



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO– 2004/06**

**FÁBIO DE ARAUJO MOTTA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES DE TIPAGEM DE ISOLADOS  
NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES A  
CARBAPENÊMICOS**

**CURITIBA**

**2006**

**FÁBIO DE ARAUJO MOTTA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES DE TIPAGEM DE ISOLADOS  
NOSOCOMIAIS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES A  
CARBAPENÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção ao título de Mestre.

**Orientador:**

**Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira**

**Co-orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Libera Maria Dalla Costa**

**CURITIBA**

**2006**

*À minha esposa, pelo companheirismo e amor,  
aos meus pais, pelo incentivo e amor de sempre,  
e a Deus, pela saúde, sabedoria e vida...*

## **AGRADECIMENTOS**

Não poderia começar estas citações sem deixar de agradecer, em primeiro lugar, ao meu orientador Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira, sempre solícito, disponível, mesmo com tantas responsabilidades, e um grande exemplo de postura crítica em pesquisa.

À minha co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Libera Maria Dalla Costa, outro grande exemplo de pesquisadora e, acima de tudo, um exemplo de vida.

À amiga e orientadora na realização dos experimentos, Dr.<sup>a</sup> Jane Eyre Gabriel.

A todos os companheiros do laboratório genoma que muito me ajudaram nas minhas idas e vindas entre Curitiba e São José dos Pinhais, em especial à Karita Cláudia Freitas Lidani e à Ana Cláudia Fernandes.

Ao Prof. Dr. Edwaldo Rosa, pela disponibilidade e apoio de sempre.

A todos os funcionários da seção de bacteriologia e central de preparo de meios e reagentes do Hospital de Clínicas que colaboraram para que a realização desse trabalho fosse possível, em especial Helena A.P.H.M de Souza, Larissa Bail, Simone de Oliveira, Keite da Silva Nogueira, Jannaina Ferreira de Melo Vasco, Laura Cogo, Alexandre Walter Rosa e Roberto Ribeiro dos Santos que contribuíram com muita boa vontade.

Ao Núcleo de Estudos em Bacteriologia Clínica de Curitiba, pelo imprescindível apoio financeiro.

Aos diretores e equipes dos hospitais em que trabalho que compreenderam os momentos de ausência necessários.

À amiga sempre atenta e criteriosa, Eliane Carmes que muito me orientou na análise estatística.

Ao grande amigo Leonardo Cavadas da Costa Soares, pelo incentivo constante.

Aos meus pais Adão Motta e Sueli de Araujo Motta que sempre acreditaram no meu potencial e me prepararam para a vida.

À minha esposa, amiga, companheira e maior incentivadora deste projeto, Vania Maria da Silva Andrade.

Por fim, agradeço a todos os envolvidos neste projeto que direta ou indiretamente trabalharam a favor para este resultado final, e acima de tudo a DEUS pela vida e saúde.

*...a mais profunda emoção que podemos experimentar é inspirada pelo senso do mistério. Essa é a emoção fundamental que inspira a verdadeira arte e a verdadeira ciência.*

Albert Einstein

## RESUMO

As *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias naturalmente resistentes a vários antimicrobianos, principalmente os isolados relacionados à infecção nosocomial. A *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos tem sido motivo de grande preocupação em hospitais de todo o mundo, em especial pela pouca opção terapêutica. A tipagem molecular das cepas de *P. aeruginosa* carbapenêmico resistentes (*PaCR*) pode oferecer informações importantes sobre a fonte de infecções e os mecanismos de transmissão. O objetivo deste trabalho foi propor a adoção de um método reprodutível e de alta resolução para identificação de linhagens de *P. aeruginosa*, para que este método possa ser aplicado prontamente nas investigações de surtos hospitalares. Para tanto, o presente estudo aplicou as técnicas em Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) e de reação em cadeia pela DNA polimerase utilizando o iniciador ERIC2 (ERIC-PCR) em isolados de *PaCR*, coletados de pacientes colonizados e/ou infectados por essa bactéria, em dois hospitais escola de Curitiba. Para a análise comparativa entre os 2 métodos, foram calculados o poder discriminatório (D) dos testes, além do cálculo de sensibilidade (S) e especificidade (E) do ERIC-PCR tendo o PFGE como referência de padrão ouro. Um total de 62 isolados, cujos perfis de resistência aos antimicrobianos foram confirmados pela metodologia de diluição em agar, foram avaliados pelos 2 métodos. O valor de D para o PFGE foi de 0,98 e para o ERIC-PCR foi de 0,97. A sensibilidade e especificidade do ERIC-PCR foram de 75% e 57% respectivamente. Com o resultados obtidos, concluiu-se que a disseminação de *PaCR* em um hospital foi policlonal, provavelmente relacionada ao uso excessivo de antimicrobianos. No outro, encontrou-se um clone epidêmico, cuja origem não pode ser esclarecida neste estudo. Estes resultados confirmam o uso da metodologia ERIC-PCR como uma ferramenta de triagem para tipagem de *P. aeruginosa*, devendo os isolados que se mostraram clonais serem confirmados por outra metodologia mais específica, como no caso o PFGE.

**Palavras-chave:** Epidemiologia molecular; *Pseudomonas aeruginosa*; ERIC-PCR e PFGE.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* are naturally resistant to various antimicrobials, especially those associated with nosocomial infections. Isolation of carbapenem-resistant strains has been a cause of major concern in hospitals worldwide due to the scarcity of therapeutic options. Molecular typing of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* may provide relevant information concerning source of infection and transmission mechanisms. This work aimed at suggesting a reproducible, high resolution molecular method to promptly identify *P. aeruginosa* strains in outbreak events. Carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates from colonized and/or infected patients from two hospitals located in Curitiba were submitted to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) using ERIC2 primer. The two methods were compared by calculating discriminatory power (D) sensitivity and specificity of ERIC-PCR as compared to PFGE, the latter used as standard. A total of 62 isolates were evaluated by the two methods. Antimicrobial resistance profiles of all isolates were confirmed using agar dilution tests. D values were 0.98 and 0.97, for PFGE and ERIC-PCR, respectively. ERIC-PCR sensitivity and specificity values were 75% and 57%, respectively. Based on typing results, we concluded that dissemination of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* was polyclonal in one of the hospitals, probably due to THE overuse of antimicrobials. An epidemical clone was identified in the other hospital but its source could not determined by the present study. These results corroborate the use of ERIC-PCR as a screening tool for *P. aeruginosa* typing. In case clonality is indicated, PFGE should be used to confirm such assessment.

**Key words:** Molecular epidemiology; *Pseudomonas aeruginosa*; ERIC-PCR, PFGE.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação bioquímica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
Tabela 2 - Critérios de interpretação de suscetibilidade do teste de CIM segundo o NCCLS para isolados de <i>P. aeruginosa</i> e cepas controle .....	35
Tabela 3 - Concentrações das soluções estoque e concentrações testadas para amostras de <i>P. aeruginosa</i> .....	36
Tabela 4 - Avaliação da validade de um teste diagnóstico .....	46
Tabela 5 - Avaliação de validade do ERIC-PCR.....	48
Tabela 6 - Ocorrência de sítios anatômicos de <i>PaCR</i> do HC-UFPR .....	49
Tabela 7 - Ocorrência de sítios anatômicos de <i>PaCR</i> do HUC-PUCPR .....	49
Tabela 8 - Ocorrência de <i>PaCR</i> nos diversos setores do HC-UFPR.....	50
Tabela 9 - Ocorrência de <i>PaCR</i> nos diversos setores do HUC-PUCPR.....	51
Tabela 10 - Principais antibiotipos com suas possibilidades terapêuticas (HC-UFPR).....	52
Tabela 11 - Antibiotipos do HUC-PUCPR .....	52
Tabela 12 - Valores da CIM 50 e CIM 90 do HC-UFPR e HUC-PUCPR .....	53
Tabela 13 - Valores da CIM 50 e CIM 90 do HC-UFPR.....	53
Tabela 14 - Valores da CIM 50 e CIM 90 do HUC-PUCPR .....	54
Tabela 15 - Resultados do cálculo do poder discriminatório do PFGE/ERIC-PCR.....	60
Tabela 16 - Resultado da validação do teste diagnóstico (cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) .....	60
Tabela 17 - Resultado de <i>clusterização</i> (colunas 1 e 2)/resultado de tipagem genética (colunas 3 e 4)/resultado de concordância entre os testes/classificação para tabela de contingências para o cálculo de validade do teste.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de definição dos antibiótipos.....	51
Figura 2 - Dendograma gerado pela técnica de ERIC-PCR.....	56
Figura 3 - Dendograma gerado pela técnica de PFGE .....	57
Figura 4 - Resultado da metodologia ERIC-PCR (em duplicata) após avaliação de clusterização .....	58
Figura 5 - Resultado da metodologia PFGE após avaliação de clustreização.....	58
Figura 4 - Dendograma gerado pela técnica ERIC-PCR (UTI-HC) - 2003 .....	68
Figura 5 - Dendograma gerado pela técnica PFGE (UTI-HC) - 2003 .....	68
Figura 6 - Dendograma gerado pela técnica ERIC-PCR (UTI-HC) - 2004 .....	69
Figura 7 - Dendograma gerado pela técnica PFGE (UTI-HC) - 2004 .....	70
Figura 8 - Dendograma gerado pela técnica ERIC-PCR (HUC) - 2002 - 2003 .....	71
Figura 9 - Dendograma gerado pela técnica PFGE (HUC) - 2002-2004.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMI	- amicacina
ATCC	- <i>American Type Culture Colection</i>
ATM	- aztreonam
CAZ	- ceftazidima
MEN	- Meropenem
CIP	- ciprofloxacino
PIP/TAZ	- Piperacilina/Tazobactam
CPM	- cefepime
GEN	- Gentamicina
ATM	- Aztreonam
ESBL	- B-lactamase de espectro ampliado
IMI	- imipenem
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIM 50	- Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
CIM 90	- Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
NCCLS	- <i>National Committee Clinical Laboratory Standards</i>
PBP	- Proteína ligadora de penicilina
PCR	- Reação em cadeia pela DNA Polimerase
RFLP	- Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
AFLP	- Polimorfismo de tamanho de fragmentos de ampliação
EDTA	- Etileno Diamino tri-acetato
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva
BHI	- Infusão Cérebro Coração
CDC	- Centro de Controle de Doenças
PCR	- Reação de cadeia pela Polimerase
PFGE	- Eletroforese em gel em campo alternado
PAV	- Pneumonia associada à ventilação
ITU	- Infecção do trato urinário
SNC	- Sistema nervoso central
DD	- Disco difusão
LBA	- Lavado bronco-alveolar
Mini Bal	- Mini lavado bronco-alveolar
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HUC-PUCPR	- Hospital Universitário Cajuru da Pontifícia Universiade Católica do Paraná
CLSI	- <i>Committee Laboratory Standards International</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
<b>2.1</b>	<b>Definições</b>	14
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologia Molecular</b>	16
2.2.1	Diferenciando Epidemiologia Molecular de Taxonomia e Filogenética	16
2.2.2	Como Selecionar Métodos de Tipagem de Cepas para se Aplicar numa Investigação Epidemiológica	21
<b>2.3</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	21
<b>2.4</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> e sua Epidemiologia</b>	23
<b>2.5</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a Resistência aos Antimicrobianos</b>	25
<b>2.6</b>	<b>A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e as Ferramentas Moleculares</b>	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	31
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	31
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	31
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	32
<b>4.1</b>	<b>Definição de Caso de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carbapenem Resistente (Critérios de Inclusão)</b>	32
<b>4.2</b>	<b>Hospitais em Estudo</b>	32
<b>4.3</b>	<b>Isolamento e Identificação</b>	33
<b>4.4</b>	<b>Identificação Bioquímica de <i>P. aeruginosa</i></b>	34
<b>4.5</b>	<b>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b>	34
4.5.1	Agentes Antimicrobianos	35
4.5.2	Diluição em Placas de Ágar	36
4.5.3	Inóculo para Testes de Diluição	37
4.5.4	Padronização do Inóculo	37
4.5.5	Diluição em Ágar	37
4.5.6	Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar	38
<b>4.6</b>	<b>PFGE (Eletroforese em Campo Pulsado)</b>	38
4.6.1	Preparo do DNA Bacteriano	38
4.6.2	Clivagem do DNA com Enzimas de Digestão	39
4.6.3	Preparo do Gel de Agarose Características da Eletroforese	39
<b>4.7</b>	<b>RAPD (ERIC-PCR)</b>	40
4.7.1	Extração do DNA Bacteriano	40

4.7.2	Preparo da Máster-Mix de PCR.....	40
4.7.3	Condições de Amplificação .....	40
4.7.4	Preparo do Gel de Agarose e Características da Eletroforese.....	41
<b>4.8</b>	<b>Análise dos Géis .....</b>	<b>41</b>
<b>4.9</b>	<b>Métodos Estatísticos .....</b>	<b>42</b>
4.9.1	Coeficiente de Similaridade.....	42
4.9.2	Métodos de Agrupamento (Média das distâncias – UPGMA) .....	43
4.9.3	Análise dos Dendogramas.....	44
4.9.4	Comparações entre PFGE e ERIC-PCR.....	45
4.9.4.1	Cálculo do Poder Discriminatório de Cada Teste .....	45
4.9.4.2	Análise de validade do teste diagnóstico (ERIC-PCR) em relação ao teste padrão (PFGE).....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Distribuição de <i>PACR</i> nos Diversos Sítios Anatômicos e Locais .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>Testes Fenotípicos.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3</b>	<b>A Aplicação das Ferramentas Moleculares nos Isolados de <i>PaCR</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4</b>	<b>Cálculo do Poder Discriminatório, Validade do Teste Diagnóstico e outros Parâmetros Comparativos entre os Testes .....</b>	<b>60</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação Epidemiológica das <i>PaCR</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Após trinta e cinco anos de adoção de programas oficiais para controle de infecção hospitalar pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) nos Estados Unidos e oito anos da Regulamentação Nacional da Portaria n.º 2.616 de 1998 do Ministério da Saúde do Brasil, a prevenção e controle das infecções hospitalares constituem-se em grandes desafios da medicina, no Brasil e no mundo. Com várias tentativas frustradas de programas para prevenir esses eventos, a medicina moderna precisa de pensamentos inovadores e novas práticas que realmente possam fazer a diferença. Com o aumento da proporção de pacientes submetidos a procedimentos complexos, levando a um aumento da morbi-mortalidade, e com o aumento de riscos financeiros assumidos pelo sistema de saúde com relação a esses pacientes, urge que se estabeleçam métodos de prevenção e controle que realmente sensibilizem os profissionais da área da saúde a aceitarem as medidas propostas pelos profissionais de controle e prevenção das infecções hospitalares.

Hoje, a aplicação de ferramentas de biologia molecular para epidemiologia de doenças infecciosas é uma das grandes revoluções no avanço do conhecimento e dos conceitos em epidemiologia e, portanto, deve ser reconhecida como um instrumento inovador para auxiliar na implantação de medidas necessárias para frear a disseminação de bactérias nosocomiais. A tipagem molecular de patógenos microbianos tem sido considerada de grande importância para elucidação de vias de transmissão. *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista capaz de causar doença invasiva severa em pacientes criticamente doentes e pacientes imunocomprometidos, tem resistência intrínseca a vários antimicrobianos e pode adquirir vários mecanismos de resistência adicionais dentro do ambiente hospitalar. Essas bactérias multiresistentes têm causado surtos de infecção hospitalar esporadicamente. Assim, torna-se de fundamental importância a caracterização genética dessas cepas de *P. aeruginosa* para conter sua disseminação. Baseado em estudos comparativos de várias técnicas moleculares, o uso de Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) tem sido considerado o procedimento padrão de definição de polimorfismos das cepas de *P. aeruginosa* estudadas. Métodos fundamentados na Reação em Cadeia pela DNA Polimerase (PCR) também têm sido aplicados para caracterização

molecular dessas bactérias. Este estudo aplicou esses dois métodos moleculares em amostras isoladas de dois hospitais em Curitiba podendo, assim, trazer informações importantes a respeito da endemicidade desta bactéria, que tem apresentado perfis de resistência cada vez mais preocupantes para a prática clínica. Com isto, pretendeu-se levantar informações fundamentais para o controle adequado da disseminação dessas bactérias nos hospitais analisados, além de propor métodos que possam ser reprodutíveis e de confiança na identificação de eventuais surtos por cepas multiresistentes que possam atingir os diversos hospitais de Curitiba.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Definições

Epidemiologia é geralmente definida como "o estudo da distribuição e dos determinantes de doenças e injúrias na população humana"<sup>(1)</sup>. Uma simples extensão desta definição para epidemiologia molecular de doenças infecciosas é o "estudo da distribuição e determinantes de doenças infecciosas que utiliza métodos moleculares". Em 1977, Higginson definiu epidemiologia molecular como "aplicação de **técnicas sofisticadas** para estudo de material biológico"<sup>(2)</sup>. Mais recentemente, Levin e col. definem que

os objetivos práticos da epidemiologia molecular são a identificação de microparasitas responsáveis por doenças infecciosas e suas **determinações** quanto suas origens físicas, suas inter-relações biológicas, suas vias de transmissões, seus genes responsáveis pela virulência, antígenos vacinais relevantes e resistência a droga.<sup>(3)</sup>

Com isso, o termo "**determinante**" na definição da epidemiologia é enfatizado como o principal objetivo de quase todos os estudos da epidemiologia molecular, caracterizando assim a distribuição da doença.

Enquanto se reconhece que a distribuição de doenças infecciosas e os determinantes da distribuição podem ser identificados pelas técnicas da biologia molecular, também se tornou evidente que a distribuição de doenças infecciosas em uma comunidade de hospedeiros pode ser determinada ou "programada" pelo próprio material genético do patógeno envolvido no disparo e manutenção da resposta do maquinário antimicrobiano do hospedeiro, tanto quanto o ambiente no qual o patógeno reside. Logo, mecanismos que justificam um padrão de transmissão específico de um microrganismo podem ser geneticamente ou ambientalmente determinados. Portanto, o estudo de epidemiologia molecular deve incluir a investigação de fatores genéticos que determinam e regulam padrões específicos de transmissão de um organismo<sup>(4)</sup>.

Outros termos que serão usados nesta dissertação são definidos abaixo. Algumas destas definições foram adaptadas das recomendações feitas pelo Grupo de Estudo Europeu de Marcadores Epidemiológicos (1996)<sup>(5)</sup> e do Grupo de

Estudo de Tipagem Molecular da Sociedade de Epidemiologistas da Saúde da América(1997)<sup>(6)</sup>:

- **Isolados bacterianos** - uma população de células, em uma cultura pura, derivadas de uma colônia única de uma placa e identificada até nível de espécie.
- **Isolados epidemiologicamente relacionados** - São isolados cultivados a partir de amostras coletadas de pacientes, fômites ou do ambiente durante um pequeno espaço de tempo ou a partir de uma área bem definida, fazendo parte de uma investigação epidemiológica que sugere que estes isolados são derivados de uma fonte comum.
- **Cepas** - um isolado ou grupo de isolados que exibem traços fenotípicos ou genotípicos pertencentes à mesma linhagem filogenética, distinguindo-se de outros isolados da mesma espécie.
- **Clone** - um isolado ou um grupo de isolados descendendo de uma cepa precursora comum por reprodução não sexual exibindo os mesmos traços fenotípicos ou genotípicos, caracterizados por métodos de tipagem de cepas, para pertencer ao mesmo grupo.
- **Tipagem (Tipo)** - uma unidade específica e discreta de informações ou características pertencentes a uma cepa submetida a um procedimento de tipagem de cepa (ex.: padrão de resistência de antibiótico, sorotipo, padrão de bandas eletroforéticas e alelos).
- **Poder discriminatório** - habilidade de um teste para gerar distintas e discretas unidades de informações provenientes de diferentes isolados, geralmente a nível de subespécie.
- **Surto** - o aparecimento agudo de uma quantidade de doenças causadas por um patógeno que ocorre em excesso em relação ao que se espera no tempo e no espaço.
- **Epidemia** - ocorrência de uma quantidade de doenças causadas por um patógeno em número excessivos do que

se espera num determinado tempo e espaço. Uma epidemia pode ser um surto, embora um surto geralmente se refira a um surgimento abrupto de uma quantidade de doença num curto período de tempo em uma população, área geográfica, ou instituição. Uma epidemia pode durar anos e tornar-se uma pandemia, se a disseminação for global (ex.: AIDS e cólera).

- **Endemia** - ocorre em uma população ou área geográfica ou instituição (ex.: hospital) com nenhum desvio aparente (aumento ou diminuição) mantendo uma flutuação esperada em número de casos num determinado tempo e local.
- **Infecção** - processo inflamatório no qual exista um agente infeccioso.
- **Colonização** - presença do microrganismo sem causar infecção.

## 2.2 Epidemiologia Molecular

### 2.2.1 Diferenciando Epidemiologia Molecular de Taxonomia e Filogenética

Numa pesquisa bibliográfica na base Medline com palavra-chave "*molecular epidemiology*" identificam-se centenas de artigos. Aproximadamente um terço deles aborda tópicos de doenças infecciosas. Apesar disto, dentre os estudos originais, mais da metade foca em métodos laboratoriais, não em análises epidemiológicas. Sendo assim, eles não discutem o uso destas técnicas para caracterizar ocorrência de doença, distribuição, ou determinantes de distribuição de doenças. Geralmente, o termo epidemiologia molecular é usado para descrever o que deveria mais adequadamente ser descrito como taxonomia molecular ou filogenética molecular. Taxonomia é a ciência de classificação de organismos dentro de grupos naturalmente relacionados baseados em fatores comuns a cada um deles. Filogenética é o estudo

de linhas do desenvolvimento descendente ou evolucionário de um organismo. Uma aplicação de uma técnica de biologia molecular para tipar um organismo por si só não constitui epidemiologia molecular.

Todos esses campos podem aplicar a mesma técnica laboratorial de biologia molecular, mas cada um é motivado por diferentes princípios. Na taxonomia ou filogenética aplicada a agentes infecciosos, os dados gerados são usados para descrever características dos organismos onde, o principal alvo de análise é o organismo e sua relação de ancestralidade com outros organismos. Em epidemiologia molecular, o alvo de análise inclui o organismo e sua inter-relação com o hospedeiro e o meio ambiente no qual eles residem. Ambos, epidemiologia e filogenética, quando aplicados a doenças infecciosas podem descrever a distribuição de atributos genéticos particulares de um patógeno numa população, no decorrer do tempo. A análise filogenética esforça-se para inferir eventos baseados no passado evolucionário, baseado numa realidade observacional feita com materiais disponíveis no presente (ex.: fóssil ou organismos encontrados no gelo). Epidemiologia foca o evento no presente ou num passado recente, na tentativa de descrever atributos de interesse e usa desenho de estudos analíticos ou empíricos para identificar fatores que possam prever as inter-relações desses atributos na distribuição de doenças no tempo e no espaço, assim como fatores que determinam a transmissão de doenças, manifestação e sua progressão. Logo, em epidemiologia, as hipóteses que são geradas são testadas ou serão testadas empiricamente e sempre motivada por uma possibilidade ou oportunidade de intervenção ou prevenção<sup>(4)</sup>.

Agentes infecciosos não obedecem a limites nacionais. Havendo oportunidade, um agente infeccioso irá sempre se espalhar. Logo, uma aplicação óbvia de técnicas de tipagem molecular de isolados é a definição do caminho percorrido pelo patógeno geograficamente, num ambiente hospitalar, por exemplo. Vários estudos descritivos são comuns na literatura revelando informações epidemiológicas de grande importância, porém, sem análise para se entender a verdadeira dinâmica de transmissão de uma doença infecciosa e sugerir medidas de prevenção e controle<sup>(7)</sup>.

Em epidemiologia de doenças infecciosas é necessário saber "como" e "por que". Como um organismo se introduz numa comunidade? Como e por que ele se espalha? Quais são os fatores de risco para infecção e transmissão numa comunidade e como esta infecção se mantém neste meio? Como e por que uma cepa

em particular repentinamente emerge como uma cepa predominante em uma comunidade, e por que ela desaparece? Como podemos descobrir sobre a dinâmica de transmissão de doenças para implementar programas de controle efetivo de doenças? Como podemos medir o efeito e impacto da intervenção feita, baseada no conhecimento adquirido, proveniente do uso de um teste laboratorial específico? Estas são algumas das questões que devem ser primeiramente perguntadas, para em seguida, com o uso das ferramentas da biologia molecular, medidas possam ser tomadas com relação a investigação proposta<sup>(4)</sup>.

Considerando o uso em geral dos métodos de tipagem molecular para solução de problemas epidemiológicos, passa-se agora para a apresentação das principais aplicações desses métodos e os problemas específicos aos quais eles se propõem resolver:

- a) Determinação da dinâmica de transmissão de doença em áreas geograficamente espalhadas - Estuda a introdução e disseminação de um organismo ou cepa dentro da comunidade; identifica razões para mudanças na prevalência de bactérias multiresistentes; estuda fatores (hospedeiro, ambiente e organismo) que contribuem para transmissão<sup>(8)</sup>.
- b) Identificação de riscos e quantificação de frações de risco atribuído em ocorrências esporádicas de doenças infecciosas - Diferencia ocorrência epidêmica de endêmica de uma doença infecciosa. Identifica novos clones de agentes infecciosos; identifica veículos específicos e fatores de risco para infecções esporádicas<sup>(9,10)</sup>.
- c) Estratificação de dados e refinamento de desenhos de estudos epidemiológicos - estratifica pequenos grupos de microrganismos em distintas unidades, podendo o paciente infectado ser reclassificado em um novo grupo de acordo com este tipo de isolado. Isto é particularmente usado para pacientes com doenças esporádicas na comunidade ou no hospital. A partir disto, novos riscos são identificados, quando uma amostra em estudo tem um tamanho muito pequeno,

o que para um estudo epidemiológico convencional seria impossível!<sup>(11)</sup>

- d) Distinção de patogênicos de não patogênicos - Estudo epidemiológico de infecção com variantes patogênicas de um organismo que ocorre como parte de microbiota normal ou como um saprófita; identificação de novos fatores de virulência; identificação de novos patógenos<sup>(12,13)</sup>.
- e) Orientação de problemas de doenças infecciosas em hospitais e instituições - Estudos epidemiológicos de patógenos nosocomiais multiresistentes; distingue surto nosocomiais de patógenos não relacionados ao surto; identifica fatores de risco para infecções oportunistas; estuda infecções policlonais<sup>(14,15)</sup>.

Na aplicação epidemiológica, as técnicas moleculares não devem ser consideradas como substitutas das técnicas convencionais ou tradicionais de um laboratório de microbiologia. Para a escolha de uma técnica de biologia molecular, as seguintes considerações deverão se feitas: i) Simplicidade, ii) Capacidade simultânea de realizar testes, iii) Custo, e iv) Capacidade de direcionar problemas epidemiológicos<sup>(16)</sup>.

#### ▪ **Simplicidade**

É freqüente assumirmos que técnicas moleculares são mais trabalhosas que técnicas convencionais de laboratório usadas para diferenciar agentes infecciosos. Em muitas situações, porém, as técnicas moleculares são mais simples que as convencionais, não só no que tange ao procedimento em si, mas também no que diz respeito ao treinamento técnico, em que o tempo requerido para este treinamento é muito menor em relação à técnica convencional. Ex.: Técnica de PCR para diferenciar isolados de *E. coli* dentro do grupo de cepas enteropatogênicas, enterotoxigênicas e enteroinvasivas, quando comparado com técnicas de bioquímica e sorologia, para se conseguir o mesmo dado<sup>(12)</sup>.

- **Alta produção**

Capacidade do teste de processar um grande número de espécimes simultaneamente. O número de amostras que podem ser processadas ao mesmo tempo é geralmente o maior limitador para diversas técnicas de biologia molecular. Em estudos epidemiológicos, isso pode afetar o poder do teste estatístico na avaliação do risco ou associação com doenças<sup>(17)</sup>.

- **Custo**

Em países desenvolvidos, com o aumento do uso de técnicas moleculares nos últimos 15 anos, o custo dos reagentes reduziu consideravelmente. No estudo realizado no Brasil por Tornieporth, observou-se que o custo da diferenciação entre espécies de *E. coli* variantes patogênicas e não patogênicas, diminuiu de forma expressiva quando se comparou o uso do PCR com o custo dos reagentes necessários para se obter a mesma informação através de testes bioquímicos convencionais e sorológicos<sup>(13)</sup>. O destaque deste trabalho se deve por ser o único nos últimos 12 anos que analisa comparativamente técnicas convencionais com técnica de biologia molecular para diferenciação de microrganismos patogênicos de não patogênicos, fazendo uma abordagem sobre a facilidade de realização do método, rapidez e custo, num país em desenvolvimento como o Brasil.

- **Adequamento do teste**

É a capacidade de direcionar problemas epidemiológicos. Também no exemplo do trabalho de Tornieporth, observou-se que testes convencionais não poderiam caracterizar as cepas mortas, que possuíam seus DNAs intactos, que puderam ser caracterizados pela técnica de PCR<sup>(13)</sup>.

Existem outras situações em que testes convencionais não podem ajudar com dados adicionais para a solução do problema. A descoberta do coronavírus, causador da Gripe Aviária é um exemplo disto. Antes do descobrimento do vírus, através de estudos epidemiológicos, viu-se que se tratava de uma doença transmissível, e que a aerossolização respiratória era uma importante fonte dessa transmissão. Apesar disto, testes convencionais não podiam identificar o agente etiológico. Mais tarde, com o desenvolvimento de técnica de microarranjo de DNA revelou-se um novo tipo de vírus<sup>(18)</sup>.

## 2.2.2 Como Selecionar Métodos de Tipagem de Cepas para se Aplicar numa Investigação Epidemiológica

Maslow e col. propuseram cinco critérios de desempenho para sistema de tipagem de cepas: tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade para interpretação e facilidade para uso<sup>(12)</sup>. Um guia similar proposto pelo Grupo de Estudo Europeu em Marcadores epidemiológicos acrescentou os critérios de estabilidade, concordância epidemiológica e concordância nos sistemas de tipagem<sup>(5)</sup>. Mais recentemente, Foxman e colaboradores, discutiram este tema com foco na sua aplicação epidemiológica, que a autora descreve como três: 1) confirmação epidemiológica de surtos, 2) geração de hipóteses sobre relações epidemiológicas entre cepas bacterianas na ausência de informações epidemiológicas, 3) descrição da disseminação bacteriana e identificação dos determinantes dessa disseminação. As inferências feitas por estudos moleculares sobre as bactérias dependem do tipo de técnica selecionada e do desenho do estudo proposto. Logo, a autora conclui que a escolha da técnica de tipagem é fundamental para aumentar nosso entendimento da patogênese, transmissão e eventual prevenção de doenças<sup>(16)</sup>.

## 2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é uma bactéria não fermentadora da glicose, característica esta que a exclui da família Enterobacteriaceae<sup>(19)</sup>. Pertence a família *Pseudomonadacea*, apresentando-se como um gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio, móvel, não esporulado. A degradação de carboidratos pelo metabolismo oxidativo (Via de Etnier - Douderoff) e a presença da enzima citocromo oxidase a diferenciam das Enterobactérias<sup>(20)</sup>.

*P. aeruginosa* é classificada como RNAr Grupo I (grupo fluorescente), juntamente com *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*. É o único microrganismo que produz piocianina e se diferencia das outras duas espécies pela sua capacidade de crescer em ágar cetrimide incubado a 42°C<sup>(21,22)</sup>. Também apresenta um bom crescimento em ágar sangue e ágar MacConkey. No ágar sangue, suas colônias apresentam-se com tamanho de 3mm de diâmetro, são espalhadas e lisas, com bordas denteadas e crescimento confluyente, brilho metálico, pigmentação azul-

esverdeada, vermelha ou marrom, e suas colônias frequentemente apresentam beta-hemólise com odor de uva<sup>(22)</sup>. No ágar MacConkey não ocorre oxidação da lactose. Esse microrganismo possui toxinas como exotoxina A, exoenzima S e endotoxina e enzimas como elastase, protease alcalina e fosfolipase C, que lhe conferem virulência<sup>(23)</sup> <sup>(20)</sup>.

Stover e col. publicaram recentemente o sequenciamento completo do genoma da *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Com 6,3 milhões de pares de bases, trata-se do maior genoma de bactéria patogênica já seqüenciado. Esse sequenciamento permite entender a versatilidade e a resistência intrínseca a drogas desse microrganismo. A *P. aeruginosa* contém a maior proporção de genes reguladores observados num genoma bacteriano, com um grande número de genes envolvidos em catabolismo, transporte e efluxo de componentes orgânicos, assim como quatro sistemas quimiotáticos em potencial. Todas estas características justificam seu grande genoma e a sua adaptabilidade ao meio ambiente. Esses autores propõem, ainda, que o tamanho e a complexidade do genoma da *P. aeruginosa* reflitam uma adaptação evolucionária, permitindo sua sobrevivência em diversos ambientes, além da resistência aos efeitos de uma variedade de substâncias antimicrobianas<sup>(24)</sup>.

*P. aeruginosa* encontra-se amplamente distribuída na natureza, tendo predileção por lugares úmidos. No ambiente hospitalar, desenvolve-se em soluções de limpeza, equipamentos respiratórios, medicamentos e desinfetantes. Os pacientes hospitalizados apresentam-se altamente colonizados pela *P. aeruginosa*, principalmente na pele dos que estão na unidade de queimados, no trato respiratório de pacientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) uma vez que são submetidos à ventilação mecânica (VM) e no trato gastrointestinal de pacientes com uso excessivo de antimicrobianos<sup>(25)</sup>.

Com relação ao tratamento das infecções por *P. aeruginosa*, os carbapenêmicos oferecem a vantagem de serem mais estáveis às  $\beta$ -lactamases secretadas pela *P. aeruginosa* do que outras drogas anti-pseudomonas tipo  $\beta$ -lactâmicos, como as cefalosporinas<sup>(26)</sup>. Contudo, com o aumento do seu uso clínico, a resistência aos carbapenêmicos, principalmente ao imipenem, tem aumentado na última década<sup>(27)</sup>.

O imipenem, um antibiótico  $\beta$ -lactâmico de amplo espectro foi o primeiro carbapenêmico aprovado para uso clínico, sendo uma importante droga

para tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa*. O meropenem, carbapenêmico de espectro semelhante ao imipenem, mas com a característica de ser menos neurotóxico, é o tratamento de escolha para o tratamento de pacientes com doenças neurológicas e infecções por *P. aeruginosa* no sistema nervoso central (SNC). Além disto, o meropenem difere na sua posologia, podendo ser administrado de 8 em 8 horas diferentemente do imipenem (6 em 6 horas)<sup>(28)</sup> e demonstra uma concentração inibitória mínima (CIM) inferior ao imipenem frente a *P. aeruginosa*<sup>(29,30)</sup>.

## 2.4 *Pseudomonas aeruginosa* e sua Epidemiologia

Nas últimas duas décadas, têm-se observado uma significativa mudança no espectro de microrganismos causadores de infecção nosocomial. As enterobactérias gram-negativas que eram responsáveis por 30 a 50% de todos os isolados causadores de infecções nas UTIs, de 1970 a 1980, foram substituídas por microrganismos gram-positivos como Estafilococos e Enterococos<sup>(31,32)</sup>. Essa relativa diminuição de infecção por Enterobactérias foi alcançada graças à implementação de estratégias de barreira para se interromper a transmissão desses microrganismos provenientes do reservatório intestinal para os potenciais sítios de infecção. Técnicas como nutrição enteral precoce, sistema fechado de aspiração traqueal durante a VM, e o conceito de posição semi-sentada em pacientes com VM, têm contribuído para criar uma barreira física ou funcional entre microbiota gastrintestinal e trato respiratório<sup>(33,34,35)</sup>.

Ao contrário dessa significativa mudança, *P. aeruginosa* tem se mantido inalterada na sua posição entre os patógenos causadores de infecção em UTI, por mais de quatro décadas. No último relatório NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) do CDC<sup>(36)</sup>, a *P. aeruginosa* continua sendo o terceiro organismo mais frequentemente associado com infecção pulmonar, o quarto mais freqüente causador de Infecção do Trato Urinário (ITU) e o quinto mais freqüente organismo isolado de cultura sanguínea, nos casos de septicemia. Em casos de sepse primária, EUA e Europa têm mostrado proporções constantes de 4% desses casos, sendo causados pela *P. aeruginosa*<sup>(37,38)</sup>. Estudos realizados em pacientes de UTI mostram um significativo papel de *P. aeruginosa* como causadora de Pneumonia Associada a

Ventilação (PAV)<sup>(39,40)</sup>. Em ambas as infecções causadas por *P. aeruginosa* vê-se uma significativa morbi-mortalidade entre 40 e 50%<sup>(41,42)</sup>.

Fica claro que a *P. aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção hospitalar. As infecções causadas por este microrganismo são geralmente de difícil tratamento devido à sua virulência, e pela escolha limitada de agentes antimicrobianos efetivos. No Brasil, segundo dados do Programa de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos SENTRY, *P. aeruginosa* foi a causa mais freqüente de infecções do trato respiratório, a segunda causa mais freqüente de infecções urinárias e de infecções de ferida cirúrgica, e o sexto patógeno mais comum em infecções da corrente sangüínea, no período de 1997 a 1999. O aumento tanto da prevalência de infecções causadas por *P. aeruginosa* quanto nas taxas de resistência tem dificultado muito a escolha da terapêutica antimicrobiana<sup>(7)</sup>. Esta publicação teve uma atualização recente, com dados de 1997 a 2001, com análises específicas de comparação entre a América Latina e o Brasil. Os números mostram que a *P. aeruginosa* foi reconhecida como o 3.º germe mais isolado no geral e o 5.º germe mais isolado em infecções de corrente sanguínea. O que chama mais atenção entre os dados disponíveis nas diversas tabelas do artigo é a comparação entre o perfil de sensibilidade no período de 1997 a 2001 e separadamente de 2001, em que observa-se um aumento impressionante da resistência da *P. aeruginosa* em especial nos isolados recuperados do trato respiratório. Nas pneumonias, o antimicrobiano com maior número de isolados sensíveis foi a Amicacina com 51% de isolados suscetíveis, seguido da Piperacilina/Tazobactam com 46,5% de suscetíveis e do Meropenem com 45,1% de susceptíveis. Na série de 1997 a 2001, o antimicrobiano com maior porcentagem de susceptibilidade era o Meropenem, com 59% dos isolados mostrando susceptibilidade a este antimicrobiano. Considerando que os carbapenêmicos são reconhecidamente a classe dos antimicrobianos de maior potência contra a *P. aeruginosa*, estes dados publicados recentemente justificam a preocupação com relação à disseminação desses isolados carbapenem resistentes<sup>(43)</sup>.

## 2.5 *Pseudomonas aeruginosa* e a Resistência aos Antimicrobianos

Não pode-se negar que em termos de números de isolados, o grande problema de resistência encontra-se nos gram-positivos, especialmente os *Staphylococcus aureus* oxacilino-resistente. Porém, deve-se ficar atento para um problema muito mais perigoso: a emergência de bactérias gram-negativas com resistência a todos os antibióticos<sup>(44)</sup>.

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* mantém-se susceptível a múltiplos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. No entanto, a prevalência de isolados resistentes a três ou mais antibióticos de grande relevância para o tratamento dessa bactéria (amicacina, ceftazidime, ciprofloxacina, gentamicina, carbapenêmico e piperacilina), tem aumentado consideravelmente nos últimos 8 anos, sendo aproximadamente 1% dos isolados dos EUA resistente a todos estes seis agentes<sup>(45)</sup>. Embora ainda considerado como ocorrência rara, bactérias gram-negativas "pan-resistentes", predominantemente *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, têm tido ocorrência considerável em alguns hospitais brasileiros, assim como em hospitais de Curitiba.

Duas vias hoje justificam esta "pan-resistência". A primeira, reconhecida como a mais freqüente, se dá através de acúmulo de sucessivas mutações que levam ao aumento da expressão de  $\beta$ -lactamase cromossomal (Amp-C) e de bombas de efluxo multi-droga, à redução da permeabilidade das membranas externa e citoplasmática e à redução de afinidade de fluoroquinolonas com a enzima DNA girase. A combinação de hiperregulação de bomba de efluxo, associada à perda da proteína que forma um portal de saída na membrana externa, conhecida como OprD, e a impermeabilidade a aminoglicosídeos compromete todas as classes de drogas exceto as polimixinas<sup>(46)</sup>. Antibióticos não causam mutações, mas selecionam variantes hipermutáveis de ocorrência natural dentro de uma população de *P. aeruginosa* em pacientes com processos infecciosos crônicos. Este fenômeno faz com que se diminuam os mecanismos de reparo do DNA que normalmente aconteceriam. Sendo a hipermutabilidade co-selecionada com resistência, o resultado é o aparecimento de uma população com grande resistência, mais rápido do que quando essas cepas hipermutáveis não

ocorrem, como descrito por Oliver A. e col. em pacientes com fibrose cística no ano de 2000.<sup>(47)</sup>

A outra via para "pan-resistência" de *P. aeruginosa* é através de aquisição de elementos genéticos localizados em plasmídeos e integrons contendo genes capazes de codificar potentes  $\beta$ -lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. A maioria das  $\beta$ -lactamases adquiridas em *P. aeruginosa* agem apenas sobre penicilinas e cefalosporinas de segunda geração preservando ceftazidime, aztreonam e carbapenêmicos. Dentre essas enzimas, as mais freqüentes são PSE-1 e PSE-4 que, como as clássicas TEM e OXA (as quais ocorrem, embora raramente, em *P. aeruginosa*), podem ser inativadas com o uso de cefalosporina de terceira e quarta gerações (ceftazidime, cefepime e cefpiroma), e com o uso de carbapenêmicos (imipenem e meropenem) ou monobactams (aztreonam)<sup>(48)</sup>. Porém, nos últimos anos,  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, têm emergido em *P. aeruginosa*. PER-1  $\beta$ -lactamase e outros tipos de espectro estendido, conhecidas como OXA-Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactams (OXA-ESBLs), merecem discussões, assim como as metalo- $\beta$ -lactamases, dentre elas, as mais conhecidas, IMP e VIM. É interessante aqui, abordar um pouco sobre a origem dessas nomenclaturas. O nome da  $\beta$ -lactamase TEM deriva de **Tem**oriana, uma jovem paciente grega da qual foi isolado o primeiro microrganismo com essa característica. Essa enzima ficou conhecida como TEM-1, e as enzimas subseqüentes descritas com essa característica foram incorporando diferentes números. Algumas enzimas foram nomeadas segundo a preferência de substratos ou espectro de ação. Ao longo dos anos, essa diversidade de nomenclatura contribuiu para uma falta de sistematização na compreensão e no estudo dessas enzimas, tendo como principais exemplos: OXA, PSE, CTX, SHV, IMP e VIM<sup>(49)</sup>.

PER-1, uma  $\beta$ -lactamase classe A, confere alto nível de resistência à ceftazidime, com suscetibilidade restaurada com adição de clavulanato, mas com pequeno efeito *in vitro* com piperacilina. Os carbapenêmicos são antimicrobianos estáveis a estas enzimas. PER-1 é frequentemente descrita em *P. aeruginosa* provenientes da Turquia<sup>(50)</sup>, e ocasionalmente tem sido descrita na Europa. As OXA-ESBLs, também foram descritas na Turquia, e incluem OXA-11, -14, -16, -17, -19 e -28, todos mutantes da OXA-10, assim como a OXA-15, mutante da OXA-2<sup>(51,52)</sup>.

As metalo- $\beta$ -lactamases são enzimas que rapidamente hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas não aztreonam. Desde 1988 a enzima IMP-1 foi descrita no Japão, onde agora está difusamente espalhada, embora ainda rara entre *P. aeruginosa*. A IMP-7 foi descrita no Canadá<sup>(53)</sup>, enquanto que as enzimas IMP-2, -3, -4, -5, -6, e -8, foram descritas em outras espécies e países<sup>(54)</sup>. A enzima VIM-1 foi descrita em *P. aeruginosa* na Itália e na Grécia<sup>(55)</sup>. VIM-2, cuja seqüência de aminoácidos tem 90% de homologia com a VIM-1, foi descrita na França, Grécia e Coréia do Sul, enquanto VIM-3 foi descrita em Taiwan<sup>(56)</sup>. Recentemente Tolleman e col. descreveram um novo tipo de metalo- $\beta$ -lactamase encontrada no Brasil, conhecida como SPM. Logo após, Gales e col. descreveram a disseminação deste clone em diversos estados do Brasil como Bahia, Paraná, São Paulo e Ceará, confirmados por ribotipagem e PFGE<sup>(57,58)</sup>. Em 2004, Poirel e col. descreveram esta mesma cepa em Pernambuco<sup>(59)</sup>.

Hoje as Polimixinas são consideradas como uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Esse antimicrobiano foi usado como agente anti-pseudomonas antes da introdução no mercado de gentamicina e carbenicilina no ano de 1960. A Polimixina mantém sua atividade contra *P. aeruginosa*, embora ocasionalmente apareça resistência a esta droga em isolados de pacientes com fibrose cística, que receberam nebulização com Colistina® (Polimixina E) em altas doses. Um estudo publicado por Levin e col. mostra uma eficácia deste antimicrobiano em torno de 58% em geral e de 25% para os casos de pneumonia hospitalar causada por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Nefrotoxicidade e neurotoxicidade ocorreram em 39% dos pacientes, sem necessidade de suspender a terapia<sup>(60)</sup>. Em outro estudo publicado recentemente por Tan e NG, foram testados 102 isolados para Colistina®. Trinta por cento dos isolados testados mostraram resistência a Colistina®, e dentre esses isolados a maioria era *P. aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>(61)</sup>. Estes resultados confirmam a dificuldade em se obter padrões de susceptibilidade e resistência para as polimixinas em metodologia de disco difusão, devendo-se para isso, sempre que possível, realizar a confirmação da sensibilidade por método de diluição em caldo<sup>(62)</sup>.

No Brasil, *P. aeruginosa* apresenta taxas de resistência aos carbapenêmicos bastante elevadas. Em alguns hospitais brasileiros, cerca de 15 a 35% das amostras são resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente.

Dessa maneira, a polimixina B, um agente antimicrobiano com nefrotoxicidade considerável, vem sendo novamente utilizado para tratar infecções causadas por *P. aeruginosa* sensíveis somente a este agente<sup>(63)</sup>.

## 2.6 A *Pseudomonas aeruginosa* e as Ferramentas Moleculares

Por causa da prevalência de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar, estudos epidemiológicos durante surtos infecciosos são facilitados pelo uso de marcadores que discriminam diferentes linhagens. A ferramenta epidemiológica mais específica e sensível disponível é a caracterização molecular das linhagens<sup>(64)</sup>. De fato, o uso de técnicas de epidemiologia molecular tem se mostrado importante aliado no controle de infecções nosocomiais, na medida em que permite determinar a clonalidade dos isolados<sup>(65)</sup>. Há décadas, o desenvolvimento e uso de antibióticos têm sido uma das mais importantes contribuições para o controle de doenças infecciosas. No entanto, o subsequente surgimento e disseminação de resistência a antibióticos entre organismos patogênicos têm tornado muitos dos antibióticos hoje disponíveis de baixa eficácia<sup>(66)</sup>. Subgrupos resistentes dentro de uma espécie de organismo podem surgir rapidamente e tornarem-se patógenos dominantes como resultado da pressão seletiva causada por uso abusivo de antibióticos, vacinações ou novas tecnologias. Essa emergência de sub-populações resistentes, sobretudo na última década, veio trazer um considerável adicional de trabalho e custos às unidades de saúde. Isto vem se somar aos custos decorrentes de infecções hospitalares, que, apenas nos Estados Unidos, representam cerca de 4,5 bilhões de dólares anuais<sup>(64)</sup>.

Diversos métodos moleculares vêm sendo utilizados para tipagem de isolados de *P. aeruginosa* incluindo o PFGE e a amplificação de fragmentos polimórficos muito longos (AFLP). Estudos moleculares são realizados para investigar a transmissão clonal e mecanismos de resistência a antibióticos que possam explicar essas multirresistências<sup>(14)</sup>.

O uso de PFGE tem sido um dos métodos mais utilizados e critérios claros para a definição de limites entre linhagens foram propostos<sup>(67)</sup>. Além de PFGE,

métodos baseados na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de sequencia polimórficas dos genes ribossômicos (ribotipagem) são métodos largamente utilizados<sup>(64)</sup>.

O PFGE é uma variação da técnica de análise por restrição enzimática (REA) que permite avaliar fragmentos de DNA maiores. Esse perfil é obtido pela utilização de enzimas de restrição que reconhecem sítios infrequentes no genoma bacteriano. O número de fragmentos gerados é menor e os perfis são analisados após eletroforese especial na qual se aplica um campo elétrico de polaridade alternada<sup>(12,16)</sup>.

Dentre as técnicas de tipagem baseadas em PCR, a técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) baseia-se na amplificação sem conhecimento prévio do número de ocorrências de hibridação da seqüência alvo. Este método possibilitou melhor discriminação das amostras, quando comparado com a técnica de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE)<sup>(68)</sup>. As técnicas denominadas de REP-PCR e ERIC-PCR se caracterizam pela utilização de iniciadores complementares às regiões conservadas de seqüências repetitivas, amplificando o DNA localizado entre elementos repetitivos sucessivos em bactérias gram-negativas (*REP - repetitive extragenic palindromic elements* e *ERIC - enterobacterial repetitive intergenic consensus*)<sup>(69)</sup>. A função dessas seqüências repetitivas, em bactérias, é desconhecida, podendo estar envolvidas na regulação da transcrição e tradução ou na manutenção da organização do cromossomo<sup>(70)</sup>. A seqüência ERIC foi identificada em *E. coli*, *S. typhimurium* e outras espécies da família *Enterobacteriaceae*. Esses elementos foram chamados unidades repetitivas intergênicas ou repetições enterobacterianas intergênicas conservadas. Os iniciadores utilizados são construídos na direção de dentro para fora dos elementos ERIC consecutivos, amplificando as regiões entre os mesmos desde que tenham uma distância de alcance de amplificação da *Taq DNA* polimerase<sup>(71)</sup>.

Estudos comparativos entre os métodos PFGE e ERIC-PCR utilizando linhagens de *P. aeruginosa* de diferentes fontes, incluindo amostras clínicas, ambientais e de coleção de culturas, mostraram que linhagens clonalmente relacionadas puderam ser efetivamente agrupadas pelos dois métodos. A técnica de ERIC-PCR produziu resultados semelhantes à técnica de PFGE na diferenciação de cepas de *S. sonnei* envolvidas em seis episódios de infecção<sup>(72)</sup>. Porém, dependendo dos iniciadores utilizados, a resolução pode ser afetada ou identificar polimorfismos além dos limites epidemiológicos definidos pelo PFGE. Assim, os autores sugerem o uso inicial de ERIC-PCR para determinação da relação clonal entre os isolados de maneira rápida

e de custo mais acessível, com uso de um único iniciador como o ERIC2, o que permitiria ao microbiologista clínico solucionar a maioria das epidemias nosocomiais. Numa etapa posterior, o PFGE seria utilizado para confirmação dos dados de ERIC-PCR e para um ajuste fino das medidas sanitárias e clínicas já adotadas a partir dos dados do ERIC-PCR<sup>(73)</sup>.

Speijer e col. compararam os métodos AFLP, ERIC-PCR e PFGE em estudo de endemicidade de isolados de *P. aeruginosa* em uma UTI. Seus resultados mostraram que o PFGE (52 padrões, 44 genótipos) possuiu o maior poder discriminatório, seguido do AFLP (50 padrões, 44 genótipos), e do ERIC-PCR (49 padrões, 42 genótipos), e as vantagens e desvantagens de cada método são discutidas. O ERIC-PCR, apesar do menor poder discriminatório, é o método de menor custo e o mais rápido, exigindo o menor uso de mão-de-obra. A falta de reprodutibilidade do ERIC-PCR foi citada como a principal desvantagem nesse estudo. O PFGE possui um poder discriminatório de alta reprodutibilidade, porém, é laborioso. O AFLP se mostrou intermediário aos outros dois métodos em questão de tempo até o resultado, porém, é o mais caro<sup>(74)</sup>.

O aspecto de reprodutibilidade torna-se de maior importância em estudos multicêntricos, onde diferentes protocolos podem exacerbar diferenças. Em trabalho com 40 isolados de *Acinetobacter baumannii* de sete laboratórios localizados em seis países europeus, foi demonstrado que padrões de RAPD gerados em diferentes laboratórios podem ser obtidos de maneira reprodutível se os reagentes tiverem sua qualidade controlada, se o método de extração de DNA for padronizado e se as condições de amplificação padronizadas forem empregadas<sup>(75)</sup>.

Além do ponto de vista técnico, várias outras dúvidas estão envolvidas na escolha do teste ideal. Primeiro, não existe uma concordância geral para um teste de tipagem ótimo a ser usado para os diversos patógenos. Segundo, embora exista uma concordância geral que análises comparativas entre diversos métodos de tipagem sejam feitas para comparações entre bactérias, algumas discrepâncias são esperadas. Diversos estudos têm sugerido que a combinação de dados obtidos de diferentes métodos de tipagem irá mostrar melhores resultados dentro de um cenário de cepas relacionadas. Apesar disto, apenas um número pequeno de estudos mostram com detalhes a variabilidade encontrada entre diferentes técnicas de tipagem<sup>(73)</sup>.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar dois métodos moleculares para estudo epidemiológico de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes a antibióticos, coletados de infecções nosocomiais em dois hospitais universitários da cidade de Curitiba, com a finalidade de definição de metodologia padrão para vigilância e controle epidemiológico.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Propor a adoção de método reprodutível para identificação de linhagens de *P. aeruginosa* de ocorrência em ambiente hospitalar.
- Identificar a clonalidade dos isolados disponíveis para permitir inferências acerca do endemismo de *P. aeruginosa* multi-resistente nos hospitais estudados.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Definição de Caso de *Pseudomonas aeruginosa* Carbapenem Resistente (Critérios de Inclusão)**

Foram considerados, neste estudo, casos de infecção ou colonização nosocomial por *P. aeruginosa* carbapenêmico resistente (*PaCR*). Estes casos foram definidos como qualquer caso de paciente com isolamento de *P. aeruginosa* com resistência ou sensibilidade intermediária a imipenem e ou meropenem, independente da resistência a outros antimicrobianos, adquiridos pelo paciente em intervalo de tempo  $\geq 72$ h após a sua admissão em um dos dois hospitais de referência em Curitiba. A bactéria poderia ser isolada de qualquer sítio anatômico de paciente no período do estudo (janeiro de 2001 – dezembro de 2004). Foi considerada apenas um isolado por paciente.

### **4.2 Hospitais em Estudo**

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) é um hospital terciário de 643 leitos localizado na cidade de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. Possui 6 UTIs em diversas especialidades e média de 1708 internações mensais. Hospital Universitário Cajuru da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (HUC-PUCPR) é também um hospital terciário com ênfase no atendimento de trauma com 325 leitos totais e destes, 29 leitos de UTI, com uma média de 10504 atendimentos mensais, localizado também na cidade de Curitiba.

### 4.3 Isolamento e Identificação

A análise do perfil de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* do HC-UFPR, do período de janeiro de 2001 a dezembro de 2004, foi realizada através de um levantamento de dados retrospectivo sobre a atividade dos antimicrobianos testados na rotina da Seção de Bacteriologia do HC-UFPR. Os isolados do HUC-PUCPR foram obtidos no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004 e processados no laboratório de microbiologia do HUC-PUCPR. Os dados foram obtidos a partir de relatórios dos resultados do teste de disco difusão (DD), sendo selecionados os isolados de interesse.

Os isolados foram provenientes de amostras clínicas enviadas a Seção de Bacteriologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFPR e ao Laboratório de Microbiologia do HUC-PUCPR, nos períodos citados anteriormente. Esses isolados compreendem vários materiais, entre os quais estão: aspirado traqueal, lavado broncoalveolar (LBA), líquido, sangue, cateter, líquido peritoneal, urina e outros (abscesso, biópsia, ponta de cateter, líquido abdominal, mini-lavado bronco alveolar). As clínicas do HC-UFPR envolvidas no estudo foram UTI – adulto, UTI - cardiológica, UTI – pediátrica, serviço de emergência clínica adulto (SEC-ad.), UTI-SEC, ortopedia, urologia, clínica médica masculina (CMM) e feminina (CMF), infectologia, cirurgia do aparelho digestivo, neurologia, neurocirurgia, transplante hepático, risco intermediário, nefrologia e Pronto Atendimento. Do HUC-PUCPR foram incluídas amostras provenientes de pacientes da UTI e Postos de Internação. Os isolados foram armazenados em tubo criogênico contendo BHI com 10% de glicerol, em freezer - 80°C.

As amostras selecionadas já haviam sido identificadas por testes bioquímicos de rotina segundo manual da ASM e antibiograma pela metodologia de Kirby-Bauer na Seção de Bacteriologia do HC-UFPR e do HUC seguindo os critérios de interpretação estabelecidos pelo CLSI (*Committee Laboratory Standards International*) antigo NCCLS 1981: Document M2-A2 S2; NCCLS 2003: Document M2-A8<sup>(76,77,78,79)</sup>.

#### 4.4 Identificação Bioquímica de *P. aeruginosa*

Setenta e dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistentes foram submetidos a uma série de provas bioquímicas para confirmação da identificação da espécie, tendo sido considerado para inclusão na pesquisa, um isolado por paciente. Desses, 10 foram excluídos por não serem *P. aeruginosa*, permanecendo no trabalho 62 isolados. A série bioquímica utilizada (tabela 1) foi estabelecida por Mac Faddin, (2000), compreendendo provas relevantes para a identificação do microrganismo em estudo<sup>(80)</sup>.

Tabela 1 - Identificação bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa*

TESTES BIOQUÍMICOS	<i>P. aeruginosa</i>
Oxidase	+
Of glicose	+
Motilidade	+
Pseudo F	C – Pig Verde
Pseudo P	C - Pig Verde
Cresc 42°C	C
Acetamida	+
NO <sub>3</sub> – NO <sub>2</sub>	+
Gás Nitrogênio	+
Liq Gelatina	+
Cetrimide 30°	C – Pig Verde
Of xilose	+
Arginina	+
MacConkey	C

Fonte: MacFaddin (2000)

Nota: (+): prova positiva; C: crescimento; C - Pig Verde: crescimento com pigmentação verde

#### 4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima, que vem a ser a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano, foi determinada pelo método de ágar-diluição. O teste consiste em submeter uma concentração fixa de suspensão bacteriana frente a concentrações crescentes de

antibiótico adicionadas a meio de cultura apropriado, incubação em estufa a 35,5°C durante 18-24 horas.

Foram testados os seguintes antibióticos: Ciprofloxacina (CIP), Amicacina (AMI), Gentamicina (GEN), Aztreonam (ATM), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CPM), Piperacilina/Tazobactam (PIP/TAZ), Polimixina B (POLI), Imipenem (IPM), Meropenem (MEN). O método foi realizado conforme normas do CLSI, 2003. O controle de qualidade foi feito com cepas ATCCs *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *E. coli* 25922<sup>(77)</sup>.

#### 4.5.1 Agentes Antimicrobianos

Os sais antimicrobianos utilizados (tabela 2) apresentavam nome genérico da droga no rótulo, bem como sua potência e a data de vencimento. Os sais foram armazenados num dessecador, seguindo as instruções do fabricante. A equação a seguir foi utilizada para determinar a quantidade necessária para a solução padrão:

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

Tabela 2 - Critérios de interpretação de suscetibilidade do teste de CIM segundo o NCCLS para isolados de *P. aeruginosa* e cepas controle

ANTIMICROBIANOS	S ( $\mu\text{g/mL}$ )	I ( $\mu\text{g/mL}$ )	R ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>E. coli</i> 25922 ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>P. aeruginosa</i> 27853 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Amicacina	$\leq 16$	32	$\geq 64$	0,5 - 4	1 - 4
Aztreonam	$\leq 8$	16	$\geq 32$	0,06 - 0,25	2 - 8
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$	0,004 - 0,015	0,25 - 1
Ceftazidime	$\leq 8$	16	$\geq 32$	0,06 - 0,5	1 - 4
Cefepime	$\leq 8$	16	$\geq 32$	0,015 - 0,12	1 - 8
Gentamicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$	0,25 - 1	0,5 - 2
Imipenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$	0,06 - 0,25	1 - 4
Meropenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$	0,008 - 0,06	0,25 - 1
Pip./Tazobactam	$\leq 16/4$	32/4-64/4	$\geq 128/4$	$\frac{1}{4}$ - 4/4	$\frac{1}{4}$ - 8/4
Polimixina B	$\leq 2$		$\geq 4$	0,25 - 2	0,25 - 2

Fonte: NCCLS (2003)

Nota: Sensível (S); Intermediário (I); Resistente (R).

As soluções padrão de agente antimicrobiano foram preparadas em concentrações de duas diluições acima da concentração considerada resistente (tabela 3). As soluções padrão esterilizadas foram acondicionadas em frascos de polietileno, selados cuidadosamente e armazenados à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . As soluções padrão da maioria dos agentes antimicrobianos podem ser armazenadas a  $-60^{\circ}\text{C}$ , ou menos, durante seis meses, ou mais, sem perda significativa de atividade.

Tabela 3 - Concentrações das soluções estoque e concentrações testadas para amostras de *P. aeruginosa*

ANTIMICROBIANOS	CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE ( $\mu\text{g/ml}$ )	INTERVALO DAS CONCENTRAÇÕES ( $\mu\text{g/ml}$ )
Amicacina	25600	0,5 - 256
Aztreonam	12800	0,06 - 128
Ciprofloxacina	1600	0,006 - 16
Ceftazidima	12800	0,12 - 128
Cefepime	12800	2 - 128
Gentamicina	6400	1 - 32
Imipenem	6400	0,25 - 64
Meropenem	6400	0,25 - 64
Pip./Tazobactam	51200/4	16/4 - 512/4
Polimixina B	800	0,25 - 8

#### 4.5.2 Diluição em Placas de Ágar

As diluições da solução antimicrobiana foram acrescentadas em ágar fundido que se permitiu chegar ao equilíbrio em banho-maria a temperaturas de  $45$  a  $50^{\circ}\text{C}$ . O ágar e a solução antimicrobiana foram misturados completamente e a mistura colocada em placas de Petri plásticas descartáveis numa superfície até se obter uma camada de ágar de 3-4mm de profundidade. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente, as placas foram armazenadas em sacos plásticos entre  $2-8^{\circ}\text{C}$ , para utilização posterior. Como as placas foram armazenadas a temperaturas de  $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$ , foram mantidas à temperatura ambiente até chegar ao equilíbrio antes de serem usadas.

#### 4.5.3 Inóculo para Testes de Diluição

O inóculo, tanto dos isolados testados quanto dos controles (*E. coli* 25922, *P. aeruginosa* 27853), foi preparado fazendo-se uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar por 18 a 24 horas. Utilizou-se o ágar TSA, por ser um meio não seletivo. A suspensão foi ajustada com auxílio de aparelho fotométrico, em absorbância de 625nm para que sua turbidez coincidissem com a da solução padrão MacFarland 0,5.

#### 4.5.4 Padronização do Inóculo

As culturas que foram ajustadas ao padrão MacFarland 0,5 continham  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, sendo o inóculo final necessário de  $10^4$  UFC por ponto de 5 a 8mm de diâmetro. O aplicador utilizado continha pontas de 3 mm que aplicavam 2 $\mu$ L, fazendo com que a suspensão de MacFarland 0,5 fosse diluída 1:10 em solução salina esterilizada, para obter uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. O inóculo final em ágar teve, então, aproximadamente  $10^4$  UFC por ponto.

#### 4.5.5 Diluição em Ágar

Foram distribuídas alíquotas de 100 $\mu$ L das amostras diluídas ( $10^7$  UFC/mL) em placas de ELISA de 96 poços por um multi-inoculador com 96 pinos. As placas de ágar foram marcadas para orientar os pontos de inóculo.

Primeiramente, foi inoculada uma placa de controle do crescimento (sem agente antimicrobiano) e, a seguir, começando pela concentração mais baixa, foram inoculadas as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Por último, foi inoculada uma segunda placa de controle do crescimento para

verificar se houve contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.

As placas inoculadas permaneceram em temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo tivesse sido absorvida pelo ágar. A seguir, as placas foram invertidas e incubadas, a 35,5°C, por um período de 16 a 20 horas.

#### 4.5.6 Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar

As placas foram colocadas numa superfície escura, não refletiva, para determinar os pontos finais. A CIM foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento, descartando qualquer colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo<sup>(77)</sup>.

### 4.6 PFGE (Eletroforese em Campo Pulsado)

#### 4.6.1 Preparo do DNA Bacteriano

Os isolados de *P. aeruginosa* foram cultivados por uma noite em placas de ágar nutriente. Foi feita uma suspensão do microrganismo em tampão SE numa turvação a 3,5 da escala Mac Farland. Em Banho Maria a 56°C, foi misturado 0,5 ml dessa suspensão com 0,5 ml de gel de agarose a 2% de baixo ponto de fusão. Em seguida essa solução foi bem misturada e depositada no molde de acrílico até preenchê-lo, colocando o bloco na geladeira até ficar solidificado. Os blocos foram removidos do molde e transferidos para um frasco (um para cada amostra) com solução tampão contendo proteinase K. Foram incubados a 56°C em Banho Maria por uma noite. Após esse período, os blocos foram lavados por 3 vezes com tampão Tris-EDTA (TE) por 30 minutos a 4°C. Uma vez prontos, esses blocos puderam ser armazenados em tampão TE por 3-6 meses.

#### 4.6.2 Clivagem do DNA com Enzimas de Digestão

O DNA bacteriano foi clivado com uma enzima de digestão, a *Xba*I. Para isso, foi recortada uma porção de aproximadamente 2mm<sup>2</sup> de cada bloco que foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf de 0,5ml. O bloco foi coberto com o tampão apropriado (conforme recomendado pelo fabricante da enzima) e guardado em geladeira por pelo menos 30 minutos. Após esse período, a solução tampão foi trocada por 100µl de tampão novo acrescido da quantidade adequada de enzima de restrição. O conteúdo do tubo foi misturado gentilmente e incubado à temperatura apropriada por pelo menos 4 horas. Blocos de DNA assim clivados devem ser guardados imediatamente em tampão TE por até uma semana.

#### 4.6.3 Preparo do Gel de Agarose Características da Eletroforese

Foi preparado gel de agarose a 1% em solução tampão Tris-Borato-EDTA (TBE). O poço do gel foi carregado com o bloco digerido, incluindo o padrão de massa molecular apropriado (0,0 a 1Mb concatâmeros de Lambda c/857 Sam7). Os poços foram selados com agarose fundida a 56°C. Em seguida foram resfriados 2 litros de solução tampão de eletroforese em geladeira por 30 minutos e colocado o gel dentro de um tanque, certificando-se que estava bem centralizado. Coberto o gel com tampão de corrida TBE e ajustados os parâmetros da corrida com uma temperatura de 12°C, ângulo de 120°, numa voltagem de 6V/cm e, então, ligado o aparelho. Após aproximadamente 24horas de corrida o gel foi retirado do tanque, corado com brometo de etídio (EtBr) numa concentração final de 1 micrograma/ml por 1:30h, descorado em água por 1:30h e fotografado sob luz ultravioleta<sup>(81)</sup>.

## 4.7 RAPD (ERIC-PCR)

### 4.7.1 Extração do DNA Bacteriano

Uma alçada de colônia bacteriana foi transferida para 20µl de 50mM NaOH-0,25% SDS, e aquecida a 95°C por 15 minutos. O lisado celular foi transferido para 980µl de água Milli Q estéril. Alíquotas de 2,5µl foram adicionadas diretamente à reação de PCR.

### 4.7.2 Preparo da reação de PCR

A mistura foi preparada a partir de tampão de PCR, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, concentração de 400µM de cada Deoxinucleosideo Trifosfato (dNTPmix), concentração de 12 pmoles do *primer* ERIC2 (Cy5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCAGCG-3') e água Milli Q para completar um volume final de 25µl. Por último, acrescentou-se uma concentração de 0,5U de DNA polimerase (Invitrogen®). Esta mistura foi em seguida distribuída em alíquotas de 22,5µl por tubo, para então receber as alíquotas de 2,5µl da solução de DNA extraído, perfazendo assim um volume total de 25µl de solução a ser submetida ao processo de amplificação.

### 4.7.3 Condições de Amplificação

As condições de amplificação definidas em termociclador PTC-200 (MJ Research) foram: desnaturação a 90°C por 30s, hibridação a 50°C por 1 min, e extensão a 70°C por 5 min. Após 30 ciclos, as reações foram incubadas a 70°C por mais 10 min<sup>(74)</sup>.

#### 4.7.4 Preparo do Gel de Agarose e Características da Eletroforese

Foi preparado gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA e colocado em uma cuba de eletroforese sendo coberto com 2l de tampão de corrida TBE. Em seguida, foi preparada uma solução para carregar os poços do gel de agarose com 4µl de tampão Tris-EDTA (TE) e 2µl de azul de bromofenol. Esta solução recebeu 10µl do produto final da PCR, perfazendo um total de 16µl de solução por poço. Foram utilizados 2µl de Padrão de Masa Molecular de 100pb (Amersham Bioscience) com 2µl de azul de bromofenol nas canaletas das extremidades. Os produtos de PCR foram, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob uma corrente de 100 Volts, por um período de 4h. Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da cuba e corado com EtBr a 0,5% por 30min. A seguir, descorado por mais 30min e, então, fotografado em sistema digital (Kodak EDAS-290)<sup>(82)</sup>.

#### 4.8 Análise dos Géis

Os géis resultantes, tanto da técnica de ERIC-PCR quanto do PFGE, foram analisados de forma visual. Inicialmente, após obtenção das imagens fotografadas, uma imagem negativa da fotografia foi gerada com auxílio do software Adobe Photoshop 7.0. Após a impressão dessas imagens, tomando-se como base as imagens dos padrões de massa molecular de cada gel, foram traçadas linhas horizontais sobre as imagens de forma que essa distribuição das diversas linhas horizontais ficasse padronizada em cada imagem impressa, para posterior análise. A partir de então, foram geradas planilhas codificadas para presença ou não de bandas através da numeração 0 e 1 (0 = ausência de bandas e 1 = presença de bandas) como será explicado detalhadamente mais a frente.

## 4.9 Métodos Estatísticos

### 4.9.1 Coeficiente de Similaridade

Após a análise visual dos diversos padrões de ERIC-PCR e PFGE, passou-se para a análise de similaridade entre os diversos perfis encontrados. A expectativa de um coeficiente de similaridade é representar a relação linear entre dois itens avaliados por um conjunto comum de  $p$  variáveis. Esses coeficientes, em sua maioria, são calculados a partir de variáveis binárias representando presença e ausência, com valores de 1 e 0 respectivamente. Portanto, a comparação de dois itens quaisquer (populações, clones, indivíduos, etc.) possibilita a construção de uma tabela 2X2 com formato de contingência, utilizando-se das frequências de bandas observadas na tabela. Na tabela de contingência abaixo exemplificamos quatro combinações dos tipos concordância e discordância possíveis.

		População P		Total
		Presença (1)	Ausência (0)	
População Q	Presença (1)	<b>a</b>	<b>b</b>	$a + b$
	Ausência (0)	<b>c</b>	<b>d</b>	$c + d$
	Total	$a + c$	$b + d$	$n$

$n = a + b + c + d$

Com as letras a, b, c e d assumindo as seguintes representações:

a = presença da banda em ambas as populações (número de contagens de concordância do tipo 1-1);

b = presença de bandas na população Q e ausência em P (número de contagens de discordâncias do tipo 1-0);

c = ausência da banda em Q e presença em P (número de contagens de discordância do tipo 0-1); e

d = ausência da banda em ambas as populações (número de contagens de concordâncias do tipo 0-0)

O coeficiente escolhido para este trabalho foi o de DICE (também conhecido como coeficiente de Nei e Li)<sup>(83)</sup>. A escolha de diferentes coeficientes de similaridade se dá em função dos objetivos propostos na pesquisa, do tipo de itens sob estudo e das propriedades inerentes a cada coeficiente. O motivo que levou à escolha do coeficiente de DICE foi o fato dele desconsiderar a concordância 0-0 e atribuir grande importância à concordância "positiva" 1-1, de acordo com a fórmula de cálculo:  $2a/(2a+b+c)$ . A princípio este coeficiente é considerado adequado para comparar itens muito diversos, como diferentes espécies, por exemplo. Como neste trabalho estamos analisando isolados não relacionados, acreditamos serem estes isolados diferentes entre si, sendo interessante adotar a proposta deste coeficiente que dá um peso maior para as concordâncias 1-1. Ao contrário, o coeficiente de Jaccard presta-se melhor para comparar populações dentro da mesma espécie em que concordâncias são mais frequentes<sup>(84)</sup>.

#### 4.9.2 Métodos de Agrupamento (Média das distâncias – UPGMA)

A aplicação de algoritmos hierárquicos (SAHN – Sequential, agglomerative, hierarchical and non-overlapping) é uma das formas mais comuns para avaliar a diferença genética a partir da similaridade obtida pelo índice de DICE. O método UPGMA (*unweighted pair-group method using an arithmetic average*) é geralmente o mais escolhido dentre os métodos. O agrupamento UPGMA visa obter um arranjo hierárquico das observações e possui propriedades satisfatórias, tais como uma alta estabilidade e maximização do coeficiente de correlação cofenética. O coeficiente de correlação cofenética é uma medida de distorção produzida pela redução dimensional obtida no agrupamento. Este coeficiente é uma correlação matricial entre a matriz de similaridade genética original e uma nova matriz de similaridade (matriz cofenética), derivada do dendograma UPGMA<sup>(84)</sup>. Este método

tem sido unanimidade nas diversas publicações na literatura dentro do tema "Epidemiologia Molecular"<sup>(14,67,72,73,74)</sup>.

Os dendogramas foram gerados pelo pacote de programas NTSYS 2.02. (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*). Como resultado desta análise obteve-se um quantidade de 25 tipos dendogramas com pequenas variações entre eles de forma que nenhum dos dendogramas gerados mostrou diferença no resultado final de agrupamento. Sendo assim optou-se por escolher o primeiro resultado.

#### 4.9.3 Análise dos Dendogramas

Na análise dos dendogramas, na técnica do ERIC-PCR foi considerado como ponto de corte, para considerar os isolados como pertencentes ao mesmo cluster, a homologia de 80% entre os isolados. Este valor foi definido a partir do resultado do PFGE. Em trabalho publicado por Speijer e col., em que também foi feita essa comparação, o autor também define este ponto de 80% de homologia em que a clusterização da técnica do ERIC-PCR coincide com a do PFGE<sup>(74)</sup>.

Já na técnica do PFGE, considerou-se os critérios propostos por Tenover em 1995. Nesse artigo, o autor considera a diferença de até 3 bandas como isolados intimamente relacionados, diferenças de 4 a 6 bandas como possivelmente relacionados e diferenças a partir de 7 bandas como isolados diferentes. Para este trabalho, considerou-se como isolados fazendo parte do mesmo cluster uma diferença de até 3 bandas, o que equivale a uma homologia de 92% entre os diversos isolados<sup>(67)</sup>.

#### 4.9.4 Comparações entre PFGE e ERIC-PCR

##### 4.9.4.1 Cálculo do Poder Discriminatório de Cada Teste

O poder discriminatório de uma técnica é uma estimativa da habilidade desta técnica de distinguir duas cepas não relacionadas. Hunter em 1990 descreveu uma fórmula que vem sendo utilizada para o cálculo do poder discriminatório das técnicas utilizadas para tipagem bacteriana.

Neste estudo utilizou-se esta fórmula para calcular o poder discriminatório (D) das técnicas PFGE e ERIC-PCR em isolados de *PaCR*.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^N a_j$$

Onde:

**N** - representa o número total de isolados testados,

**j** - representa um isolado em questão e

**a<sub>j</sub>** - representa o número de isolados na população estudada que são idênticos a "j".

Quando o resultado do teste for D=1, significa que a técnica foi capaz de distinguir cada membro de uma população de isolado de todos os membros dessa população. Se o resultado do teste for D=0, significa que todos os membros de uma população de isolados formam um *tipo* idêntico, ou seja, todos os isolados clínicos são iguais. Um índice de 0,50 significa que um isolado escolhido aleatoriamente de uma população de isolados terá 50% de chance de que o próximo isolado também escolhido aleatoriamente seja indistinguível do primeiro. Para que uma técnica de tipagem seja utilizada com confiança, um resultado  $D \geq 0,90$  é desejável<sup>(85)</sup>.

#### 4.9.4.2 Análise de validade do teste diagnóstico (ERIC-PCR) em relação ao teste padrão (PFGE)

Entende-se por validade o grau pelo qual uma mensuração é capaz de medir o que se propõe a medir, ou seja, o grau pelo qual o instrumento utilizado na mensuração, é capaz de determinar o verdadeiro valor daquilo que está sendo medido. Um sinônimo utilizado para validade é acurácia. Com este conceito básico de validade serão detalhados os aspectos conceituais e práticos dos indicadores de validade pela sua utilidade prática na vigilância epidemiológica e nas investigações de surtos. São eles: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)<sup>(86)</sup>.

Na tabela 4 estão as relações entre os resultados de um teste e o diagnóstico verdadeiro.

Tabela 4 - Avaliação da validade de um teste diagnóstico

RESULTADOS DO TESTE	(PADRÃO OURO)		TOTAL
	Presentes	Ausentes	
Positivo	Verdadeiro positivo (A)	Falso positivo (B)	Total dos testes positivos (A + B)
Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro negativo (D)	Total dos testes negativos (A + B)
TOTAL	Total de testes positivos (A + C)	Total de testes negativos (B + D)	Total (A + B + C + D)

#### Conceitos dos indicadores de validade

**Sensibilidade:** é a capacidade de um instrumento de reconhecer os verdadeiros positivos em relação ao total de doentes. No exemplo da tabela 4 vê-se a probabilidade de um resultado positivo do teste quando for realizado com pessoas que realmente apresentam o resultado positivo para doença.

Algebricamente:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{A+C}$$

Especificidade: é o poder de distinguir os verdadeiros negativos em relação ao total de doentes. No exemplo da tabela 4 vê-se a probabilidade de um resultado negativo no teste quando realizado em pessoas que realmente não apresentam o resultado positivo para doença.

Algebricamente:

$$\text{Especificidade} = \frac{D}{B+D}$$

**Observação:** a sensibilidade e a especificidade são atributos intrínsecos do teste.

No entanto, os indicadores de desempenho de instrumento quando aplicados em condições de campo são modificados pela proporção de casos da doença na população, ou seja, pela prevalência. Assim, para estimar a validade do instrumento em condições operacionais deve-se calcular um indicador denominado valor preditivo, cujo valor varia com a prevalência. Valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade de um caso identificado com um determinado instrumento ser de fato positivo. No exemplo da tabela 4 vê-se qual a probabilidade de uma pessoa com um resultado positivo no teste de *screening* realmente ter a doença.

Algebricamente temos:

$$\text{VPP} = \frac{A}{A+B}$$

Valor preditivo negativo (VPN): é a probabilidade de um resultado negativo obtido com um determinado instrumento ser de fato negativo. No exemplo da tabela 4 vê-se qual a probabilidade de uma pessoa com um resultado negativo no teste de *screening*, realmente não ter a doença<sup>(87)</sup>.

Algebricamente temos:

$$\text{VPN} = \frac{D}{C+D}$$

Considerando-se a ferramenta molecular avaliada neste trabalho (ERIC-PCR) em relação ao padrão ouro considerado que foi o PFGE, salienta-se que o

reconhecimento de clusters (grupos do UPGMA) dentre os isolados analisados é o principal objetivo dessas ferramentas. Logo, adaptando uma nova tabela de contingência para esta realidade, tem-se que:

Tabela 5 - Avaliação de validade do ERIC-PCR

		PFGE (Metodologia Padrão Ouro)	
		POS	NEG
ERIC- PCR(Metodologia Teste)	POS	Verdadeiro Cluster (V+) a	Falso Cluster b (F+)
	NEG	Falso NãoCluster (F-) c	Verdadeiro Não Cluster d (V-)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Distribuição de PaCR nos Diversos Sítios Anatômicos e Locais

As amostras de PaCR foram isoladas de diversos sítios anatômicos dos diversos pacientes inclusos na pesquisa, sendo considerado para esta análise um isolado por paciente, assim como de diversos setores dos hospitais em questão, como mostram as tabelas 6 e 7. Não foram avaliadas bactérias de ambiente nem de profissionais de saúde nesta pesquisa.

Tabela 6 - Ocorrência de sítios anatômicos de PaCR do HC-UFPR

SÍTIOS ANATÔMICOS	OCORRÊNCIA	
	n	%
Urina	12	23,5
Aspirado Traqueal	11	21,5
Escarro Simples	6	12,0
Ferida/Escara	5	10,0
Sangue	5	10,0
Cateter	3	6,0
Líquido Peritoneal	3	6,0
Liquor	2	4,0
Swab Retal	2	4,0
LBA/minibal	1	2,0
Secreção Abdominal	1	2,0

Nota: Asp. Traq.: Aspirado Traqueal; LBA: Lavado Broncoalveolar; MMINIBAL; Mini Lavado Broncoalveolar; S. ABDOMINAL: Secreção abdominal; L. PERITONEAL: Líquido peritoneal; S.RETAL: Swab Retal.

Tabela 7 - Ocorrência de sítios anatômicos de PaCR do HUC-PUCPR

SÍTIOS ANATÔMICOS	OCORRÊNCIA	
	n	%
LBA	4	37,0
Aspirado Traqueal	1	9,0
Ponta de cateter	1	9,0
Secreção abdominal	1	9,0
Escarro simples	1	9,0
Ferida/Escara	1	9,0
Sangue	1	9,0
Oso	1	9,0

Nota: Asp. Traq.: Aspirado Traqueal; LBA: Lavado Broncoalveolar; S. ABDOMINAL: Secreção abdominal.

Os tipos de sítios de origem dos isolados sugerem que, em sua grande maioria, a presença das *PaCR* signifique colonização. Apenas 20% dos isolados provêm de amostras de sítios estéreis como sangue, líquido e líquido peritoneal. Nos demais sítios, existe a probabilidade do isolamento de *PaCR* significar colonização.

É interessante observar que no HC-UFPR o sítio de maior ocorrência foi o trato urinário, considerando o aspirado traqueal separadamente do LBA (apesar de ambas serem exsudações do trato respiratório baixo). Diferentemente, o HUC-PUCPR apresentou o trato respiratório como a sua maior ocorrência e não houve isolados de urina. Nos principais trabalhos epidemiológicos desenvolvidos hoje, o principal sítio de ocorrência de *PaCR* é o trato respiratório baixo, aumentando assim o risco de Pneumonia associada à ventilação mecânica<sup>(7,31,32,88)</sup>.

As duas tabelas a seguir 8 e 9, mostram como se deu a distribuição das *PaCR* envolvidas neste estudo, nos diversos setores de ambos os hospitais.

Tabela 8 - Ocorrência de *PaCR* nos diversos setores do HC-UFPR

SETORES	OCORRÊNCIA	
	n	%
UTI-AD	23	45,0
SEC-AD	6	11,0
TMO	2	4,0
Ortopedia	2	4,0
SEC-PED	2	4,0
CMF.	2	4,0
CMM.	2	4,0
C. Geral	2	4,0
CAD	2	4,0
UTI-SEC	1	2,0
Infectologia	1	2,0
TX-HEPAT	1	2,0
C. Médica	1	2,0
Nerurocirurgia	1	2,0
CTCV	1	2,0
Neurologia	1	2,0
Urologia	1	2,0

Nota: TMO: Transplante de Medula Óssea; UTI – AD: Unidade de terapia intensiva adulto; SEC-AD: serviço de emergência clínica adulto; SEC-PED: serviço de emergência clínica pediátrica; UTI -SEC: Unidade de terapia intensiva do serviço de emergência clínica CMF.; clínica médica feminina; CMM: clínica médica masculina; TX-HEPAT: transplante hepático; C.MEDICA: Clínica Médica; C.GERAL: Cirurgia Geral; C.T.C.V.: Cirurgia Torácica Cardio-Vascular; CAD: cirurgia do aparelho digestivo

Tabela 9 - Ocorrência de PaCR nos diversos setores do HUC-PUCPR

SETORES	OCORRÊNCIA	
	n	%
UTI	7	64,0
Unidades de Internação	4	36,0

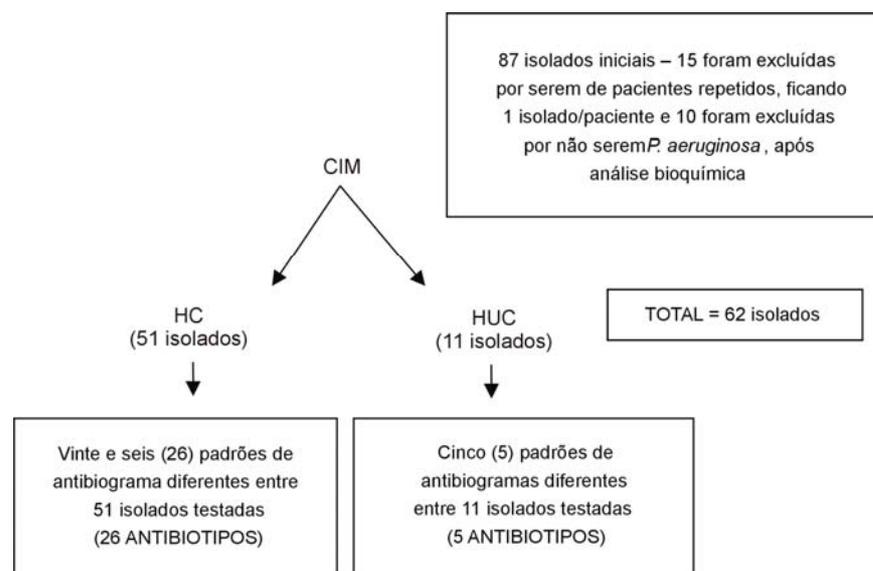
Nota: UTI: Unidade de Terapia Intensiva.

Cabe ressaltar que em ambos os Hospitais, os locais de maior ocorrência das PaCR foram as UTIs, dado este compatível com a literatura, onde também vemos a ocorrência maior dessas bactérias<sup>(45,50,60)</sup>.

## 5.2 Testes Fenotípicos

Foram estudados 72 isolados supostamente de *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistentes (PaCR), ou seja, resistentes a imipenem e ou meropenem, com suscetibilidade variável a diversos outros antimicrobianos como mostraremos mais adiante, testados pelo método de DD. Será apresentado na figura 1 o fluxograma dos padrões dos 62 isolados que foram inclusos no trabalho, após análise bioquímica realizada, como descrito anteriormente. A cada um desses padrões de antibiograma, será usada a nomenclatura de antibiótipos.

Figura 1 - Fluxograma de definição dos antibiótipos



Nota: CIM – Concentração inibitória mínima; HC – Hospital de Clínicas; HUC – Hospital Universitário Cajuru.

Após a definição dos antibiogramas de cada isolado, pela metodologia de diluição em caldo, organizou-se os dados de forma a facilitar a visualização das diversas possibilidades de tratamento para estes isolados, visto que a classe de maior potência (carbapenêmicos) apresentava-se resistente nestas amostras. Considerou-se esta organização de dados importante, para discutir algumas inferências que puderam ser feitas com base no antibiograma, como se verá mais adiante. Destaca-se os principais antibiotipos, por quantidade de ocorrência, com suas possibilidades terapêuticas, por Hospital.

Tabela 10 - Principais antibiotipos com suas possibilidades terapêuticas (HC-UFPR)

ANTIBIOTIPOS	N.º DO ISOLADO	N.º DE ISOLADOS
Isolados mostrando antibiotipos com possibilidade de tratamento somente com Polimixina B (associado ou não com aminoglicosídeo)		
1. Polimixina (POLI)	2- 4- 7- 13- 16- 18- 20- 22- 24- 28- 34- 35- 38- 48- 50- 51- 52- 62- 63	19
2. POLI / AMI	15- 33- 39- 43- 53	5
Isolados mostrando antibiotipos com possibilidade de tratamento somente com Polimixina B + $\beta$ -Lactâmico		
3. POLI / CAZ / CPM	3- 30	2
4. POLI / CAZ	12- 31- 41- 55- 66	5
Isolados mostrando antibiotipos com resistência a Polimixina com outras possibilidades de tratamento		
5. AMI	5	1
6. PIP-TAZ/CPM	8	1
7. AMI/CAZ/CPM/PIP-TAZ	21	1
8. CAZ/CPM	32	1
9. CIP / AMI /GEN /ATM / CPM / PIP-TAZ/MEN	64	1
10. CIP / AMI /GEN /ATM /CAZ/ CPM / PIP-TAZ/MEN	65	1

Nota: GEN: Gentamicina AMI: Amicacina; POLI: Polimixina; CAZ: Ceftazidime; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; PIP-TAZ: Piperacilina – Tazobactam; MEN: Meropenem; IPM: Imipenem.

Tabela 11 - Antibiotipos do HUC-PUCPR

ANTIBIOTIPOS	N.º DO ISOLADO	N.º DE ISOLADOS
Isolados mostrando antibiotipos com possibilidade de tratamento somente com Polimixina B		
1. POLI	69- 71- 72- 73- 74- 76- 77- 78- 80	9
Isolados mostrando antibiotipos com possibilidade de tratamento somente com Polimixina B + $\beta$ - Lactâmico		
2. POLI / CAZ	81	1
3. POLI / CAZ / CPM	70	1

Nota: POLI: Polimixina; CAZ: Ceftazidime; CPM: Cefepime.

A seguir, serão mostradas as tabelas de CIM de todos os isolados juntos em ambos os hospitais (tabela 12) e, após, separadamente por Hospital avaliado (tabela 13 e 14).

Tabela 12 - Valores da CIM 50 e CIM 90 do HC-UFPR e HUC-PUCPR

ATB	CIM50	CIM90	PONTO DE CORTE	N.º SENSÍVEIS	N.º TOTAL	% SENSÍVEIS
CIP	>16	>16	<1	7	62	11,29
AMI	64	>256	<16	19	62	30,64
GEN	>32	>32	<4	8	62	12,90
ATM	64	128	<8	5	62	8,06
CAZ	64	>128	<8	20	62	32,25
CPM	64	>128	<8	13	62	20,96
PIP/TAZ	256	>512	<64	9	62	14,51
POLI	2	4	<2	54	62	87,00
IPM	64	>64	<4	1	62	1,61
MEN	64	>64	<4	3	62	4,80

Nota: GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; POLI: Polimixina; CAZ: Ceftazidime; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; PIP-TAZ: Piperacilina – Tazobactam; MEN: Meropenem; IPM: Imipenem; MIC50: concentração inibitória mínima em que 50% dos isolados tem o seu crescimento inibido; MIC90: concentração inibitória mínima em que 50% dos isolados tem o seu crescimento inibido

Tabela 13 - Valores da CIM 50 e CIM 90 do HC-UFPR

ATB	CIM50	CIM90	PONTO DE CORTE	N.º SENSÍVEIS	N.º TOTAL	% SENSÍVEIS
CIP	>16	>16	<1	7	51	13,72
AMI	64	>256	<16	19	51	37,25
GEN	>32	>32	<4	8	51	15,68
ATM	32	64	<8	5	51	9,80
CAZ	32	64	<8	18	51	35,29
CPM	64	>128	<8	12	51	23,52
PIP/TAZ	256	>512	<64	9	51	17,64
POLI	2	4	<2	43	51	84,31
IPM	32	>64	<4	1	51	1,96
MEN	32	>64	<4	3	51	5,88

Nota: GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; POLI: Polimixina; CAZ: Ceftazidime; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; PIP-TAZ: Piperacilina – Tazobactam; MEN: Meropenem; IPM: Imipenem; MIC50: concentração inibitória mínima em que 50% dos isolados tem o seu crescimento inibido; MIC90: concentração inibitória mínima em que 50% dos isolados tem o seu crescimento inibido.

Tabela 14 - Valores da CIM 50 e CIM 90 do HUC-PUCPR

ATB	CIM50	CIM90	PONTO DE CORTE	N.º SENSÍVEIS	N.º TOTAL	% SENSÍVEIS
CIP	>16	>16	<1	0	11	0,00
AMI	64	>256	<16	0	11	0,00
GEN	>32	>32	<4	0	11	0,00
ATM	64	128	<8	0	11	0,00
CAZ	32	>128	<8	2	11	18,18
CPM	32	>128	<8	1	11	9,09
PIP/TAZ	256	512	<64	0	11	0,00
POLI	2	2	<2	11	11	100,00
IPM	32	>64	<4	0	11	0,00
MEN	32	>64	<4	0	11	0,00

Nota: GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; POLI: Polimixina; CAZ: Ceftazidime; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; PIP-TAZ: Piperacilina – Tazobactam; MEN: Meropenem; IPM: Imipenem; MIC50: concentração inibitória mínima em que 50% dos isolados tem o seu crescimento inibido; MIC90: concentração inibitória mínima em que 50% dos isolados tem o seu crescimento inibido.

Partindo-se dos resultados fenotípicos que foram detectados, observou-se vários antibiótipos identificados pelo antibiograma com predominância do Antibiótipo 1, contendo 19 isolados (HC-UFPR) e 9 isolados (HUC-PUCPR) que mostram sensibilidade somente a Polimixina B. A princípio, este resultado poderia sugerir uma disseminação clonal pelos hospitais em estudo, já que foram estudados isolados com antibiogramas muito parecidos, deixando dúvidas quanto a esta possibilidade.

É importante salientar que esta pesquisa foi realizada num cenário de endemicidade, com isolados de *PaCR* provenientes de diversos setores de ambos os hospitais, sem evidências iniciais de relação epidemiológica entre estes isolados, não caracterizando necessariamente um surto. Este tipo de seleção de amostras veio de encontro ao objetivo principal do trabalho que foi a avaliação de dois métodos de epidemiologia molecular para aplicação na prática do controle de infecção hospitalar. Segundo o consenso Europeu de avaliação de sistemas de tipagem epidemiológica, uma ferramenta de tipagem molecular para investigação epidemiológica pode ser usado para discriminação entre isolados não relacionados epidemiologicamente, pertencente à mesma espécie microbiana ou táxon, baseadas nos caracteres fenotípicos ou caracteres genotípicos chamados "marcadores epidemiológicos". Estas características foram contempladas neste trabalho<sup>(5)</sup>.

O resultados fenotípicos mostrados inicialmente justificam a importância desta investigação epidemiológica, observando as poucas opções terapêuticas nos isolados de *PaCR*, sendo algumas dessas opções não indicadas para o tratamento

desse tipo de bactéria. Publicações recentes exploram, como forma alternativa para tratamento desses germes, associações de antibióticos que muitas vezes encontram-se resistentes no antibiograma. Como exemplo, a associação de Polimixina B ao próprio meropenem, para avaliação de sinergismo, ou ainda a associação com Rifampicina, que demonstrou ser eficaz *in vitro* e o autor relata sucesso terapêutico desta associação em pacientes infectados por *PaCR* em estado grave<sup>(89)</sup>.

Outro dado que chama a atenção nos resultados é a porcentagem de sensibilidade à polimixina encontrada no HC-UFPR. Observa-se uma sensibilidade de 84,31% correspondente a 7 isolados com sensibilidade diminuída à Polimixina B. O significado clínico de uma pequena elevação na CIM da Polimixina B não está esclarecido. O ponto de corte de 2mg/L que determina a susceptibilidade da *P. aeruginosa* a este antimicrobiano, foi sugerido por Gales e col. baseado em concentrações séricas<sup>(90)</sup>. Numa publicação prévia, Polimixina B demonstrou ter atividade concentração dependente contra isolados de *P. aeruginosa* com CIM de 1 ou 2mg/L, e foi uniformemente bactericida em concentrações de 4mg/L. Porém, 4mg/L de Polimixina B foi menos ativa contra isolados com CIM de 4-8mg/L no referido estudo<sup>(91)</sup>. Além disso, um estudo experimental publicado por Kucers e col mostrou um novo crescimento de vários isolados expostos a uma concentração de 2 ou 4mg/L, concentração esta que não pode ser excedida pela impossibilidade de ultrapassar o intervalo e doses proposto, devido à toxicidade da droga<sup>(92)</sup>. Esses resultados sugerem que a susceptibilidade reduzida à Polimixina pode ser clinicamente relevante e pode comprometer o uso de Polimixina em regime de monoterapia contra esses isolados.

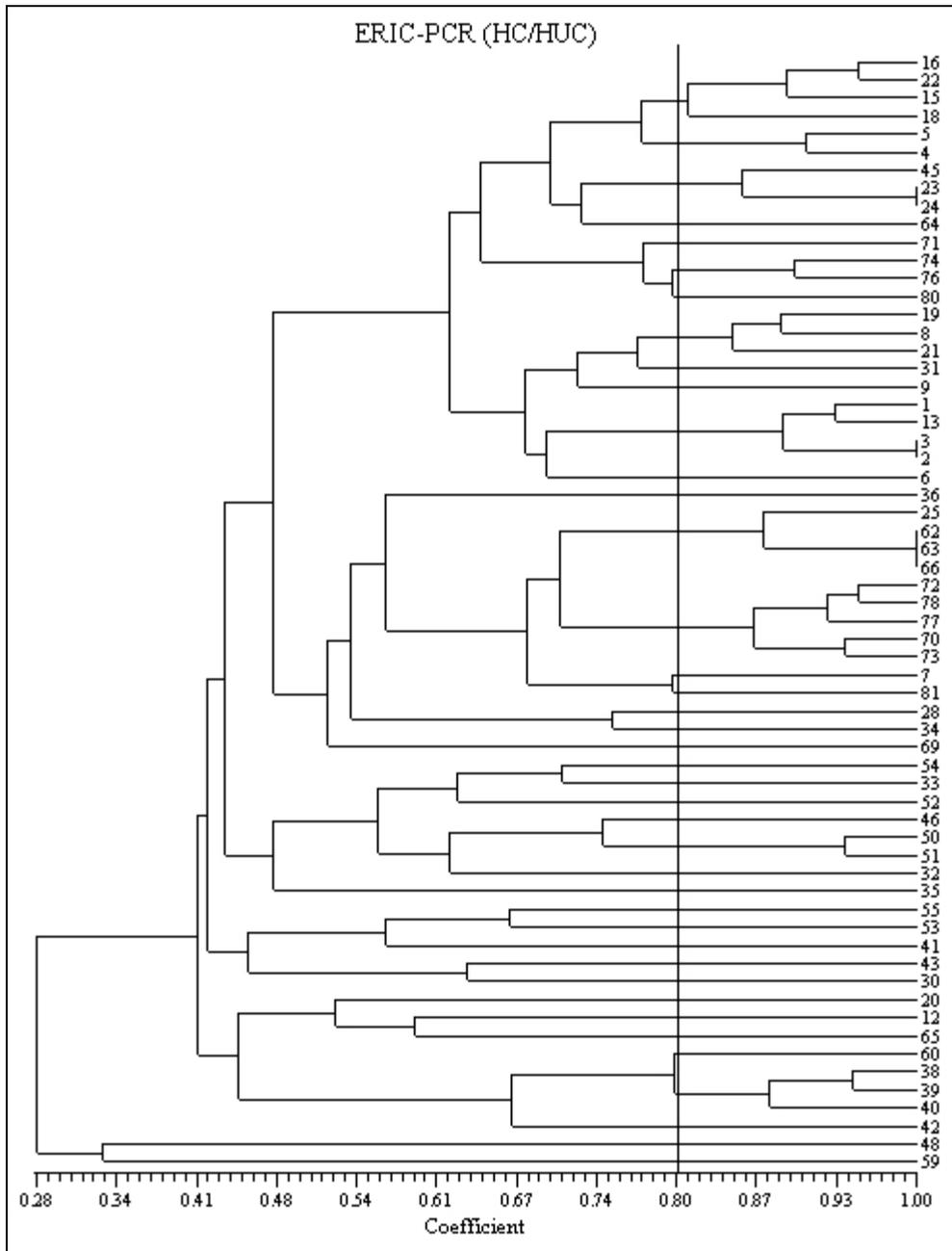
### **5.3 A Aplicação das Ferramentas Moleculares nos Isolados de *PaCR***

Após o processamento dos géis de eletroforese das técnicas de ERIC-PCR e PFGE, como já explicado no item 3.8 do capítulo de Materiais e Métodos, criou-se uma matriz, codificando a presença ou ausência de bandas nos diversos géis gerados. Em seguida, essa matriz foi aplicada ao programa NTSYS 2.02, para a formação de dendogramas para cada técnica utilizada. Inicialmente gerou-se dendogramas com todas os isolados para cada técnica realizada. Mais a frente, serão mostrados os dendogramas específicos da UTI do HC-UFPR nos anos de 2003 e

2004 e do HUC-PUCPR separadamente, para possibilitar uma avaliação epidemiológica mais segura.

Na análise dos dendogramas, é importante lembrar que na técnica do ERIC-PCR foi considerado como ponto de corte, para defini-los como pertencentes ao mesmo grupo, o ponto de 80% de homologia entre os isolados. Na figura 2 uma linha traçada define exatamente este ponto<sup>(74)</sup>.

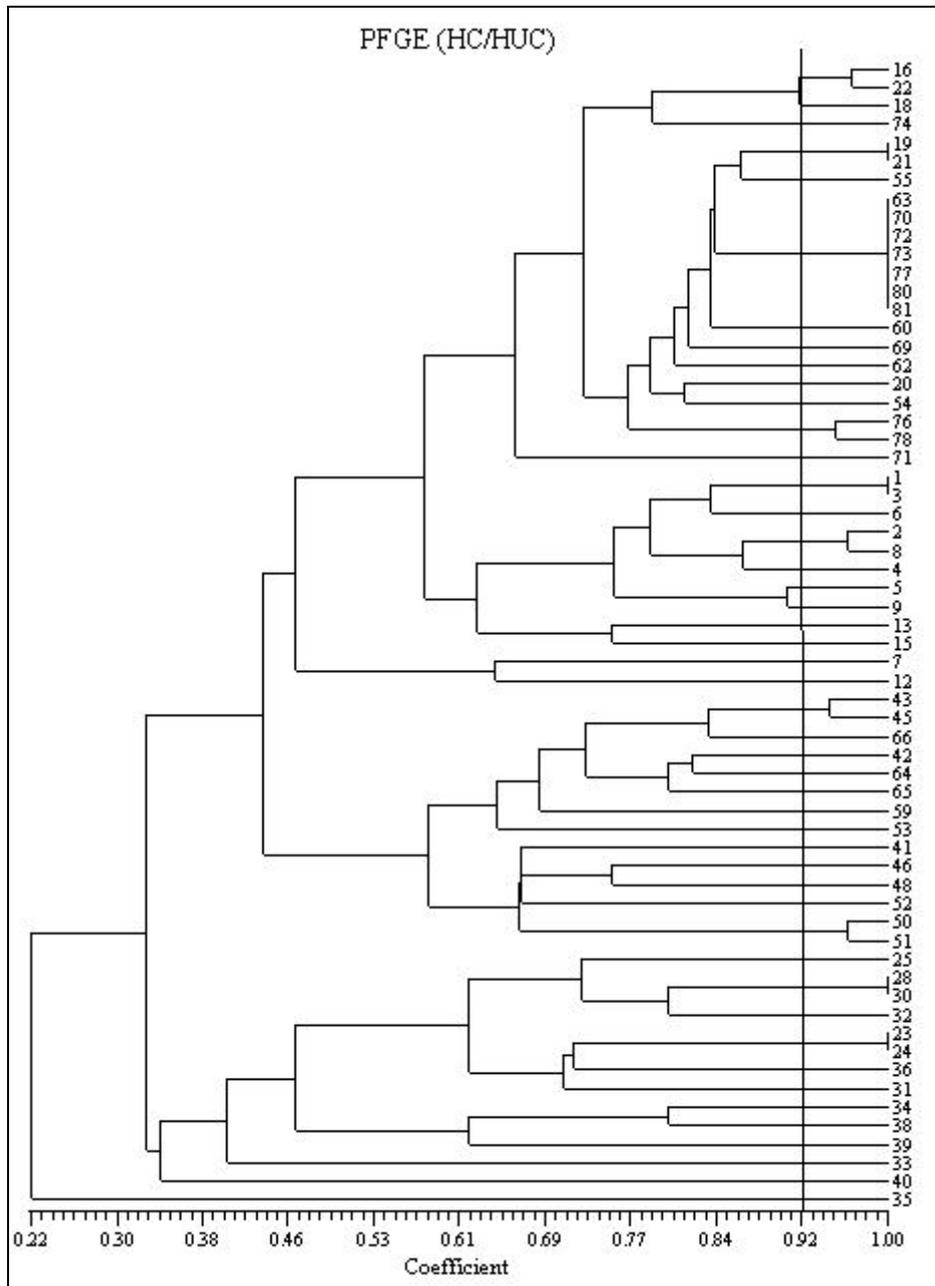
Figura 2 - Dendograma gerado pela técnica de ERIC-PCR



Nota: ERIC-PCR: enterobacterial repetitive intergenic consensus - Polymerase Chain Reaction; HUC: Hospital Universitário Cajuru; HC: Hospital de Clínicas.

Já na técnica do PFGE, considerou-se os critérios propostos por Tenover em 1995. Este ponto também foi demarcado com uma linha na figura 3 e corresponde a uma homologia de 0,92<sup>(67)</sup>.

Figura 3 - Dendograma gerado pela técnica de PFGE



Nota: PFGE: Pulsed Field Gel Eletrophorese; HUC: Hospital Universitário Cajuru; HC: Hospital de Clínicas.

Após a análise realizada pelo programa de geração de dendogramas (árvores), NTSYS 2.02, realizou-se a confirmação visual da clusterização, através do programa Adobe Photoshop 7.0, colocando os isolados coincidentes lado a lado para

confirmação visual. A seguir serão mostrados alguns exemplos destes resultados para ambas as técnicas utilizadas. Os resultados completos desta análise estão apresentados no Anexo.

Figura 4 - Resultado da metodologia ERIC-PCR (em duplicata) após avaliação de clusterização

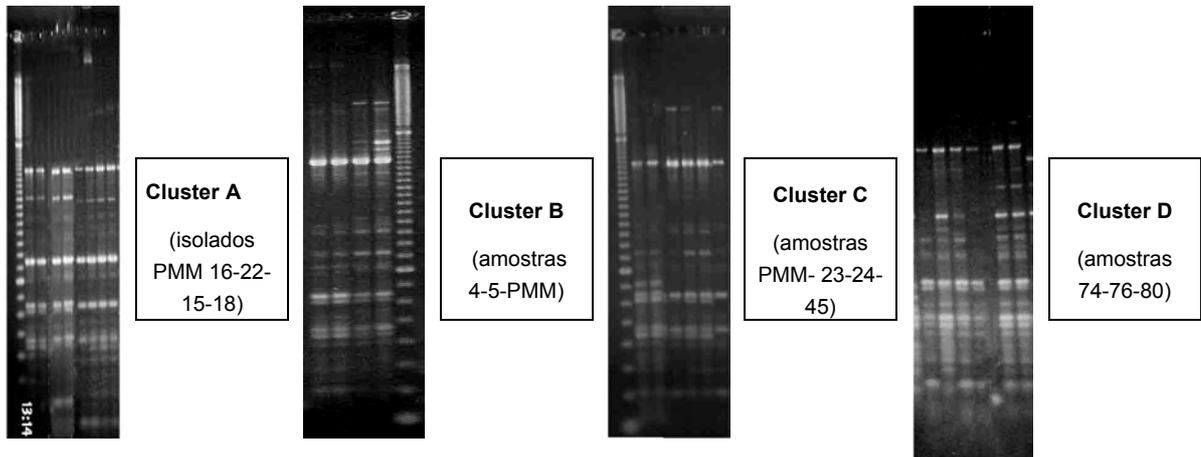
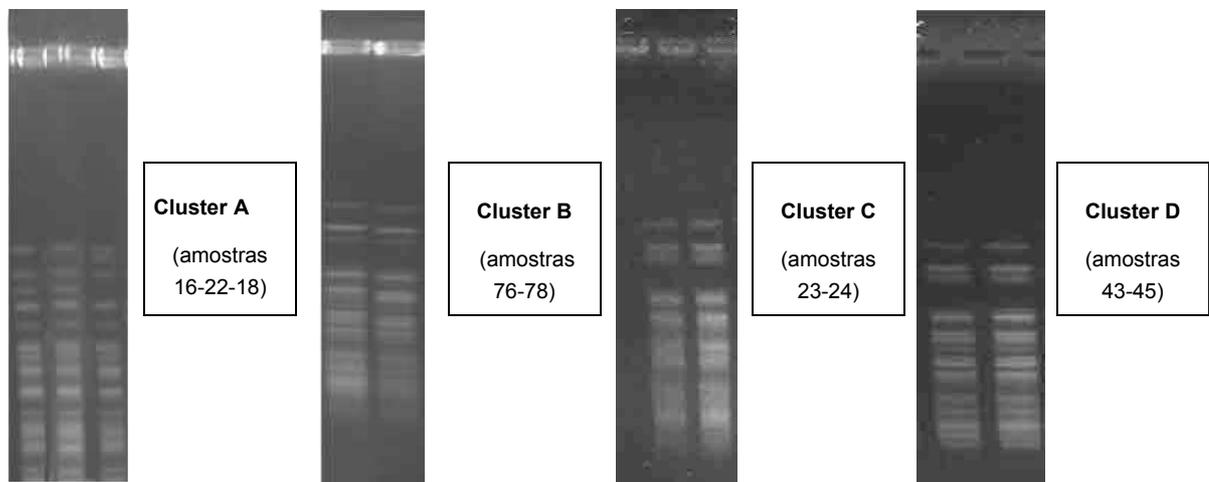


Figura 5 - Resultado da metodologia PFGE após avaliação de clustreização



Como já citado na revisão de literatura, diversos métodos moleculares são utilizados para investigar surtos de diversas bactérias, dentre elas, *PaCR*. Dessas ferramentas, a mais utilizada é a técnica de PFGE. De acordo com inúmeras publicações, trata-se de uma técnica reconhecida pelo seu alto poder discriminatório e reprodutibilidade<sup>(6,14,16,73,74)</sup>. Uma outra vantagem dessa ferramenta é a sua interpretação que foi muito bem estabelecida por Tenover e col. em 1985, num artigo em que o autor publica vários critérios que devem ser levados em consideração no

momento de sua análise. Ainda neste trabalho, o autor esclarece que, na prática, a tipagem com essa ferramenta é mais efetiva como uma ajuda na investigação de surto, quando aplicada a pequenos grupos de isolados epidemiologicamente relacionados. Os critérios descritos devem ser aplicados idealmente para um número de isolados, que não deve ultrapassar de 30, e o período de coleta desses organismos não deve ultrapassar de um ano. A justificativa para tal é a de que possíveis eventos genéticos podem ocorrer nestes isolados, como mutações, inserções e deleções, alterando assim o padrão de bandas entre os diversos isolados, comprometendo a sua análise de clonalidade<sup>(67)</sup>. No presente trabalho, a falta destes critérios pode ser considerada como uma limitação para utilização dessa ferramenta na análise dos resultados, já que o período do estudo compreende quatro anos, e o número de isolados ultrapassa 30.

Com relação a técnica de ERIC-PCR é importante salientar que não existe, até o presente momento, critérios bem estabelecidos para a sua realização. Com isso, optou-se, para este trabalho, a realização da técnica utilizando duplicatas para aumentar a segurança da interpretação dos dados.

Diferentemente do PFGE, o ERIC-PCR mostra um valor de repetibilidade baixo, como descrito por Foxman em uma revisão sobre o assunto, o que se confirmou neste trabalho<sup>(16)</sup>. Encontrou-se um valor de 65% de repetibilidade (dados não disponíveis) quando avaliou-se a técnica que foi realizada em duplicata, por isolado, considerando que as duplicatas deveriam ter 100% de similaridade. Como observado em outras publicações também notou-se o aparecimento das chamadas bandas fantasmas, que na verdade são as causadoras da grande dificuldade de interpretação da técnica<sup>(93)</sup>. Porém, quando da oportunidade de comparar as duas técnicas, ao cruzar os resultados de agrupamento de ambas as ferramentas, concluiu-se da importância da realização da técnica do ERIC-PCR em duplicata para diminuir as dúvidas com relação presença ou não de bandas. Na compilação dos dados para a montagem da planilha (0-1), em que 0 indica a ausência de bandas e 1 a presença de bandas, considerou-se todas as bandas que eram vistas em ambos os isolados. Este critério utilizado foi o que melhor se aproximou do resultado do PFGE. Essa diferença de análise encontrada na interpretação do ERIC-PCR não foi explorada aqui, por não estar contemplada no objetivo inicial deste trabalho.

#### 5.4 Cálculo do Poder Discriminatório, Validade do Teste Diagnóstico e outros Parâmetros Comparativos entre os Testes

Serão apresentados a seguir (tabelas 15 e 16) os resultados do poder discriminatório das duas ferramentas moleculares aplicadas neste trabalho, de acordo com a fórmula de cálculo do índice de Hunter, explicada no capítulo 3 (Materiais e Métodos)<sup>(85)</sup>.

Tabela 15 - Resultados do cálculo do poder discriminatório do PFGE/ERIC-PCR

	PFGE	ERIC-PCR
Número de Isolados não relacionados	62	62
Número de Tipos	45	39
Poder Discriminatório (D)	0.9825	0.9778

Nota: PFGE: Pulsed Field Gel Eletrophoresis; ERIC-PCR: enterobacterial repetitive intergenic consensus - Polymerase Chain Rea.

Tabela 16 - Resultado da validação do teste diagnóstico (cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) para o ERIC-PCR

INDICADORES DE VALIDAÇÃO	RESULTADO DA VALIDAÇÃO (%)
Sensibilidade = A/A+B	75,0
Especificidade = D/B+D	57,0
Valor Preditivo Positivo = A/A+B	45,5
Valor Preditivo Negativo = D/C+D	83,0

Para o adequado entendimento das tabelas 15 e 16, faz-se necessário a visualização da tabela 17 mostrada a seguir. Nesta tabela cada isolado envolvido no trabalho é analisado quanto à inclusão ou não em *clusters* (ou grupo), a sua classificação em "tipos" de acordo com a metodologia de tipagem realizada, a avaliação de concordância entre os testes de acordo com as *clusterizações* feitas e por último, o resultado de classificação de cada isolado para a tabela de contingência para o cálculo de validade do teste diagnóstico classificado com a, b, c e d (verdadeiro *cluster*, falso *cluster*, falso não *cluster* e verdadeiro não *cluster*, respectivamente) como mostra a tabela 5 do capítulo 4 (Materiais e Métodos).

Tabela 17 - Resultado de *clusterização* (colunas 1 e 2)/resultado de tipagem genética (colunas 3 e 4)/resultado de concordância entre os testes/classificação para tabela de contingências para o cálculo de validade do teste

continua

N.º DO ISOLADO	COLUNA 1 CLUSTER SIM/NÃO (PFGE)	COLUNA 2 CLUSTE SIM/NÃO (ERIC)	COLUNA 3 CLASSIF PFGE	COLUNA 4 CLASSIF ERIC	COLUNA 5 CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES	COLUNA 6 CLASSIFICAÇÃO PARA TABELA DE CONTINGÊNCIA (CÁLCULO DE VALIDADE DO TESTE)
16	S	S	A	A	S	a
22	S	S	A	A	S	a
18	S	S	A	A	S	a
74	N	S	K	D	N	b
19	S	S	E	E	S	a
21	S	S	E	E	S	a
55	N	N	b	c	S	d
63	S	S	H	G	N	b
70	S	S	H	H	S	a
72	S	S	H	H	S	a
73	S	S	H	H	S	a
77	S	S	H	H	S	a
80	S	S	H	D	N	b
81	S	N	H	Q	N	c
60	N	N	M	h	S	d
69	N	N	N	T	S	d
62	N	S	O	G	N	b
20	N	N	P	j	S	d
54	N	N	Q	U	S	d
76	S	S	B	D	N	b
78	S	S	B	H	N	b
71	N	N	R	L	S	d
1	S	S	F	F	S	a
3	S	S	F	F	S	a
6	N	N	S	O	S	d
2	S	S	v	F	N	b
8	S	S	C	E	N	b
4	N	S	T	B	N	b
5	S	S	G	B	N	b
9	S	N	G	N	N	c
13	N	S	U	F	N	b
15	N	S	V	A	N	b
7	N	N	X	P	S	d
12	N	N	Z	k	S	d
43	S	N	D	f	N	c
45	S	S	D	C	N	b
66	N	S	a	G	N	b
42	N	N	b	i	S	d
64	N	N	c	K	S	d
65	N	N	d	l	S	d
59	N	N	e	n	S	d
53	N	N	f	d	S	d
41	N	N	g	e	S	d
46	N	N	h	Z	S	d

Tabela 17 - Resultado de *clusterização* (colunas 1 e 2)/resultado de tipagem genética (colunas 3 e 4)/resultado de concordância entre os testes/classificação para tabela de contingências para o cálculo de validade do teste

N.º DO ISOLADO	COLUNA 1 CLUSTER SIM/NÃO (PFGE)	COLUNA 2 CLUSTER SIM/NÃO (ERIC)	COLUNA 3 CLASSIF PFGE	COLUNA 4 CLASSIF ERIC	COLUNA 5 CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES	conclusão
						COLUNA 6 CLASSIFICAÇÃO PARA TABELA DE CONTINGÊNCIA (CÁLCULO DE VALIDADE DO TESTE)
48	N	N	i	m	S	d
52	N	N	j	X	S	d
50	S	S	u	u	S	a
51	S	S	u	u	S	a
25	N	S	k	G	N	b
28	S	N	J	R	N	c
30	S	N	J	g	N	c
32	N	N	l	a	S	d
23	S	S	C	C	S	a
24	S	S	C	C	S	a
36	N	N	m	p	S	d
31	N	N	n	M	S	d
34	N	N	o	S	S	d
38	N	S	p	J	N	b
39	N	S	q	J	N	b
33	N	N	r	V	S	d
40	N	S	s	J	N	b
35	N	N	t	b	S	d

Nota: Colunas 1 e 2: Resultados de *clusterização* pelas metodologias ERIC-PCR e PFGE (S=SIM E N= NÃO); Colunas 3 e 4: Resultados de classificação dos isolados em diversos "tipos" classificados por letras do alfabeto maiúsculas e minúsculas; Coluna 5: Verificação de concordância entre as técnicas de ERIC-PCR e PFGE com relação as *clusterizações* (S=SIM E N= NÃO); Coluna 6: Classificação para tabela de contingência para o cálculo de validade do teste onde a= verdadeiro cluster, b= falso cluster, c=falso não cluster e d=verdadeiro não cluster (para o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo).

Com relação a análises comparativas de métodos, não são muitos os trabalhos que exploram esses dados para *PaCR* e, na sua maioria, não encontra-se um padrão de análise dessas comparações. Num trabalho publicado em 2004 por Silbert e col, a autora propõe como metodologia para essa análise, a utilização do índice de Hunter que calcula o poder discriminatório para cada técnica utilizada para tipagem de bactérias Gram-Negativas Não-Fermentadoras da glicose, assim como fez Grundmann em 1995, quando tipou *P. aeruginosa*<sup>(93,94)</sup>.

É interessante observar que mesmo com a análise do poder discriminatório em alguns trabalhos, não se vêem análises comparativas entre esses métodos, tomando-se por base algum deles que possa ser considerado como padrão ouro. Este tipo de comparação seria de grande importância para auxiliar na definição da real aplicabilidade dessa ferramenta, no esclarecimento dos diversos surtos em

que possa vir a ser aplicado. A análise do poder discriminatório é realizada de forma independente dentro de cada técnica avaliada. Logo, não há um sistema de comparação entre essas técnicas que possa quantificá-las. Cabe resaltar que na análise do poder discriminatório, dois testes podem ter resultados independentes excelentes, porém com resultados de agrupamentos diferentes, de forma a comprometer uma avaliação epidemiológica<sup>(93)</sup>.

Tomando-se por base a experiência que se mostra na literatura com o uso do PFGE como ferramenta de tipagem e de acordo com os principais consensos e revisões sobre o assunto, o presente estudo utilizou a técnica PFGE para uma avaliação comparativa com a técnica do ERIC-PCR<sup>(5,6,94,95)</sup>. Neste trabalho, além do cálculo do poder discriminatório para cada ferramenta, realizou-se o cálculo de validade do teste diagnóstico (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) para o ERIC-PCR considerando o PFGE como padrão ouro. Com este resultado confirmou-se numericamente a avaliação da maioria dos trabalhos, que definem o ERIC-PCR como sendo uma ferramenta que, idealmente, deve ser utilizada como um teste de triagem, para então submeter os isolados que se mostraram clonais a um outro método com melhor poder discriminatório e especificidade. Este dado fica claro com o resultado da validade do teste diagnóstico que mostrou sensibilidade de 75%, e uma especificidade muito baixa, de 57%, o que confirma que para definir se isolados idênticos são realmente idênticos, necessita-se de um outro método como o PFGE que tem melhor poder discriminatório, para tipagem de *P. aeruginosa*. Por outro lado, o que o ERIC-PCR mostrou ser não idêntico, teve boa confiabilidade, o que se confirma com o resultado do valor preditivo negativo de 83%.

Com relação ao poder discriminatório, cabe destacar aqui também a importância da palavra **melhor** no lugar de **maior**. Várias publicações realmente destacam o PFGE com um poder discriminatório maior que o da metodologia ERIC-PCR<sup>(16)</sup>. Porém, no trabalho de Silbert e col., assim como no presente trabalho, foram obtidos resultados muito bons para o poder discriminatório (D) mas que não necessariamente refletiram resultados epidemiológicos satisfatórios<sup>(93)</sup>. Logo, para a espécie *P. aeruginosa*, parece importante que se avalie um método onde se tenha **melhor** poder discriminatório, e não **maior**, particularmente quando se compara PFGE e ERIC-PCR.

Com isso, em se tratando de ferramentas moleculares, deve-se buscar a melhor metodologia de tipagem para cada espécie de bactéria. Esta técnica passa a ser considerada como padrão ouro, possibilitando assim comparações com outras metodologias que posteriormente venham a ser avaliadas. Este tipo de cálculo estatístico trará nova visão para diversos métodos que vêm sendo descritos na literatura, como ferramentas investigativas de surtos hospitalares. De acordo com o consenso Americano e Europeu, a técnica de PFGE é considerada como a melhor para a maioria das bactérias<sup>(5,6)</sup>.

Com relação a Tipabilidade, que é definida como a proporção de isolados em que são atribuídos um "tipo" pelo sistema de tipagem, este é outro parâmetro sugerido pelo Consenso Europeu de Sistema de Tipagens, como critério de desempenho de um método. Neste trabalho, foi possível tipar 100% dos isolados com ambas metodologias<sup>(5)</sup>.

Já o critério de Reprodutibilidade, que é definido como a habilidade de um sistema de tipagem de atribuir o mesmo *tipo* a isolados testados em experimentos separados, não pôde ser realizado neste trabalho. Campbell e col publicou em 2000 um trabalho em que avalia a reprodutibilidade e o cálculo de poder discriminatório com 200 isolados de *P. aeruginosa* em triplicata. Esses isolados eram de pacientes com fibrose cística, pacientes sem fibrose cística, isolados do ambiente e de cepas padrão. O seu resultado mostra reprodutibilidade que varia de 95 a 100%. Porém, neste caso, os experimentos foram realizados no mesmo centro e provavelmente pelos mesmos pesquisadores<sup>(96)</sup>.

O que se discute é quando a reprodutibilidade é avaliada por centros diferentes. Neste caso, as metodologias baseadas em PCR têm grandes desvantagens pelo grande número de variáveis que podem fazer a diferença no resultado final, diferentemente das técnicas de macrorestrição. Esses fatores são bem avaliados num artigo publicado por Tyler em 1997. O trabalho analisa fatores que afetam a confiabilidade e reprodutibilidade da técnica baseada em PCR, avaliando o iniciador ERIC 2, considerando a sua execução por diferentes centros. O trabalho avalia as principais fragilidades do método como diferença no tipo da Taq DNA polimerase utilizada, diferentes tipos de temperatura de hibridação e volume de reação, como fatores que colocam a reprodutibilidade em risco. Ao final do artigo, um resumo de dez recomendações é feito para garantir bons resultados no uso dessa ferramenta molecular<sup>(97)</sup>.

No presente trabalho optou-se por não realizar o teste de reprodutibilidade por restrições quanto ao custo necessário à sua realização e por tratar-se de uma bactéria que não traz dificuldades, quando na aplicação das técnicas moleculares aqui propostas, como evidenciado em diversas publicações<sup>(14,73,74)</sup>. Ainda assim, para trazer mais segurança aos resultados obtidos, considerando que a metodologia de PFGE foi proposta como padrão ouro, optou-se por repetir esta técnica para 28 isolados cuja imagem poderia deixar alguma dúvida. Como resultado, observou-se uma reprodutibilidade de 89,3%, pois 3 isolados apresentaram-se com novo padrão de tipagem (resultados não mostrados). Esta diferença, provavelmente foi decorrente da qualidade ruim de algumas amostras no primeiro exame e que exatamente por isso foram as amostras escolhidas para a repetição.

Outro parâmetro analisado no presente estudo foi a repetibilidade da técnica de ERIC-PCR, definida como a capacidade de um teste mostrar o mesmo resultado de tipagem dentro do mesmo experimento. Neste caso, optou-se por realizar essa avaliação somente para a técnica de ERIC-PCR, já que em nenhuma publicação realizada até hoje a técnica de PFGE é colocada em dúvida quanto a sua repetibilidade para a tipagem de *P. aeruginosa*. Como colocado no parágrafo anterior, a opção foi de preferir avaliar reprodutibilidade de alguns isolados a avaliar a repetibilidade dessa técnica. Como já apresentado anteriormente, a repetibilidade do ERIC-PCR foi de 65%, confirmando assim os dados de literatura que mostram uma repetibilidade comprometida nessa técnica<sup>(16)</sup>. Com isso, considerou-se de fundamental importância a realização da técnica de ERIC-PCR em duplicata. Caso essa técnica não fosse realizada em duplicata não teria sido alcançado o resultado obtido na tipagem desses isolados. Isto porque, o resultado final apresentado aqui nesta dissertação foi o que melhor se aproximou do PFGE quando foram consideradas o número máximo de bandas vistas em ambas as duplicatas, gerando ao final um único padrão. É interessante notar que em nenhum dos consensos avaliados existe orientação quanto à realização da técnica de ERIC-PCR em duplicata. Isto é esperado, já que não existe nenhuma publicação que estabeleça critérios sobre a realização e interpretação do ERIC-PCR, como o há com a técnica de PFGE, escrita por Tenover em 1995<sup>(6,67)</sup>. Isto reforça a importância dessas avaliações comparativas entre uma técnica já muito bem estabelecida na literatura, comparada com outra que contém muitas fragilidades,

mas que, quando bem empregada e interpretada, pode trazer grandes vantagens, e em tempo real, para o controle das infecções hospitalares.

A técnica de ERIC-PCR é considerada hoje por alguns autores como uma técnica de baixo a moderado poder discriminatório, média repetibilidade e baixa reprodutibilidade. Porém, deve-se considerar a sua facilidade na execução da técnica e seu baixo custo em relação ao PFGE<sup>(16)</sup>. Em trabalhos realizados por Speijer e col. e Renders e col. as duas técnicas são comparadas, mostrando que o ERIC-PCR é uma técnica indicada para uma triagem inicial na análise epidemiológica de *P. aeruginosa* tanto numa situação de surto, como num cenário de endemicidade, situações esta, que no nosso trabalho acontecem simultaneamente nos hospitais envolvidos<sup>(73,74)</sup>.

Recentemente um trabalho publicado por Pellegrino e col. confirma a possibilidade de utilização das técnicas baseadas em PCR para tipagem de *P. aeruginosa* multiresistente, em que utiliza vários iniciadores, dentre eles o ERIC2, comparando com o PFGE, mostrando segurança na técnica de tipagem com esses iniciadores, exceto o primer 1290<sup>(98)</sup>. Ainda neste ano de 2006, outro trabalho foi publicado, em que o autor, utilizando somente a técnica de RAPD, define como clonal a disseminação de *P. aeruginosa* numa UTI, relacionada à água de torneira dessa unidade<sup>(99)</sup>. Tendo em vista a necessidade premente de se definir técnicas a serem utilizadas rotineiramente no esclarecimento epidemiológico da disseminação dessas bactérias, torna-se de grande importância a reprodução de trabalhos, que possam confirmar a segurança ou não de técnicas como RAPD e ERIC-PCR, para que essas investigações tornem-se mais ágeis. Observando as diversas publicações no Pubmed, vemos que em sua grande maioria, são estudos realizados retrospectivamente, algum tempo após o ocorrido, devido ao grande trabalho e custo que as técnicas moleculares demandam. Com isso, fica impossibilitado uma intervenção mais próxima ao momento da ocorrência dos surtos, nas unidades em questão, não sendo possível, muitas das vezes, os esclarecimentos necessários para o controle adequado desses eventos no momento em que eles ocorrem<sup>(100,101)</sup>. Este trabalho visa oferecer uma saída para este problema, à medida que propõe uma validação para o uso de uma ferramenta de biologia molecular (ERIC-PCR) para tipagem de *P. aeruginosa*, esclarecendo a sua real aplicabilidade e possibilitando seu uso numa rotina de controle de infecção hospitalar.

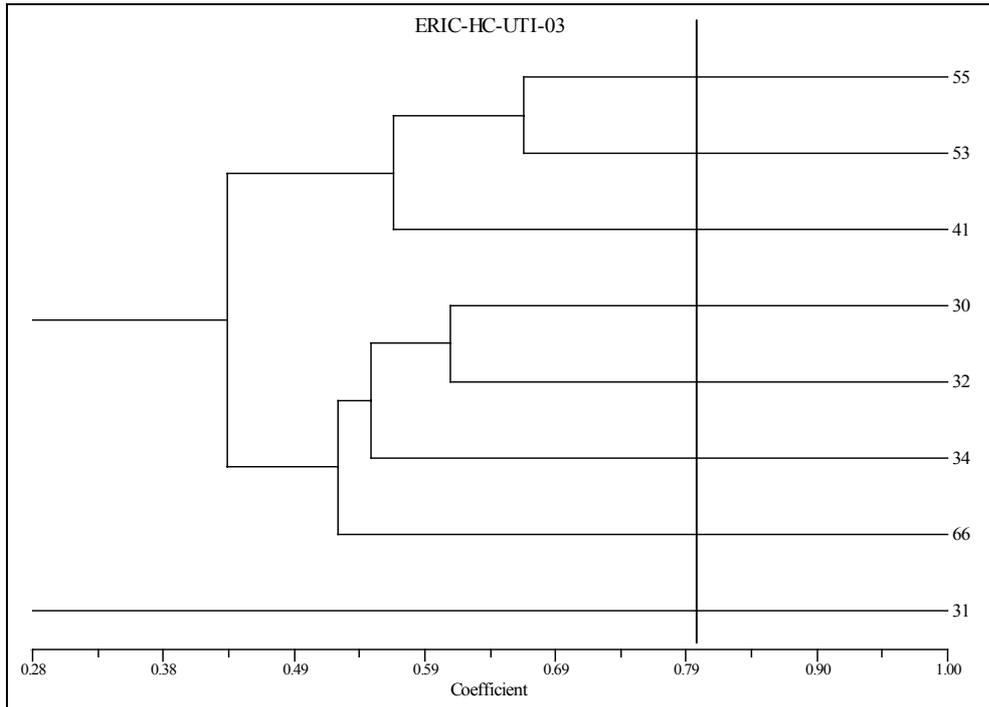
## 5.5 Avaliação Epidemiológica das PaCR

O outro objetivo destas técnicas, de acordo com os consensos publicados, é o reconhecimento de isolados relacionados, provenientes de um mesmo surto, refletindo o fato de que eles derivam de um ancestral recente e único, gerando assim a definição do que chamamos de clone. Para análise epidemiológica o presente estudo teve limitações pois o critério de inclusão dos isolados não foi relacionado com nenhum surto propriamente dito, e sim com as características dos microrganismos, baseados no seu perfil de resistência. Logo, foram analisados diversos isolados não relacionados, de diversos setores dos hospitais em estudo. É importante lembrar que para isolados epidemiologicamente não relacionados, o que se espera é que tenham genótipos diferentes, como foram os resultados obtidos.

Para possibilitar uma avaliação epidemiológica, visto que foram encontrados alguns clones nestes resultados, decidiu-se separar os isolados por setor, criando assim um critério de relação entre eles, considerando apenas os setores do HC-UFPR em que houve mais de 5 amostras. Sendo assim, organizou-se os dados para análise de dendogramas considerando a UTI-Adulto do HC-UFPR nos anos de 2003 e 2004, assim como as 11 amostras isoladas no HUC-PUCPR para cada técnica utilizada e considerando a data de isolamento dos isolados, gerando um total de 6 dendogramas para que esta avaliação fosse realizada.

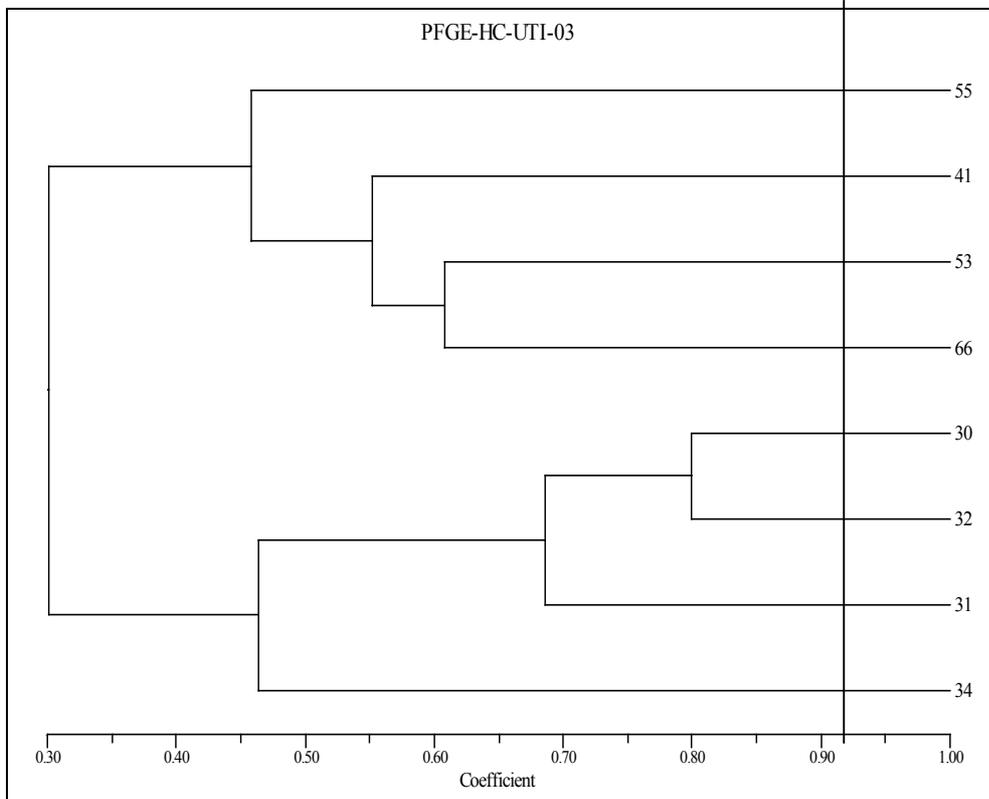
As figuras a seguir apresentam os dendogramas referentes à UTI-AD do HC-UFPR no ano de 2003 e 2004 e o dendograma dos isolados do HUC-PUCPR, seguido da discussão epidemiológica sobre cada árvore gerada pelas duas técnicas avaliadas. Salientamos que esse tipo de avaliação (por setor) oferece mais subsídios para informações epidemiológicas, para tomada de decisão, já que a tipagem torna-se mais efetiva quando aplicada a pequenos grupos de isolados epidemiologicamente relacionados<sup>(67)</sup>.

Figura 4 - Dendograma gerado pela técnica ERIC-PCR (UTI-HC) - 2003



Nota: ERIC-PCR: enterobacterial repetitive intergenic consensus - Polymerase Chain Reaction; UTI: Unidade de Terapia Intensiva HC: Hospital de Clínicas.

Figura 5 - Dendograma gerado pela técnica PFGE (UTI-HC) - 2003

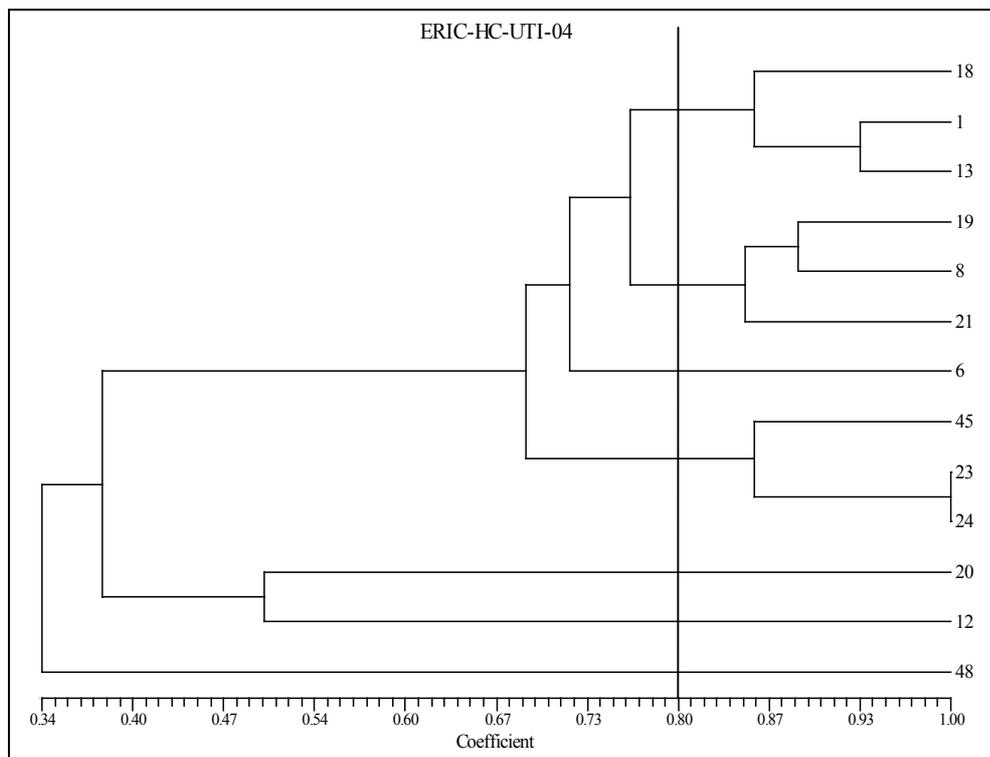


Nota: PFGE: Pulsed Field Gel Eletrophoresis; UTI: Unidade de Terapia Intensiva HC: Hospital de Clínicas.

Esta análise mostra policlonalidade de todas as amostras e que pôde ser confirmada pela data de isolamento das amostras, que aconteceu em meses bem diversificados. Apenas as amostras 32 e 34 foram isoladas em intervalos de 2 dias. Porém ambas técnicas confirmam as diferenças das cepas, não podendo ser considerados como clones. Com isso, conclui-se que no ano de 2003 não houve nenhuma disseminação clonal de *PaCR* na UTI-Adulto do HC-UFPR. Pôde-se considerar o aparecimento desse microrganismo esporadicamente, não relacionado a nenhum surto propriamente dito, resultados estes coincidentes com ambas as técnicas.

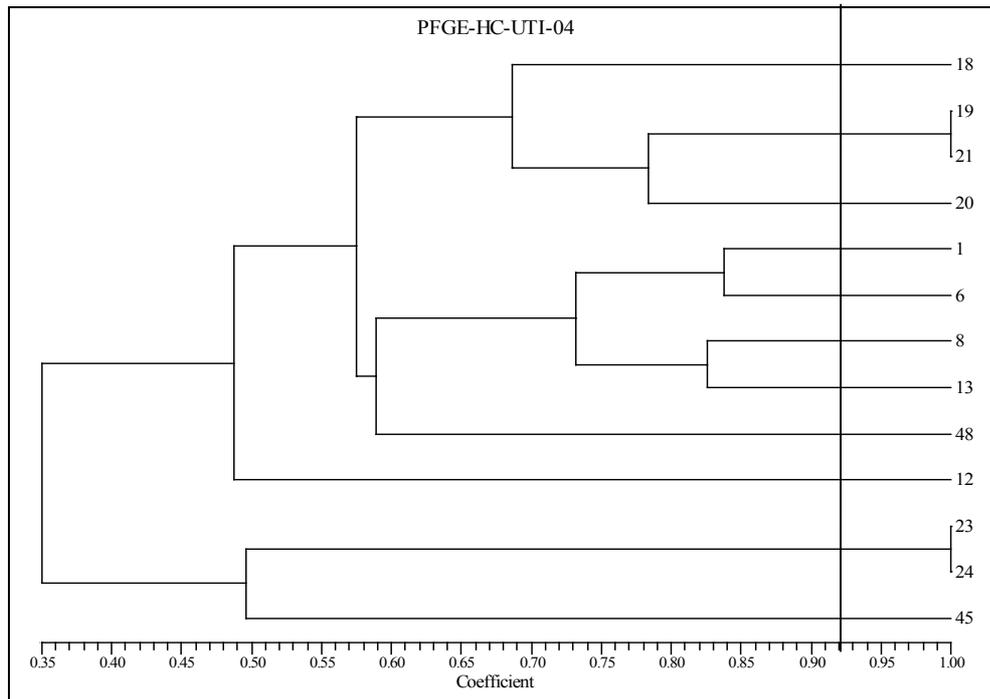
A seguir as figuras 6 e 7 mostram os dendogramas referentes a UTI-Adulto do HC-UFPR no ano de 2004 gerado pelas duas técnicas utilizadas neste trabalho.

Figura 6 - Dendograma gerado pela técnica ERIC-PCR (UTI-HC) - 2004



Nota: ERIC-PCR: enterobacterial repetitive intergenic consensus - Polymerase Chain Reaction;  
UTI: Unidade de Terapia Intensiva HC: Hospital de Clínicas.

Figura 7 - Dendograma gerado pela técnica PFGE (UTI-HC) - 2004



Nota: PFGE: Pulsed Field Gel Eletrophoresis; UTI: Unidade de Terapia Intensiva HC: Hospital de Clínicas.

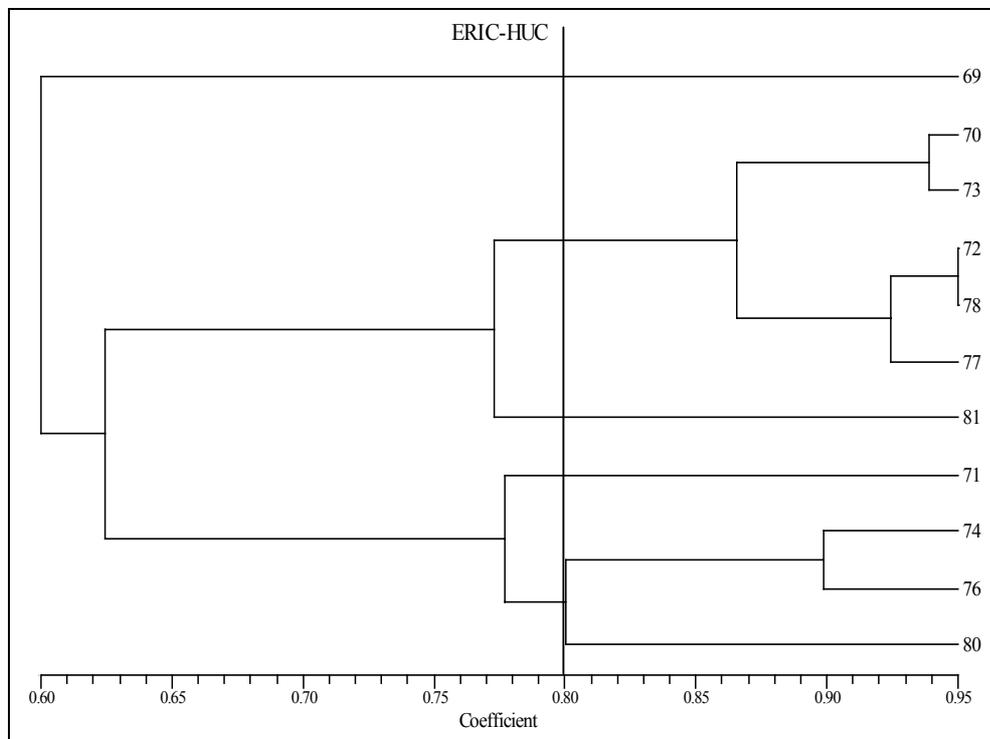
De forma diferente, no ano de 2004, ambas as técnicas foram capazes de identificar alguns *clusters*. A técnica do ERIC-PCR conseguiu identificar 3 *clusters* (F com 2 isolados, E com 3 isolados e C com 3 isolados), enquanto que a técnica de PFGE identificou 2 *clusters* (E com 2 isolados, e C com 2 isolados). Destes, foram coincidentes em ambas as técnicas os *clusters* E, com os isolados 19 e 21 e *cluster* C, com os isolados 23 e 24. A técnica de ERIC-PCR identificou o isolado 8 como *cluster* E e o isolado 45 como *cluster* C. Porém, em ambos os casos, a data de isolamento de ambas amostras não coincidem com o mês de isolamento dos outros dois isolados. No caso do *cluster* E, o isolado 8 tem uma diferença de quase 2 meses para os outros dois isolados, enquanto que no *cluster* C o isolado 45 tem diferença de quase 15 dias para os outros dois isolados. O *cluster* F só foi identificado pela técnica de ERIC-PCR, porém com data de isolamentos com intervalo de quase 20 dias, confirmando a possibilidade de serem falso *cluster*.

O resultado obtido com o PFGE das amostras do HC-UFPR identificou clones que mostraram diferença no período de isolamento de no máximo uma semana. Na técnica do ERIC-PCR, os isolados que não coincidiram com o PFGE, tiveram uma diferença de data de isolamento maior do que 15 dias. Levando-se

em consideração que este trabalho não teve um delineamento propício para investigação epidemiológica que pudesse sugerir mecanismos de disseminação da bactéria em questão, a data do isolamento foi considerada como um elemento importante para confirmação dos dados levantados pelas ferramentas moleculares.

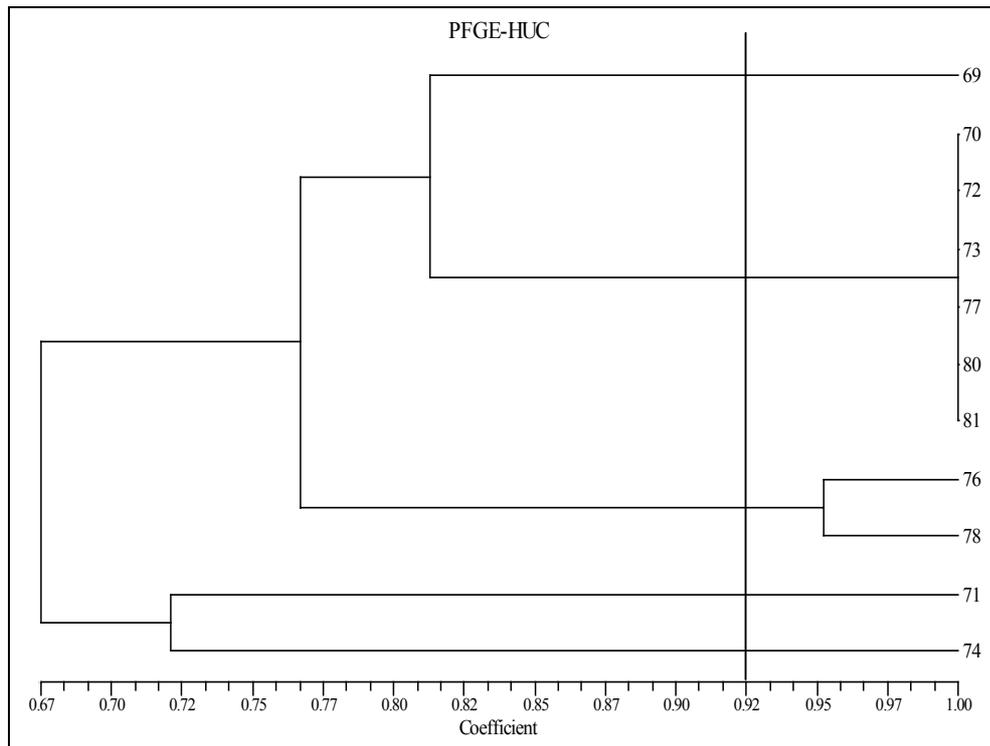
A seguir, as figuras 8 e 9 apresentam os resultados dos dendogramas gerados por ambas as técnicas, no HUC-PUCPR durante o ano de 2003 e 2004. Como são apenas 11 isolados, optou-se por não fazer análise por setor do Hospital e sim realizar uma análise em conjunto, como se segue.

Figura 8 - Dendograma gerado pela técnica ERIC-PCR (HUC) - 2002 - 2003



Nota: ERIC-PCR: enterobacterial repetitive intergenic consensus - Polymerase Chain Reaction; HUC: Hospital Universitário Cajuru.

Figura 9 - Dendograma gerado pela técnica PFGE (HUC) - 2002-2004



Nota: PFGE: Pulsed Field Gel Eletrophoresis; HUC: Hospital Universitário Cajuru.

Já o resultado obtido no HUC-PUCPR não foi tão coincidente quanto os do HC-UFPR, quando comparadas as duas técnicas. Pelo PFGE identificamos um clone epidêmico (clone H) que incluiu 6 isolados. Porém a coincidência de datas não seguiu o mesmo padrão do que encontramos nas UTIs do HC-UFPR entre os anos de 2001 e 2004. Neste caso, 3 amostras foram da UTI, com intervalo de tempo variando de 2 meses a 1 ano de intervalo entre os isolados. Os outros isolados foram dos postos de internação do HUC, em que os pacientes não passaram pela UTI. Este resultado sugere transmissão cruzada, porém, não relacionada tanto aos cuidados das mãos pela equipe de saúde. Deveria-se investigar outras fontes comuns como equipamentos, ou em se tratando de *P. aeruginosa* mais especificamente, pesquisar a possibilidade de fontes de água ou umidade como possibilidade destas fontes comuns<sup>(100,101,109)</sup>.

Nos resultados do ERIC-PCR o mesmo *cluster* H identificou 5 isolados, porém, dentre estes, um não foi coincidente (78) e dois não foram inclusos (80 e 81), quando comparado ao PFGE. Quatro isolados foram coincidentes, porém, com uma ocorrência de aparecimento de 3 destes germes (isolados 72, 73, 77) num intervalo que também variou de 2 meses a um ano. Um destes casos (isolado 70) não teve passagem pela UTI. Um outro *cluster*, classificado como D, foi identificado pelo ERIC-

PCR, estando presente na metodologia de PFGE. Estas discrepâncias dificultam uma análise de disseminação, sugerindo a possibilidade de fonte comum não relacionada aos cuidados de mão pela equipe de saúde. É importante salientar que após levantamento epidemiológico da ocorrência de *P. aeruginosa* nos anos avaliados, especificamente no HUC-PUCPR, a ocorrência desta bactéria nas infecções hospitalares não foi importante. O seu aparecimento naquele período esteve relacionado na maior parte dos casos com colonização. Após esses anos, a ocorrência dessa bactéria continuou sendo esporádica, estando raras vezes associadas a infecções, só que em sua grande maioria relacionadas com pacientes da UTI.

Assim como no HC-UFPR, o esclarecimento da forma real de disseminação desses germes obrigará um estudo utilizando uma metodologia prospectiva dos casos, e não retrospectiva como realizado neste estudo.

Tanto a análise geral dos dados quanto a análise setorizada do HC-UFPR e do HUC-PUCPR, permitiu concluir que a disseminação de *PaCR* não foi clonal e sim policlonal, tendo sido encontrados poucos casos de clones como mostrados até aqui. Dentro desta perspectiva de policlonalidade, a principal hipótese está sempre relacionada ao uso de antibióticos que levem à seleção de mutantes multiresistentes. Recentemente Juan e col. publicaram uma análise de 216 isolados de *P. aeruginosa*, colhidos seqüencialmente numa UTI, caracterizando assim um aparente surto. Oitenta e dois padrões de tipagem foram encontrados pela análise do PFGE, demonstrando assim que a disseminação de clones resistentes em particular teve um mínimo efeito na freqüência da resistência aos antimicrobianos. O autor conclui o artigo sugerindo que para esse tipo de disseminação de cepas policlonais resistentes, a principal estratégia é focar em regimes terapêuticos que possam prevenir o desenvolvimento de resistência<sup>(102)</sup>.

De forma semelhante, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o principal fator associado à disseminação desses germes no HC-UFPR está relacionado ao uso abusivo ou errôneo dos antimicrobianos que podem estar induzindo o aparecimento de *PaCR*. Bonten e col. também descrevem num cenário de endemicidade de *P. aeruginosa*, o aparecimento de policlonalidade relacionada a esta disseminação, neste caso relacionado à admissão de pacientes já previamente colonizados associada à pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos, mais do que a aquisição cruzada<sup>(103)</sup>.

Levando-se em consideração a possibilidade de transmissão cruzada, esta pode ocorrer via mãos da equipe de saúde, através de material contaminado e reagentes. As mãos da equipe de saúde têm sido consideradas dentre estas três possibilidades, a principal. Bertrand e col. mostrou que 50% de todos os casos de colonização de *P. aeruginosa* na UTI em estudo foi provocado por colonização cruzada<sup>(104,105,106)</sup>.

Outra consideração importante na epidemiologia deste germe é a possibilidade da sua disseminação inter-hospitais. Publicações recentes demonstram esse fato que pode estar associado à dinâmica de funcionários que trabalham em diversas instituições de saúde, e que, eventualmente, podem estar carreando *PaCR* de uma instituição para outra. Outra hipótese, é a de que pacientes que muitas vezes são atendidos em diversos hospitais em uma mesma cidade, possam carrear estas bactérias. Porém, em nenhuma dessas publicações é descrito o mecanismo de disseminação com exatidão<sup>(107,108)</sup>. Este realizou comparação entre duas instituições dentro da mesma cidade, provenientes de amostras colhidas do HUC-PUCPR dentro do mesmo período de coleta das amostras do HC-UFPR. Apesar do pequeno número de amostras do primeiro hospital citado, encontrou-se apenas um isolado do HC-UFPR que coincidiu com o clone epidêmico do HUC-PUCPR, de acordo com a técnica de PFGE que foi o isolado de n° 63. Uma das explicações possíveis para tal é o fluxo de funcionários entre esses hospitais, dentro da cidade.

## 6 CONCLUSÕES

Considerando a aplicação de diferentes métodos moleculares para o estudo de *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistente foi possível concluir o seguinte:

1. Fica confirmado o papel da metodologia de ERIC-PCR como uma ferramenta de triagem na investigação de surtos de infecção hospitalar, devendo ser confirmados seus resultados por outra metodologia mais específica como o PFGE. O ERIC-PCR fica indicado como uma ferramenta para investigações iniciais em surtos hospitalares, já que essa metodologia permite seu uso dentro de laboratórios de rotina. Com o uso criterioso desta ferramenta algumas conclusões imediatas podem ser feitas evitando medidas desnecessárias e custosas às instituições de saúde como as medidas de precauções de barreiras exaustivas, podendo-se assim investir na investigação de outras possíveis fontes, que esclareçam a ocorrência de isolados não clonais.
2. Com relação às duas ferramentas testadas (ERIC-PCR e PFGE), ambas são reprodutíveis e de alta resolução para *Pseudomonas aeruginosa*, sendo importante considerar as limitações da metodologia baseada em PCR em relação à metodologia de PFGE, como comprovado nesta pesquisa. Para adoção da metodologia ERIC-PCR, como consensos de investigação em epidemiologia molecular, é necessário o uso de, no mínimo, duplicatas dos isolados estudados.

3. No período do estudo, o aparecimento de cepas de *PaCR* se deveu mais à pressão seletiva, pelo uso excessivo de antimicrobianos de amplo espectro, do que a mecanismos de transmissões cruzadas. Não houve evidência de disseminação inter-hospitais de forma importante. É necessário que um novo estudo no modelo prospectivo seja realizado, para que estudos ambientais e de outras possibilidades de fontes comuns possam ser avaliadas.

## REFERÊNCIAS

1. Mausner JS, Bahn AK. *Epidemiology: an Introductory Text*. Philadelphia, Pa: The W. B. Saunders Co.; 1974. p.3-4.
2. Higginson J. The role of pathologist in environmental medicine and public health. *Am J Pathol*. 1977;86:460-484
3. Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science*. 1999;286:806-809.
4. Riley LW. *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principle and Practices*. Washington (DC): ASM Press; 2004.
5. Strulens MJ, et al. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect*. 1996;2:2-11.
6. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of Bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18:426-439.
7. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the Global SENTRY Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 2001;32(Suppl. 2):S146-S155.
8. Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, et al. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immun*. 2001;69:584-588.
9. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:607-625.
10. Lynch M., Painter J., Woodruff R., Braden C., Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1998-2002. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2006;55(SS-10):1-34.
11. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, September 2006. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2006;55:1045-6.
12. Maslow J, Mulligan E, Arbeit RD. Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. *Clin Infec Dis*. 1993;17:153-64.
13. Tornieporth NG, John J, Salgado K, Jesus P, Latham E, Melo C, Gunzburg S, Riley LW. Differentiation of pathogenic *E. coli* in Brazilian children by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1371-1374.

14. Deplano A., Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff B, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ. Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1198-1204.
15. Scott FW, Pitt T. L Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol*. 2004;53:609-615.
16. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspec Inov (BioMed Central)*. 2005;2:10.
17. van Belkum A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:86-100.
18. Wang D, Urisman A, De Risi J et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol*. 2003 Nov;1(2):E2.
19. Koneman EK, et al. *Color Atlas and TextBook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Ed J: B. Lppincott Company; 1997.
20. Balows A et al. *Manual of Clinic Microbiology*. 5th ed. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1991.
21. Howard BJ et al. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2th ed. St. Louis: Mosby; 1994.
22. Forbes, BA et al. *Bailey e Scotts Diagnostic Microbiology*. 10 th. ed. St Louis: Mosby; 1998.
23. Kenneth T. *Bacteriology 330 Lecture Topics: Pseudomonas aeruginosa*. University of Wiscosin-Madiso Department of Bacteriology; 1997. [on line]. [cited 2006 Sept 7]. Available from: <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturepseudomonas>.
24. Stover K, Pham XQA, Erwin L, Mizoguchi SD, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogenC. *Nature*. 2000;406:959-964.
25. Rodrigues EAC, et al. *Infecção hospitalar: prevenção e controle*. São Paulo: Sarvier; 1997.
26. Livermore DM. Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47(3):247-50.
27. Quinn JP. Clinical problem posed by multiresistent patterns. *Clin Inf Dis*. 1998;27(1):117-124.
28. Machado A, Barros E, Bitencourt H, Caramori ML. *Antimicrobianos: consulta rápida* 4.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
29. Donovan A. A profile of the carbapenems. *Focus Med*.1998;11:4-6
30. Drusano G. Optimal dosing of anti-infective in care unit. *Focus Med*.1998;11:7-10.
31. Allen JR, Hightower AW, Martin SM, Dixon RE. Secular trends in nosocomial infections - 1970-1979. *Am J Med*. 1981;70:389-92.

32. Weber DJ, Rutala WA, Samsa GP, Wilson MB, Hoffmann KK. Relative frequency of nosocomial pathogens at a university hospital during the decade 1980-1989. *Am J Infect Control*. 1992;20:192-7.
33. Gramlich L, Kichian K, Pinilla J, Rodych NJ, Dhaliwal R, Heyland OK. Does enteral nutrition compared to parenteral nutrition result in better outcomes in critically ill adult patients? A systematic review of the literature. *Nutrition*. 2004;20:843-8.
34. Combes P, Fauvage B, Oleyer C. Nosocomial pneumonia in ventilated patients, a prospective randomized evaluation of the Stericath closed suctioning system. *Intensive Care Med*. 2000;26:878-82.
35. Grap MJ, Munro CL. Preventing ventilator-associated pneumonia: evidence-based care. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2004;16:349-58.
36. CDC-Centers for Disease Control and Prevention.NNISS. *Semianual Report, May 2006*. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/ncidod/disease/hip/nnis0596.html>>. Acesso em: 9 set. 2006.
37. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39:309-17.
38. Panceri ML, Vegni FE, Goglio A, et al. Aetiology and prognosis of bacteraemia in Italy. *Epidemiol Infect*. 2004;132:647-54.
39. Dupont H, Mentec H, Sollet JP, Bleichner G. Impact of appropriateness of initial antibiotic therapy on the outcome of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2001;27:355-62.
40. Zanetti G, Bally F, Greub G, et al. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3442-7.
41. Pawar M, Mehta Y, Khurana P, Chaudhary A, Kulkarni V, Trehan N. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, outcome, and microbiology. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2003;17:22-8.
42. Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 2004;125:607-16.
43. 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 Brazil. *J Infect Dis*. 2004;8: 5-79.
44. Livermore DM. The threat from the pink corner. *Ann Med*. 2003;35:1-9.
45. Rhomberg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 29:251-254.

46. Livermore DM Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34:634-40.
47. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000;288:1251-4.
48. Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:557-84.
49. Rossi F, Andreazzi D. *Resistência bacteriana, interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu; 2005.
50. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PER-1–type extended-spectrum b-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2265-9.
51. Naas T, Nordmann P. OXA-type b-lactamases. *Curr Pharm Des*. 1999;5:865-79.
52. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integrin-located gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:447-53.
53. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RC, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*IMP allele, *bla*IMP-7. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:255-8.
54. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*. 2000;3:489-9.
55. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1290-2.
56. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integrin-borne metallo-b-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1584-90.
57. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;50:673-9.
58. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journall of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52:699-702.
59. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular Analysis of Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene *bla*SPM-1-Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Apr.;48(4):1406-1409.

60. Levin AS, Barone AA, Penco J, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 1999;28:1008-11.
61. Tan TY, Ng SY. The in-vitro activity of colistin in gram-negative bacteria. *Singapore Med J*. 2006;47(7):621-624.
62. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):183-90.
63. Reis AO. *Análise do perfil de sensibilidade da similaridade genética e da resistência aos carbapenems em amostras clínicas de Pseudomonas aeruginosa* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2003.
64. Zaldi N, Konstantinou K, Zervos M. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:1098-1105.
65. Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 2003;36:1268-1274.
66. Neu HC. The crisis of antibiotic resistance. *Science*. 1992;257:1064-1073.
67. Tenover FC, Arbeit RD, Goering PA, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233-2239.
68. Wang G, Whittan TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:5930-33.
69. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomes. *Nuclei Acids Res*. 1991;19:6823-31.
70. Van Belkum, A. DNA fingerprint of medically important microorganism by use of PCR. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7:174-84.
71. Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp, PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacterias. *Mol Microbiol*. 1991;5:825-34.
72. Liu, PF, LauY-J, Hu B-S, Shyr J-M, Shi Z-Y, Tsai, W-S, Lin Y-H, Tseng C-Y. Analysis of clonal relationship among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1779-83.
73. Renders N, Römling U, 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. *J Clin Microbiol*. 1996;34:3190-3195.

74. Speijer H, Savelkoul PHM, Bonten MJ, et al. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1999;37:p.3654-3661.
75. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3071-3077.
76. National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests.* Approved standard M2-A2 S2. Wayne, Pa, 1981.
77. National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved standard. 6th. ed. NCCLS document M7-A6. USA, 2003.
78. National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* Approved standard. 7th. ed. NCCLS document M2-A8. USA, 2003.
79. York MK, Schreckenberger PC, Miller JM. Identification of Gram-Negative Bacteria. In: Isenberg HD (Ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition.* Washington (DC): ASM Press; 2004. v.1, p.3.18.2.1-3.18.2.21.
80. Macfaddin JF. *Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria.* 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
81. Woodford N, Johnson AP. *Molecular Bacteriology Protocols and Clinical Applications* Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998
82. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Third edition. New York: Press, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
83. Nei M, Li W-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *J Mol Evol.* 1983;19:153-170.
84. Sokal RR, Sneath, PHA. *Principles of numerical taxonomy.* San Francisco: WR Freeman; 1963.
85. Hunter PR. Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1903-1905.
86. Almeida Filho N, Rouquayrol MZ. *Introdução à epidemiologia moderna.* Salvador: Apce Produtos do Conhecimento e ABRASCO; 1990.
87. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica.* 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1991.

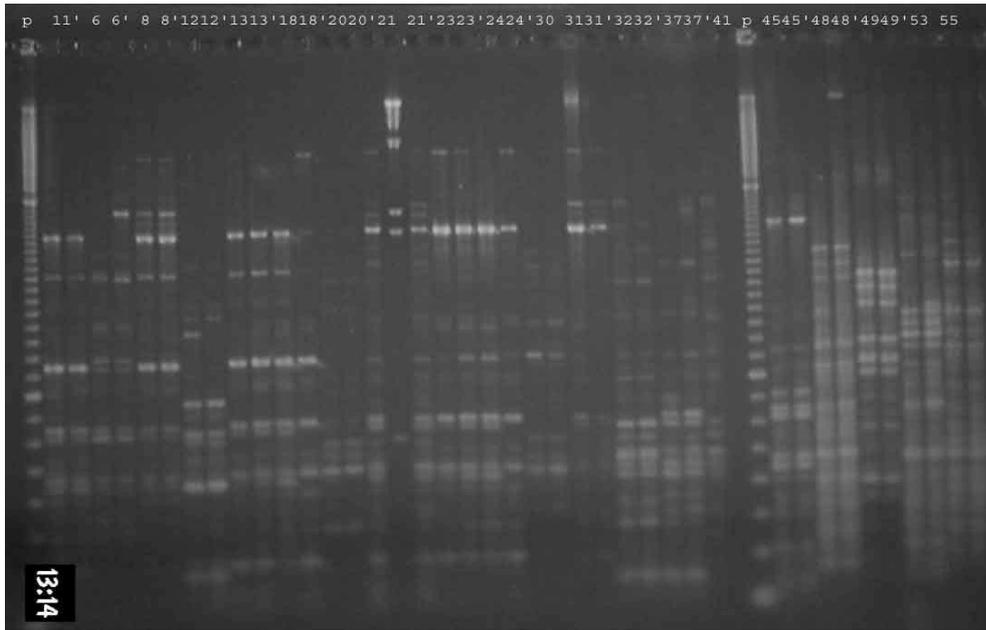
88. Cordero L, Sananes M, Coley B, Hogan M, Gelman M, Ayers LW. Ventilator-associated pneumonia in very low-birth-weight infants at the time of nosocomial bloodstream infection and during airway colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *AJIC*. 2000;28:333-9.
89. Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:954-957.
90. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol*. 2001;39:183-90.
91. Heddurshetti R, Cebular S, Bratu S, et al. Multidrug resistant *P. aeruginosa*: molecular epidemiology and in-vitro activity of polymyxin combined with other agents. In: Programs and Abstracts of the Fortieth Infectious Diseases Society of America Annual Meeting. *Abstract 96*, p.62. Chicago, 2002.
92. Kucers A. Polymyxins. In: Kucers A, Crowe S, Grayson ML, et al. (Eds.). *The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Drugs*. 5th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997. p.667-75.
93. Silbert, S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of Three Molecular Typing Techniques for Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(10):847-851.
94. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 1995;33:528-534.
95. Hla WS, Hui KP, Tan WC, Ho B. Genome macrorestriction analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bronchiectasis patients without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1996 Mar;34(3):575-8.
96. Campbell M, Mahenthalingam E, Speert DP. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4614-4615.
97. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factor affecting reliability and Reproducibility of Amplification-Based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 1997;35: 39-346.
98. Pellegrino FL, Casali N, Dos Santos KR, Nouer SA, Scheidegger EM, Riley LW, Moreira BM. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. *J Chemother*. 2006 Apr;18(2):151-6.
99. Trautmann M, Bauer C, Schumann C, Hahn P, Hoher M, Haller M, Lepper PM. Common RAPD pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from patients and tap water in a medical intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*. 2006 Jul;209(4):325-31.

100. Micol JB, de Botton S, Guieze R, et al. An 18-case outbreak of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia in hematology patients. *Haematologica/The Hematology Journal*. 2006;91(8):1134-1138.
101. Vianell N, Giannini MB, Quarti C, et al. Resolution of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a hematology unit with the use of disposable sterile water filters. *Haematologica/The Hematology Journal*. 2006;91(7):983-985
102. Juan C, Gutiérrez O, Ayesterán JI, Borrell N, Pérez JL. Contribution of clonal and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. *Europ Society Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;11:887-892.
103. Bonten MJM, Bergmans DCJJ, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1212-1219.
104. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Méd*. 2001;27:1263-8.
105. Kerr JR, Martin H, Chadwick MV, et al. Evidence against transmission of *Pseudomonas aeruginosa* by hands and stethoscopes in a cystic fibrosis unit. *J Hosp Infect*. 2002;50:324-26.
106. Gales AC, Torres PL, Vilarinho DSO, Melo RS, Silva CFL, Cereda RF. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. *Braz J Infect Dis*. 2004;8:267-271.
107. Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér AS, et al. Occurrence of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in Different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2420-2424.
108. Loureiro MM, Moraes BA, Mendonça VLF, Quadra MRR, Pinheiro GS, Asensi MD. *Pseudomonas aeruginosa*: Study of Antibiotic Resistance and Molecular Typing in Hospital Infection Cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:387-394.
109. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infec Contr*. 2005;5(suplem 1):S41-S49.

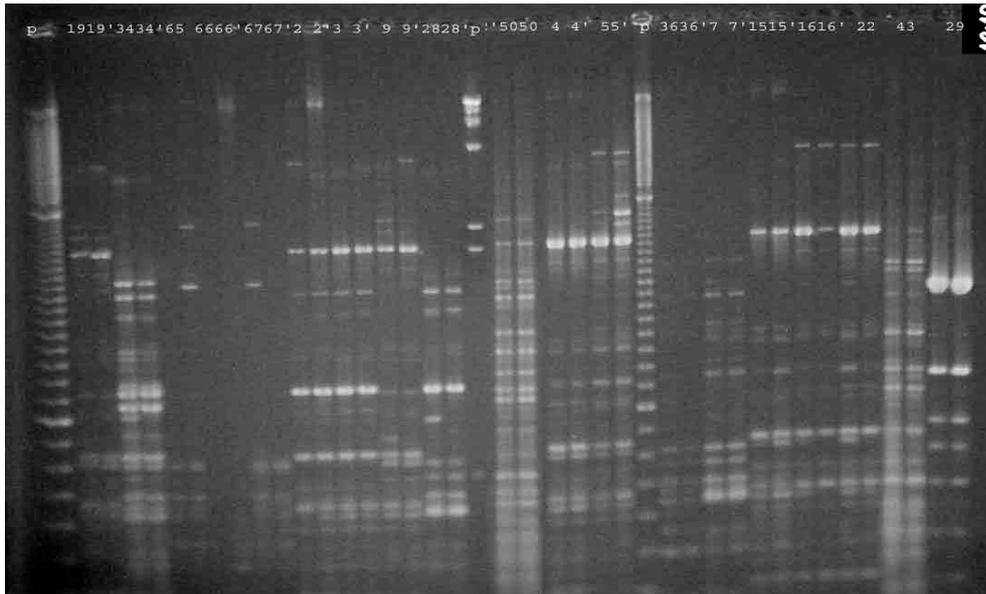
**ANEXO**

**RESULTADO DE GÉIS DA METODOLOGIA ERIC-PCR (EM DUPLICATA)  
(ISOLADOS NUMERADOS X-X')**

**Gel1**



**Gel2**



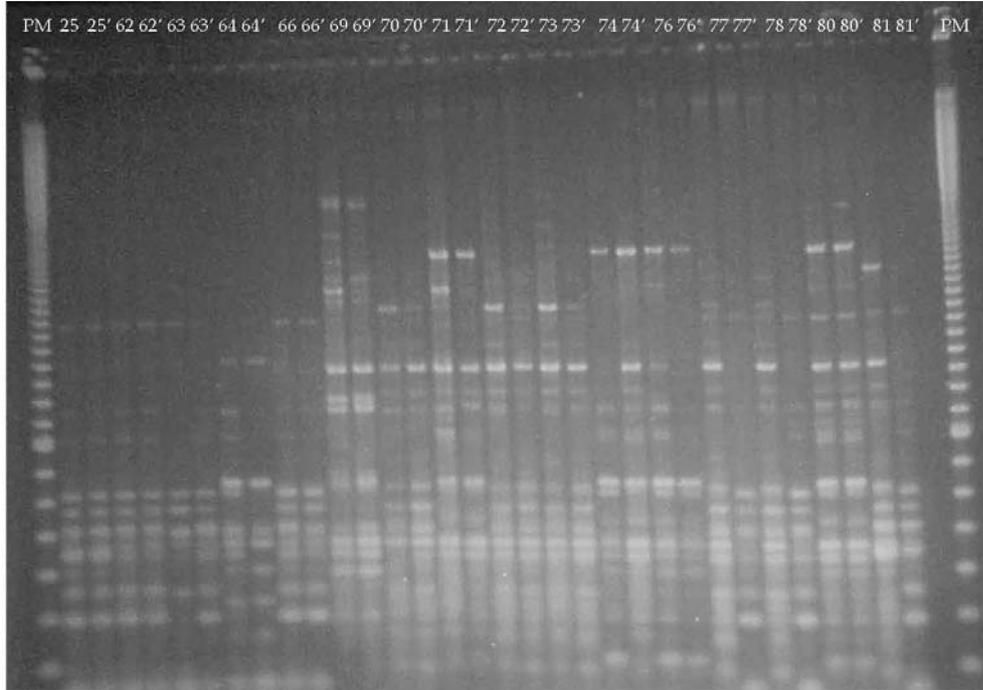
Gel3



Gel4

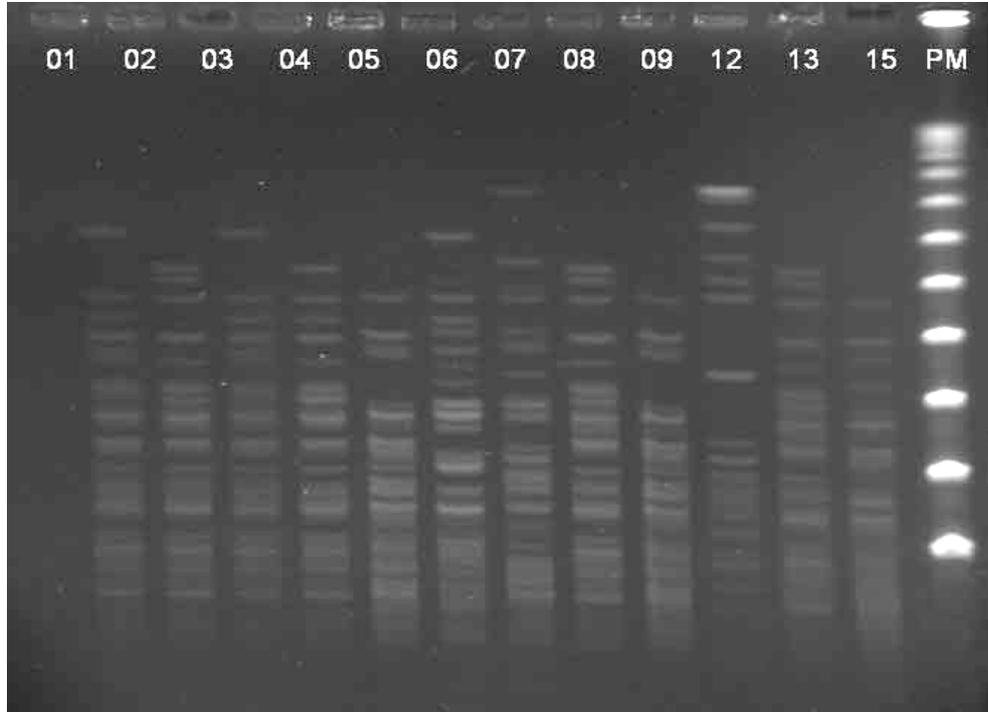


**Gel5**

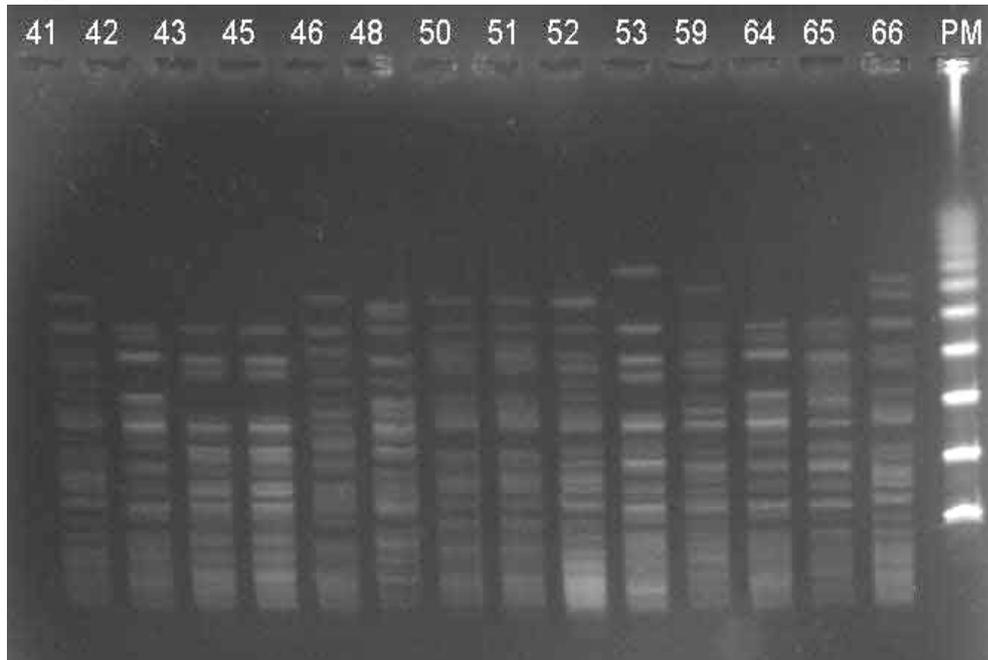


### RESULTADO DE GÉIS DA METODOLOGIA PFGE

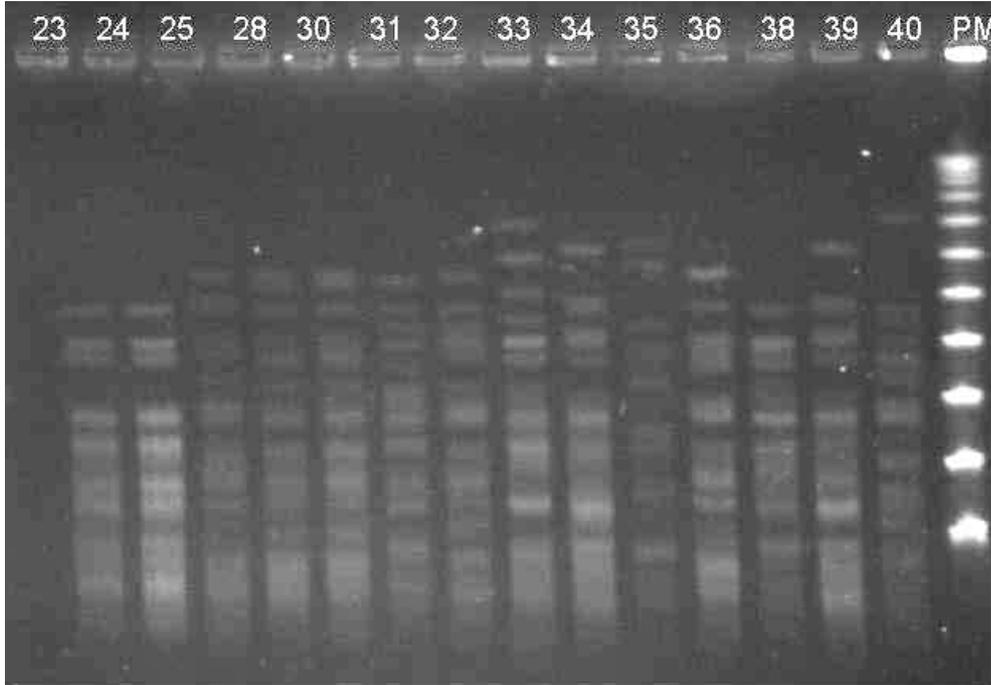
Gel1



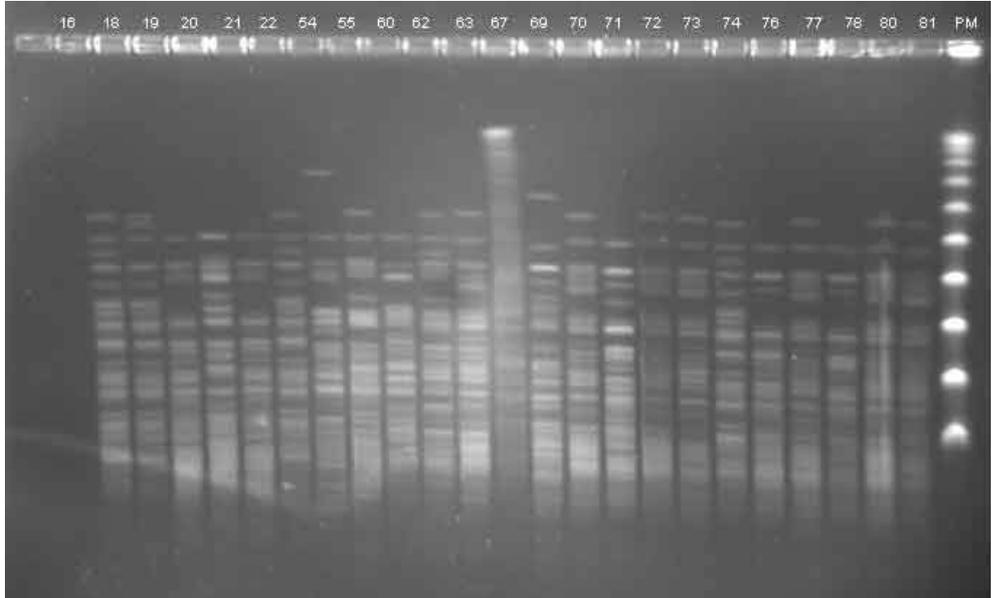
Gel2



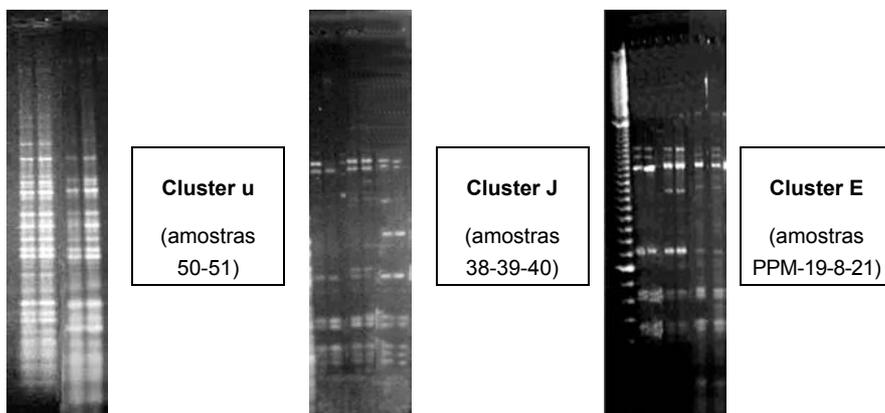
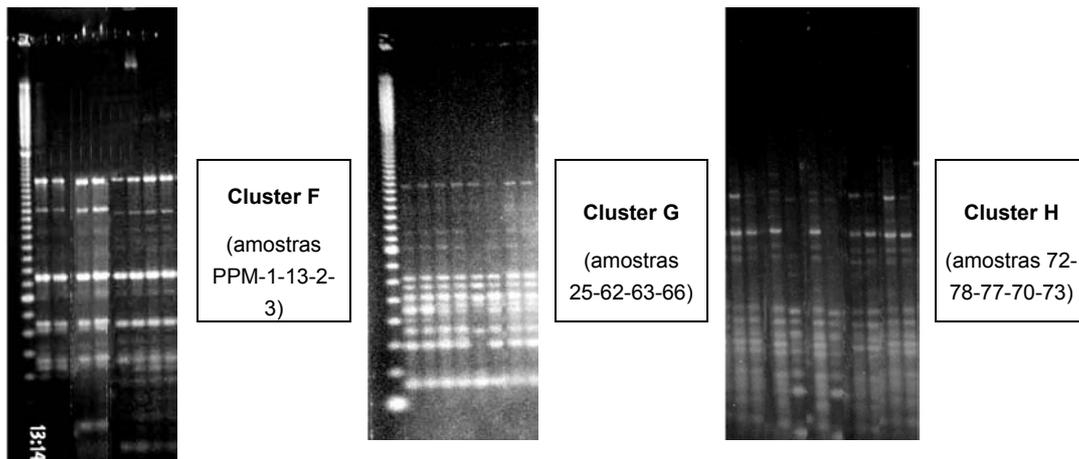
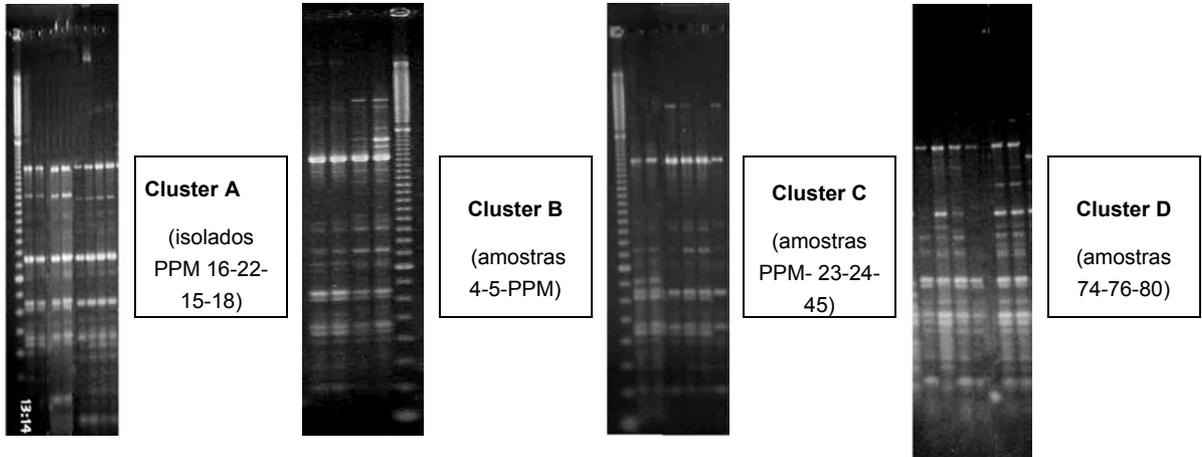
**Gel3**



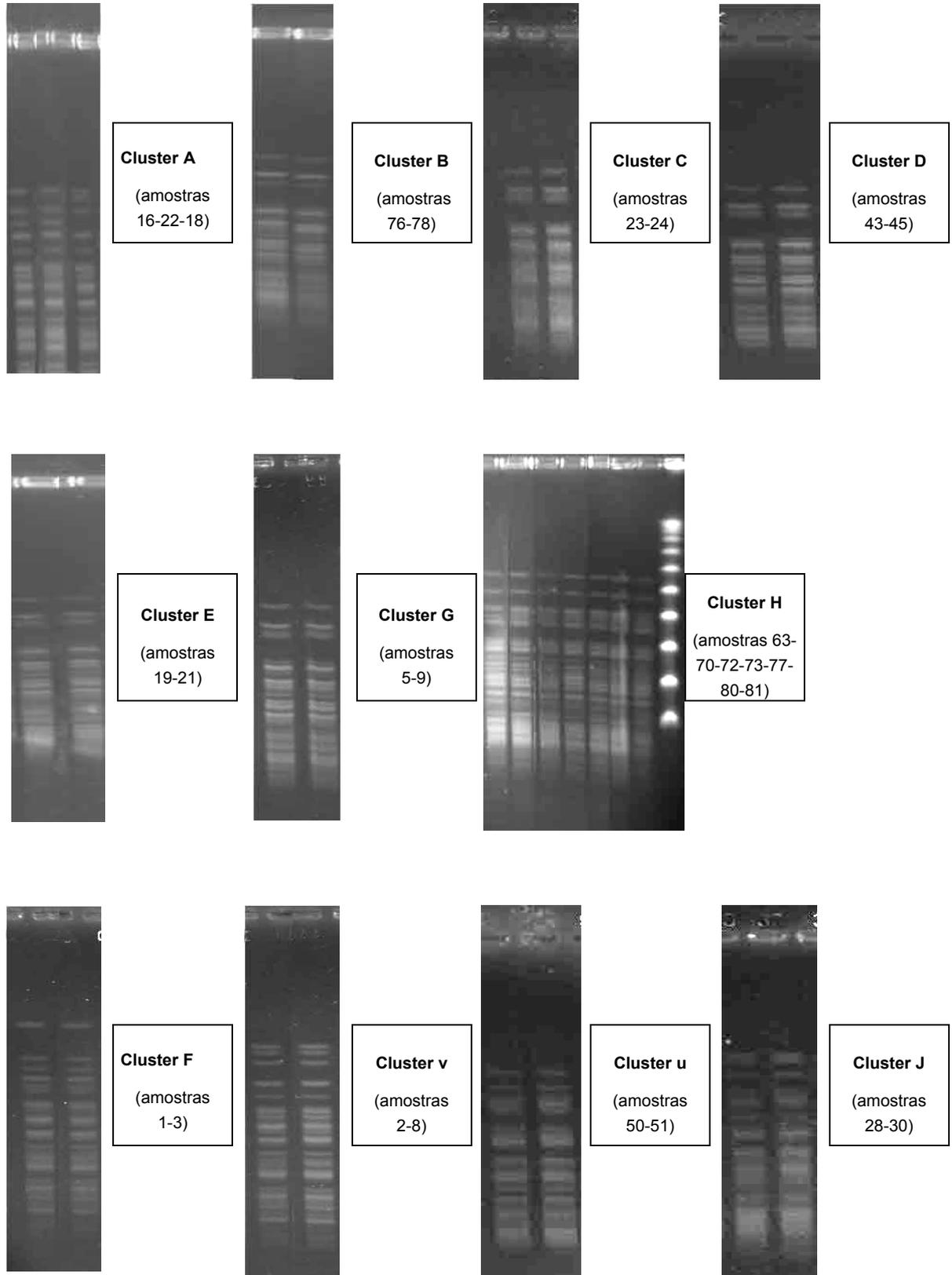
**Gel4**



**RESULTADO DA METODOLOGIA ERIC-PCR (EM DUPLICATA)  
APÓS AVALIAÇÃO DE CLUSTERIZAÇÃO**



## RESULTADO DA METODOLOGIA PFGE APÓS AVALIAÇÃO DE CLUSTREIZAÇÃO



## TABELA DE ANTIBIOGRAMAS

ATB	N.º DO ISOLADO																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	28	30	31	32	33	34	35	36	38	39	
CIP	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMI	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	
GEN	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
ATM	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
CAZ	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	
CPM	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	
PIP/TAZ	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
POLI	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	
IPM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
MEN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

ATB	N.º DO ISOLADO																															
	40	41	42	43	45	46	48	50	51	52	53	54	55	59	60	62	63	64	65	66	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	80	81
CIP	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMI	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GEN	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
ATM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CAZ	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CPM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
PIP/TAZ	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
POLI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
IPM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
MEN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

Nota: GEN: Gentamicina AMI: Amicacina; POLI: Polimixina; CAZ: Ceftazidime; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; PIP-TAZ: Piperacilina – Tazobactam; MEN: Meropenem; IPM: Imipenem; ATB: Antibiótico

Tabela A.1 - Data de isolamento dos isolados, local de isolamento e sítio anatômico (HC-UFPR)

N.º do ISOLADO	DATA DE ISOLAMENTO	LOCAL	SITIO ANATÔMICO
67	23/9/2002	UTI-AD	TRAQUEAL
50	4/8/2003	SEC-AD	ESCARA
35	21/5/2003	ORTOP.	URINA
38	1/3/2003	SEC-PED	ESCARRO
32	20/8/2003	UTI-AD	ESCARRO
63	7/10/2002	TMO	SANGUE
59	10/1/2003	UTI-SEC	TRAQUEAL
39	3/4/2003	INFECTO	RETAL
40	19/3/2003	C.M.F	ESCARA
62	15/6/2003	SEC-AD	URINA
64	9/12/2002	UTI-AD	TRAQUEAL
66	27/1/2003	UTI-AD	FERIDA
42	24/3/2003	SEC-AD	TRAQUEAL
65	2/11/2002	UTI-AD	SANGUE
36	8/5/2003	C.M.M	FERIDA
33	14/8/2003	C.M.F	RETAL
34	18/8/2003	UTI-AD	TRAQUEAL
41	21/3/2003	UTI-AD	SANGUE
60	22/6/2001	Sec-Ped	ESCARRO
53	29/9/2003	UTI-AD	ESCARRO
54	14/10/2003	TX-HEP	PERITONEAL
55	13/10/2003	UTI-AD	TRAQUEAL
51	24/10/2003	MEDICA	URINA
52	27/10/2003	ORTOP.	URINA
5	13/1/2004	C.M.M	URINA
30	1/12/2003	UTI-AD	TRAQUEAL
31	9/12/2003	UTI-AD	MINI-BAL
6	2/2/2004	UTI-AD	TRAQUEAL
43	25/5/2004	C.GERAL	PERITONEAL
45	2/6/2004	UTI-AD	URINA
46	5/6/2004	NEUROC.	URINA
18	3/5/2004	UTI-AD	URINA
19	3/5/2004	UTI-AD	TRAQUEAL
20	3/5/2004	UTI-AD	TRAQUEAL
21	10/5/2004	UTI-AD	LIQUOR
22	11/5/2004	C.GERAL	CATETER
23	15/5/2004	UTI-AD	LIQUOR
24	17/5/2004	UTI-AD	SANGUE
25	18/5/2004	TX-HEP	URINA
28	17/5/2004	SEC-AD	ESCARA
48	26/6/2004	UTI-AD	CATETER
7	9/7/2004	CTCV	FERIDA
8	14/7/2004	UTI-AD	URETRAL
9	22/7/2004	SEC-AD	TRAQUEAL
12	3/8/2004	UTI-AD	ASP.TRAQUEAL
13	19/8/2004	UTI-AD	CATETER
15	15/8/2004	C.A.D	ABDOMINAL
16	19/8/2004	C.A.D	PERITONEAL
1	1/9/2004	UTI-AD	ESCARA
2	1/9/2004	NEUROL.	URINA
3	30/8/2004	SEC-AD	SANGUE
4	10/9/2004	UROL.	URINA

Nota: Asp. Traq.: Aspirado Traqueal; LBA: Lavado Broncoalveolar; MMINIBAL; Mini Lavado Broncoalveolar; S.ABDOMINAL: Secreção abdominal; L. PERITONEAL: Líquido peritoneal; S.RETAL: Swab Retal; TMO: Transplante de Medula Óssea; UTI – AD: Unidade de terapia intensiva adulto; SEC-AD: serviço de emergência clínica adulto; SEC-PED: serviço de emergência clínica pediátrica; UTI -SEC: Unidade de terapia intensiva do serviço de emergência clínica CMF.; clínica médica feminina; CMM: clínica médica masculina; TX-HEPAT: transplante hepático; C.MEDICA: Clínica Médica; C.GERAL: Clínica Geral; CTCV: Cirurgia Torácica Cardio-Vascular; CAD: cirurgia do aparelho digestivo.

Tabela A.2 - Data de isolamento dos isolados, local de isolamento e sítio anatómico (HUC-PUCPR)

N.º DO ISOLADO	DATA DE ISOLAMENTO	LOCAL	SÍTIO ANATÔMICO.
69	05/12/2002	UTI-I	Ferida CIR
70	10/10/2002	ALA-C	ESCARA
71	02/5/2003	UTI-I	LBA
72	18/11/2002	UTI-I	LBA
73	23/10/2003	UTI-I	LBA
74	7/10/2002	UTI-II	CATETER
76	10/1/2003	POSTO3	FERIDA CIR
77	20/12/2003	UTI-I	LBA
78	10/10/2002	UTI-I	SANGUE
80	15/6/2003	POSTO3	FERIDA CIR
81	23/04/2003	POSTO3	ESCARRO

Nota: UTI: Unidade de Terapia Intensiva; LBA: Lavado Broncoalveolar.