNOVER FC., YOLKEN RH. (eds), **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999. p. 516-526.

KLUYTMANS J. Surgical infections including burns. In WENZEL R.P., editor. **Prevention and control of nosocomial infections**. 3 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997.p.841-865.

KLUYTMANS-VANDERBERGH MFQ; KLUYTMANS JAJW. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris v. 12, Supl. 1, p.9-15, 2006.

KOH TH, WANG GC, SNG LH. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. **Journal Clinical of Microbiology**. Washington v.42, n.11, p.5378-80, 2004.

KÖHLER T, EPP SF, CURTY LK, PECHÈRE JC. *Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Bacteriology**. United States V.181, n 20, p 6300-6305, 1999

LAGATOLLA C., TONIN EA., MONTI-BRAGADIN C., DOLZANI L., GOMBAC F., BEARZI C., EDALUCCI E., GIONECHETTI F., ROSSOLINI GM. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v.10, n.3, p.535-538, 2004

LANDMAN D, SALVANI JK, BRATU S, QUALE J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v.43, n.11, p. 5639-5641, 2005.

LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R, ROSSOLINI GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, n.7, p.1584-1590,1999.

LEE K, LEE WG, UH Y, HA GY, CHO J, CHONG Y; KOREAN NATIONWIDE SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GROUP. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v.9, n.7, p.868-871, 2003.

LEVIN AS., BARONE AA., PENÇO J., SANTOS MV., MARINHO IS., ARRUDA EA., MANRIQUE EI., COSTA SF. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infection Diseases**, United States, v.28, n.5, p.1008-1011, 1999.

LIVERMORE DM. Bacterial resistance to carbapenems. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, United States, v.390, p.25-47, 1995.

LIVERMORE, D.M., WOODFORD N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion in Microbiology**, England v3, p489-495, 2000.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? **Clinical Infection Diseases**, United States, v.34, p.634-640, 2002.

LODISE TP. JR., MILLER C., PATEL N., GRAVES J., MCNUTT LA. Identification of patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk of infection with carbapenem-resistant isolates. **Infection Control Hospital Epidemiology**, United States, v 28, n.8, p.959-965, 2007a.

LODISE TP JR., LOMAESTRO B., DRUSANO GL. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. **Clinical Infection Diseases**, United States, v. 44, n. 3, p.357-363, 2007b.

LODGE JM., PIDDOCK LJ. The control of class I beta-lactamase expression in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 28, p. 167-172, 1991.

LOMBARDI G., LUZZARO F., DOCQUIER JD., RICCIO ML., PERILLI M., COLÌ A., AMICOSANTE G., ROSSOLINI GM., TONIOLO A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.11,p.4051-4055, 2002.

MACGOWAN JE., METCHOCK B., Infection Central Epidemiology and Clinical Microbiology. In: MURRAY PR., BARON EJ., PFALLER MA., TENOVER FC., YOLKEN RH. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**, P.C.: ASM Press, Washington, 1995, p. 182-189.

MAGALHAES V., LINS AK., MAGALHAES M. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Salvador, v.36, p.123-125, 2005.

MAJUMDAR S., KIRBY.A., BERRY N., WILLIAMS C., HASSAN I., EDDLESTON J., BURNIE J.P. A outbreak of imipinem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit, Letter to editor, **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.58, n.2, p.160-161, 2004.

MAYHALL CG. Nosocomial pneumonia: Diagnosis and treatment. **Infection Diseases Clinical North American**, v.11; p.427, 1997.

MARRA AR., PEREIRA CAP., GALES AC., MENEZES LC., CAL RGR., de SOUZA JMA., EDMOND MB., FARO C., WEY SB. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase producing pseudomonas aeruginosa: epidemiology, microbiology and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.50, n.1, p.388-390, 2007.

MASUDA N., SAKAGAWA E., OHYA S. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.39, n.3, p. 645-649, 1995.

MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, PICCOLI P, LAURETTI L, RICCIO ML, ROSSOLINI GM, FONTANA R. Carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Germany, v.18, n.6, p.455-456, 1999.

MENDES RE, CASTANHEIRA M, PIGNATARI ACC, GALES AC. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.42 n.2, p.103-13, 2006.

MOREIRA MR., Consumo de antibióticos, fatores de risco e evolução de pneumonia associada a ventilação por *Staphylococcus aureus* sensível ou resistente á oxacilina em pacientes internados na unidade de terapia intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro. 2008. **(Dissertação)** Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia , p51.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance Standards Antimicrobial Disk Susceptibility tests, Approved Standards M2-A8, v.24, n.1, NCCLS, 2004a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Screening and confirmatory tests for ESBLs in *Klebsiella pneumoniae*, *K.oxytoca* and *E.coli* Approved Standards M2-A8, v.24, n.1, NCCLS, 2004b.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June2004, issued October 2004. **American Journal Infection Control**, NewYork. v. 32, p.470-485, 2004.

NIKAIDO H. Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics. **Pharmacology Therapeutics**, England, v. 27, p. 197-231, 1995.

NOCIARI MM, CATALANO M, TORRERO M, SORDELLI DO. *Pseudomonas aeruginosa* ribotyping: stability and interpretation of ribosomal operon restriction patterns. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.25, n.1, p.27-33, 1996.

NORDMANN P, GUIBERT M.Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington,v.42, n.2, p.128-131, 1998.

NORDMANN P, POIREL L.Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.8,n.6,321-331,2002

NOUÉR SA, NUCCI M, DE-OLIVEIRA MP, PELLEGRINO FLPC, MOREIRA BM. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM Metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington. v.49, p. 3663-3667, 2005.

NOSOCOMIAL PATHOGENS RESISTANCE SURVEILLANCE (NPRS) Study Group. Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacilli from intensive care units from 1994 to 2001 in China. **National. Medicine Journal China**, China, v 83, p. 385-390, 2003.

OHARA T, ITOU K. Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. **Internal Medicine**, Japan, v. 42, p.1072-1076, 2003.

ORTEGA B., GROENEVELD J., SCHULTSZ, C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. in critically ill patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, United States, v. 25, p 825-831, 2004.

PAGANI L., COLINON C., MIGLIAVACCA R., LABONIA M., DOCQUIER JD., NUCLEO E., SPALLA M., LI BERGOLI M., ROSSOLINI GM. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.8,p.3824-3828, 2005.

PARAMYTHIOTOU E., LUCET JC, TIMSIT JF., VANJAK D., PAUGAM-BURTZ C., TROUILLET JL., BELLOC S., KASSIS N., KARABINIS A., ANDREMONT A. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity, **Clinical Infection Diseases**, United States, v.38, p.670-677, 2004.

PATERSON DL. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: a 21 st-century approach, **Clinical Infection Diseases**, United States, v.34, p.1564-1567, 2002.

PATZER J., TOLEMANN MA., DESHPANDE LM., KAMINSKA W., DZIERZANOWSKA D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harboring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001) **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.53, p.451-456, 2004.

PELLEGRINO FLP., TEIXEIRA LM., CARVALHO SMG., NOUÉR SA., OLIVEIRA MP., SAMPAIO JLM., FREITAS A., FERREIRA ALP., AMAIN ELT., RILEY LW., MOREIRA BM.. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, Washington v. 40, p. 2420-2424, 2002.

PFALLER MA, WENDT C, HOLLIS RJ, WENZEL RP, FRITSCHER SJ, NEUBAUER JJ, HERWALDT LA. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.25, n.1, p.1-8, 1996.

POOLACK M. *Pseudomonas aeruginosa* . In: MANDELL GL, BENNETT JE., DOLIN R, editors. **Principles and practice of infectious diseases**. 4 ed. New York: Churchill Livingstones; 1995. p.1980-2003.

POOLE, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology** Switzerland, v.3, p. 255-264, 2001.

PUWBWE, L., PIDDOCK, L. J. V. Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States,v.47, n.6, p. 1887-1894, 2003.

QUEENAN AM, BUSH K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Philadelphia, v. 20, p.440-448, 2007.

RELLO, J., ALLEGRI, C., RODRIGUEZ A, VIDAUR L, SIRGO G, GOMEZ F, AGBAHT K, POBO A, DIAZ E. Risk factors for ventilator-associated pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* in presence of recent antibiotic exposure. **Anesthesiology**, United States, v.105, p.709-714, 2006.

RENDERS N, RÖMLING Y, VERBRUGH H, VAN BELKUM A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. **Journal Clinical Microbiologic**. v. 34, n.12, p.3190-3195, 1996.

RICHARDS, M. J., EDWARDS, J. R., CULVER, D. H., GAYNES R. Nosocomial infections in medical intensive care units in the united States. NATIONAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM (NISS). **Critical Care Medicine**, United States, v. 27, p. 887-892, 1999.

RICHET H. Management of an outbreak of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* **Annual France Anesthesiology Reanim**. França, v. 22, p. 544-547. 2003.

ROCHA LD., VILELA CA., CEZÁRIO RC., ALMEIDA AB., GONTIJO FILHO PP. Ventilator-associated pneumonia in an adult clinical-surgical intensive care unit of a Brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo,v.12, n.1, p.80-85, 2008

ROSSOLINI G.M., MANGATENGOLI E. Tratament and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infections**, Paris, v. 11, S 4, p17-32, 2005

RUIZ, L., DOMINGUEZ, M.A., RUIZ,N., VIÑAS,M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting, **Archives of Medical Research**, United States v.35, p.251-257, 2004.

RUIZ MC, GUERRERO J., ROMERO CP. Etiología de la neumonía asociada a ventilación mecánica en un hospital clínico. Asociación con co-morbilidad, uso previo de antimicrobianos y mortalidad. **Revista Chilena de Infección**, Chile, v.24, n.2, p131-136, 2007.

SADER HS., PIGNATARI AC., LEME, IL., BURATTINI MN., TANCRESI R., HOLLIS RJ., JONES RN. Epidemiology typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from in outbreak in an intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, United States, v. 17, p 13-18, 1993.

SADER HS., GALES AC., PFALLER MA., MENDES RE., ZOCCOLI C., BARTH A., JONES RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER HS., JONES RN., GALES AC., SILVA JB., PIGNATARI AC., SENTRY Participants Group (Latin America) SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, São Paulo, v.8, n.1, p.25-79, 2004.

SADER HS., REIS AO., SILBERT S., GALES AC. IMPs, VIMs and SPMs the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian Hospital **Clinical Microbiology and Infection**, Paris v.11, p73-76,2005.

SCHWEIZER, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and relate bacteria: unanswered questions. **Genetics and molecular Research, Brazil**, v.2, n.1, p.48-62, 2003.

SHAHID M., MALIK A. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harboring R-plasmids and AmpC β -lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of North India, **FEMS Microbiology Letters**, England, v.228, p.181-186, 2003.

SPANCER RC. Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. **European Journal Clinical Microbiology Infection Diseases**. Alemanha, v. 15, p 281-285, 1996.

TENOVER, F. C., et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, United States, v. 18, p. 426-439, 1995.

THOUNG, M., ARVANTI, K., RUIMY, R., de la SALMONIERE, P., SACNVIC-HANIEG, A., LUERT, J. C., RÉGINER, B. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* risk factors for carriage acquisition in intensive care unit. **Journal Hospital Infection**, London, v. 53, p.274-282, 2003.

TOLEMAN MA., SIMM AM., MURPHY TA., GALES AC., BIEDENBACH DJ., JONES RN., WASH TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin American: report from the SENTRY antimicrobial Surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.50, p. 673-679, 2002.

TRINDADE, P. A.; PACHECO, R. L.; COSTA, S. F.; ROSSI, F.; BARONE, A A ; MAMIZUKA, E. M.; LEVIN, A. S. Prevalence of *SCCmec* type IV in a Nosocomial

bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 43, n. 7, p. 3435-3437, 2005.

TROUILLET JL., CHASTRE J, VUAGNAT A, JOLY-GUILLOU ML., COMBAUX D, DOMBRET MC., GIBERT C. , Ventilator associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, United States v.157, n. 2, p 531-539, 1998.

VALLÉS J, MARISCAL D. Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*, **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, Espanha, v.23, S.3, p.30-36, 2005.

VICENT JL; BIHARI DJ., SUTER PM., BRUINING HA., MRCPSYCH JW., NICOLAS-CHANOIN MH., WOLFF M., SPENCER RC., HEMMER M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care (EPIC) study. **JAMA**, United States, v. 274, n 8, p. 639-644, 1995.

VICENT JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **The Lancet**, England, v.361, p.2068-2077, 2003

ZABORINA O., KOHLER JE., WANG Y., BETHEL C., SHEVCHENKO O., WU L., URNER JR., ALVERDY JC. Identification of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, England, v5, p 1-8, 2006.

ZAVASCKI AP., CRUZ RP., GOLDANI LZ. High rate of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil, **Infection Control and Hospital Epidemiology**, United States, v. 25, p.805-807, 2004.

ZAVASCKI AP.,GASPARETO PB., MARTINS AF.,GONÇALVES AL, BARTH AL., Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1metallo- β -lactamases in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.56, p.1148-1151, 2005.

ZAVASCKI AP., CRUZ RP., GOLDANI LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. **Journal Hospital Infection**, London, v.59, p-96-101, 2005.

ZAVASKI AP., BARTH AL., FERNANDES JF., MORO ALD., GONÇALVES ALS., GOLDANI LZ. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Critical Care**, England, v.10, p-100-110, 2006.

WANG G, WHITTAM TS, BERG CM, BERG DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic acids research**, England, v. 25, n.21, p. 5930-3, 1993.

WASH TR, TOLEMAN MA, PORIEL L, NORDMANN P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, Philadelphia, v.18, p.306-325, 2005.

WINDMER, A. F., WENZEL, R. P., TILLA, A., BALE, M. J., JONES, R. N., DOEBBELING, B. N. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in surgical intensive care unit probable transmission via hands of health care worker, **Clinical Infection Diseases**, v.16, p.372-376, 1993.

APÊNDICE 1-FICHA DE INFEÇÃO/COLONIZAÇÃO

Hospital: _____ Nº prontuário _____ Leito: ___ Colonização ___/Infecção ___

Data de admissão na UTI: ___/___/___

Transferido: N() S () Clínica: _____ Data de transferência ___/___/___

Nome: _____ Idade : _____ sexo: M() F ()

Diagnóstico clínico: _____

Doença de base: _____

Data de Transferência : ___/___/___ Alta: ___/___/___ Óbito: ___/___/___

Cirurgia: S()/N () Tipo de Cirurgia: _____

Infecção: S()/N () Sítio: _____

Proc. Invasivos: SNG () SV()CVC ()TET() RES() Dreno() outros() _____

Antibióticos: S ()/N() - T() P ()

Quais/data _____

Germe isolado S()/N ()

Sítio: _____ Qual: _____

Espectro de resistência: _____

Observações:

ANEXO 1- APROVAÇÃO DO CEP



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 284/04

Registro CEP: 189/04

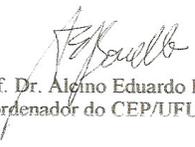
Projeto Pesquisa: *“Surto por pseudomonas aeruginosa multiresistente em unidades de terapia intensiva de DA’s hospitais de Uberlândia: fatores de risco entre pacientes hospitalizados e mecanismos de resistência aos antimicrobianos”.*

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Uberlândia, 22 de novembro de 2004.


 Prof. Dr. Alcirio Eduardo Bonella
 Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeriram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.