



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS
CURSO DE DOUTORADO**

Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudomonas aeruginosa* em Unidade de Terapia Intensiva (UTI): aspectos epidemiológicos e moleculares de amostras produtoras de metalo- β -lactamases.

DAYANE OTERO RODRIGUES

UBERLÂNDIA
Fevereiro -2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS
CURSO DE DOUTORADO**

**Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudomonas
aeruginosa* em Unidade de Terapia Intensiva (UTI): aspectos
epidemiológicos e moleculares de amostras produtoras
de metalo- β -lactamases.**

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

Dayane Otero Rodrigues

Paulo Pinto Gontijo Filho (orientador)

UBERLÂNDIA
Fevereiro-2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- R696p Rodrigues, Dayane Otero, 1975-
Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudo-*
monas aeruginosa em Unidade de terapia intensiva (UTI) [manuscri-
to] : aspectos epidemiológicos e moleculares de amostras produtoras
de metalo- β -lactamases / Dayane Otero Rodrigues. - 2010.
70 f. : il.
Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Pneumonia - Teses. 2. Bactérias patogênicas - Teses. 3. Res-
piração artificial - Teses. 4. Unidade de tratamento intensivo - Teses.
I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
III. Título.

CDU: 616.24-002

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

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob supervisão da Prof^ª Dra. Kátia Regina N. Santos, Prof^ª Adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

*DEDICO ESTE TRABALHO
AOS MEUS FILHOS,
ANTÔNIO CARLOS
E LUIZ GUILHERME*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, pelos meus filhos, pelos meus pais, pela saúde e por esta oportunidade de concluir um doutorado;

Ao meu esposo Antônio Carlos, meu companheiro de caminhada;

À minha mãe por todo apoio, incentivo, amizade e todo amor que me dedica sempre;

Ao Prof^o Paulo pela orientação com paciência, dedicação, acolhimento, meu muito obrigada de coração;

À Prof^a Kátia pelo apoio, acolhimento, colaboração e amizade, bem como a todos seus orientados que me receberam tão bem e possibilitaram a realização da parte molecular desta pesquisa, obrigada;

Ao Eliezer, orientado da Prof^a Kátia, que me ajudou tanto na análise molecular e me recebeu com paciência, compreensão e dedicação, obrigada mesmo;

À Poliana que me ajudou na interpretação da análise molecular, obrigada pelo apoio, dedicação e amizade;

Aos professores do Laboratório de Microbiologia: Geraldo Melo, Rosineide, Denise, obrigada pela convivência, amizade e apoio;

Aos meus amigos do Laboratório, Cristiane, Daiane Rezende, Ana Paula, Karinne, Lílian, Raquel, Jacqueline, Deivid, Elias, Marcília, Luiz Fernando, Munick, Juliana, Michel, pela convivência e apoio nesta caminhada, com certeza jamais me esquecerei de vocês;

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

À Lucileide e Lucélia, secretárias do programa de Pós-Graduação, pela amizade e paciência no esclarecimento das minhas dúvidas;

À Ana Lúcia, representante dos discentes no programa de pós-graduação e à Daise da Imunologia, por me auxiliarem com materiais que me faltavam;

À Sirlene, minha ajudante, sem ela, com certeza eu não teria concluído este programa;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ATCC= “*American Type Culture Collection*”

BHI= “*Brain Heart Infusion*”

CI= “*Confiance Interval*”

CLSI= “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”

EDTA= ácido-etil-diamino-tetracético

ESBL= “*Extended-Spectrum β -lactamases*”

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

MBL= metalo- β -lactamase

MHA= “*Muller Hinton Agar*”

MPA= Ácido mercapto-propiónico

NNIS= “*Nosocomial Infection Surveillance*”

PA-MBL= *Pseudomonas aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase

PAV= Pneumonia associada à ventilação mecânica

PCR= Reação em cadeia da polimerase

PFGE= “*Pulsed-field gel electrophoresis*”

TSB= “*Trypticase Soy Broth*”

UFC/mL= Unidades formadoras de colônia por mililitro

UTI= Unidade de Terapia Intensiva

UFRJ= Universidade Federal do Rio de Janeiro

VM= ventilação mecânica

RESUMO

A incidência de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente produtora de metalo- β -lactamase está aumentando mundialmente, especialmente em pacientes críticos. O objetivo deste estudo foi determinar a incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudomonas aeruginosa* produtora ou não de metalo- β -lactamases em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), caracterizando aspectos epidemiológicos, dentre os quais fatores de risco dos pacientes, e moleculares das amostras. Foi realizado um estudo de coorte incluindo 93 pacientes com PAV por *Pseudomonas aeruginosa* no período de janeiro/2004 a novembro/2006. Foram realizadas coletas de secreção de orofaringe das primeiras 48 horas de internação, depois em quatro dias, e a seguir semanalmente, e de aspirado endotraqueal quando da indicação clínica da pneumonia. No estudo epidemiológico, 40 (43 %) pacientes tiveram PAV por *P.aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase (PA-MBL) e 53 (57 %) PAV por não-PA-MBL, com os seguintes fatores de risco significativos ($p \leq 0,05$) associados com PAV por PA-MBL: escore ASIS, diagnóstico clínico na admissão, hospitalização prévia, estada prolongada na UTI, uso prolongado de ventilação mecânica (VM), uso de carbapenemas, fluorquinolonas e de três ou mais antibióticos, na análise univariada; e, confirmados como independentes por análise multivariada apenas hospitalização prévia e tempo mais longo de VM. Adicionalmente, a taxa de mortalidade foi significativamente maior no grupo de PAV por PA-MBL, tanto na análise univariada quanto na regressão logística. Quarenta (43 %) amostras de *P.aeruginosa* foram identificadas como produtoras de MBL pelo teste fenotípico de sinergismo com duplo-disco e a maioria (59 %) comportou-se como do fenótipo AmpC. A resistência aos agentes β -lactâmicos assim como aos demais antibióticos foi significativamente maior entre as amostras de PA-MBL, detectando-se a presença de multiresistência na maioria (82,5%) daquelas MBL positivas. O gene bla_{SPM-1} foi detectado em apenas três (18,8%) das 16 amostras do fenótipo MBL testadas. O estudo de epidemiologia molecular através da técnica de "PFGE" revelou a ocorrência de uma policlonalidade (16 genótipos em 20 amostras), com evidência de transmissão cruzada em três pacientes (clone A), dois (genótipo C) e outros dois pacientes (genótipo E) e de similaridade entre amostras recuperadas de dois pacientes colonizados e posteriormente infectados. As duas amostras associadas ao surto responsável pela emergência das PA-MBL em nosso hospital, diferiram das amostras de PA-MBL recuperadas em condições endêmicas no nosso estudo. A presença destas amostras representa uma grave ameaça aos pacientes, exigindo uma revisão quanto a uma política do uso mais racional de antibióticos e na implementação de programas de controle e prevenção de infecções hospitalares mais efetivos.

Palavras-chave: pneumonia associada à ventilação mecânica, *Pseudomonas aeruginosa*, metalo- β -lactamase, resistência aos antibióticos, fatores de risco

ABSTRACT

The incidence of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase is increasing, especially in critically ill patients. The objective of this study was to evaluate the incidence of ventilator associated-pneumonia (VAP) caused by *P.aeruginosa* producing metallo- β -lactamase (MBL-PA) or non-MBL-PA in patients admitted at a adult intensive care unit (ICU) of a Uberlândia Federal University Hospital Clinic, looking epidemiologic and molecular aspects. A cohort study was performed including 93 patients with VAP caused by *P.aeruginosa* from January/2004 to November/2006. The collection of the tract respiratory superior secretions was made by the swab-rinse sampling method and of the endotracheal aspirate when for suspicion of VAP. In total, 40 (43%) patients had VAP by MBL-PA and 53 (57%) by non-MBL-PA. The study was approved by the Ethical Committee of the University. The results of univariate analysis of risk factors for MBL-PA VAP showed that the ASIS score, clinical condition in admission, prior hospitalization, prolonged stay in the ICU, prolonged time of mechanical ventilation, exposure of carbapenems, fluorquinolones and use of three or more antibiotics were risk factors for VAP by MBL-PA. After logistic regression the following risk factors continued significant: prior hospitalization and prolonged time of mechanical ventilation. Additionally, the mortality was also independently associated with MBL-PA VAP. During the study period we identified 40 (43%) isolates of *P.aeruginosa* presumptive MBL producers according to the disk approximation tests and of the 59% of the AmpC phenotype. Resistance to β -lactam and non- β -lactam agents was significantly higher among MBL-PA isolates with the 82,5% of this multidrug-resistant. Only 18,8% (3/16) of MBL-producing strains were positive for the *bla*_{SPM-1} gene. To determine the genomic diversity of *P.aeruginosa* multidrug-resistant 20 isolates were analysed by macrorestriction profile analysis following PFGE. That showed of polyclonal *Pseudomonas aeruginosa* (16 genotypes). Altogether the detection of horizontal dissemination was observed in three patients (Clone A), two (Genotype C) and more two patients (Genotype E). The two epidemic MBL-PA isolates from the outbreak in 2003 presented macrorestriction profiles different from the endemic MBL-PA. The presence of MBL-PA in our unit indicates problems in nosocomial infection control practice, likely associated with low adherence to hand hygiene and especially in the abusive use of antibiotics.

I – Introdução.....	01
II – Justificativas.....	14
III – Objetivos.....	15
IV – Casuística e Métodos.....	16
1 – Unidade.....	16
2 – Desenho do Estudo.....	16
3 – Definições.....	17
4 – Técnicas Microbiológicas.....	17
5 – Análise Molecular.....	21
6 – Aspectos Éticos.....	26
7 – Análise Estatística.....	26
V – Resultados.....	28
VI – Discussão.....	37
VII – Conclusões.....	46
VIII – Referências Bibliográficas.....	48
IX – Anexos.....	68

I – INTRODUÇÃO

Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) refere-se à pneumonia que se desenvolve após 48 horas de entubação endotraqueal e de ventilação mecânica (VM) (CHASTRE, 2005; DWIVEDI et al., 2010; KOLLEF, 2005; ZHUO et al., 2008), sendo a infecção hospitalar mais freqüente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (AYBAR, TOPELI, 2008; CHASTRE, 2005; DWIVEDI et al., 2010; HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; JUNG et al., 2007; LUNA et al., 2007; RELLO et al., 2006; SAFDAR, CRNICH, MAKI, 2005).

A incidência de PAV nestas unidades varia de 9% a 40% (SAFDAR, CRNICH, MAKI, 2005), dependendo da população estudada e dos critérios de diagnóstico utilizados (ALP, SAFDAR, CRNICH, 2004; SAFDAR, CRNICH, MAKI, 2005). Segundo o “*National Nosocomial Infections Surveillance System*” (NNISS, 2004) a taxa de PAV nos Estados Unidos varia de 4 a 14/1.000 dias de ventilação e em países latino americanos está entre 10 a 52 / 1.000 dias de ventilação (ROSENTHAL et al., 2006).

As PAVs incluem-se entre as infecções hospitalares mais graves com taxas de mortalidade variando entre 20% a 50%, podendo chegar a 70% quando causada por patógenos multiresistentes (AYBAR, TOPELI, 2008; CHASTRE, 2005; COMBES et al., 2006; HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; KWA et al., 2007; MCCLURE, 2009; RELLO et al., 2006; SAFDAR, CRNICH, MAKI, 2005; ZIMERMANN e al., 2004). Adicionalmente, está associada à estadia prolongada na unidade (GARCIN et al., 2010; HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; NSEIR et al., 2006; PARKER et al., 2008), acarretando um custo hospitalar estimado de até \$40.000 dólares por episódio de PAV nos Estados Unidos (HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; RELLO et al., 2002; WARREN et al., 2003).

A maioria dos pacientes desenvolve pneumonia por microaspiração de secreção da orofaringe previamente colonizada durante a hospitalização na UTI, mas a aspiração de conteúdo gástrico, inalação de aerossóis contaminados provenientes de circuitos ventilatórios, disseminação hematogênica a partir de um foco distante e extensão direta de uma infecção contínua, como infecções do espaço pleural podem ocorrer (KIENINGER, LIPSETT, 2009; KOLLEF, 2005; SAFDAR, CRNICH, MAKI, 2005).

Os fatores de risco predisponentes ao desenvolvimento de PAVs se dividem em intrínsecos, como idade avançada, gravidade da doença de base, imunocomprometimento, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), tabagismo, má nutrição e coma; e extrínsecos incluindo cirurgias, particularmente as de tórax e abdome, procedimentos invasivos, uso de antiácidos, corticóides e antibióticos (HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; KIENINGER, LIPSETT, 2009; STRAUSBAUGH, 2005). A ventilação mecânica, assim como sua duração são os fatores de risco mais importantes na aquisição de pneumonias em pacientes internados em UTI(s) (KIENINGER, LIPSETT, 2009; SAFDAR, CRNICH, MAKI, 2005).

O paciente hospitalizado em UTI geralmente sofre mudanças na sua microbiota normal do trato respiratório superior, com substituição dos estreptococos, *Haemophilus* spp e anaeróbios por bacilos Gram-negativos tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e representantes da família *Enterobacteriaceae*, além do *S.aureus* resistente à oxacilina (CRNICH, MAKI, 2005; KIENINGER, LIPSETT, 2009; KOLLEF, 2005; PARKER et al., 2008; SAFDAR; PARK, 2005). Estas alterações normalmente estão associadas ao tempo de internação, gravidade da doença de base, uso de antimicrobianos e de procedimentos invasivos, particularmente o tubo endotraqueal (KIENINGER, LIPSETT, 2009; NSEIR et al., 2006; PARKER et al., 2008; PARK, 2005), caracterizando

a colonização da mucosa da orofaringe como fator de risco importante para o desenvolvimento de PAVs (BERTHELOT et al., 2001; ORTEGA,ROENEVELD, SCHULTSZ, 2004).

A etiopatogenia das PAVs está relacionada principalmente com aquisição de bactérias nosocomiais resistentes aos antibióticos (KIENINGER, LIPSETT, 2009; PARKER et al., 2008; PARK, 2005). O tubo endotraqueal comumente é recoberto por um biofilme, quando examinado por microscopia eletrônica, que pode agir como um foco de infecção, aumentando o risco de pneumonia e protegendo os microrganismos da ação de antibióticos e das defesas do organismo (KIENINGER, LIPSETT, 2009; NSEIR et al., 2006; PACHECO-FOWLER et al., 2004; TULLU et al., 2000).

O diagnóstico de PAV é baseado em critérios clínicos-radiológicos, incluindo sinais e sintomas tais como febre, hipotermia, secreção purulenta, infiltrados novos ou progressivos nas radiografias de tórax; adicionalmente, considera-se a presença de leucocitose ou leucopenia (AYBAR, TOPELI, 2008; DIAZ et al., 2009; DWIVEDI et al., 2010; FURTADO et al., 2007; HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; JUNG et al., 2007; KIENINGER, LIPSETT, 2009; NSEIR et al., 2008; RELLO et al., 2006; ZHUO et al., 2008). Estes critérios são inespecíficos, já que podem estar associados à outras síndromes comuns em pacientes de UTI como síndrome da angústia respiratória (SARA), embolia e infarto pulmonar, traqueobronquite e outras. A utilização de critérios microbiológicos no diagnóstico é recomendada pela sua sensibilidade e especificidade, além de permitir uma terapia antibiótica mais adequada (DIAZ et al., 2009; KIENINGER, LIPSETT, 2009; NIEDERMAN et al., 2005).

Entre os espécimes clínicos utilizados no diagnóstico microbiológico incluem-se: aspirado endotraqueal (AE), lavado bronco-alveolar (BAL) e secreção coletada com

escova protegida (PSB), através de técnicas quantitativas, considerando-se usualmente como pontos de corte: 10^5 , 10^4 e 10^3 unidades formadoras de colônias/mililitro (UFC/ mL), respectivamente (BERGMANS, BONTEN, 2004; KIENINGER, LIPSETT, 2009). Os dois últimos espécimes clínicos são coletados através de broncofibroscopia e apresentam elevada sensibilidade e especificidade, sendo que a utilização prévia de terapia antibiótica pode diminuir a sensibilidade (BERGMANS, BONTEN, 2004; KIENINGER, LIPSETT, 2009). Entretanto, a broncoscopia é uma técnica cara e nem sempre está disponível na rotina laboratorial em hospitais de países como o Brasil. Embora a cultura do AE apresente uma especificidade inferior (< 50%) à dos espécimes minimamente contaminados referidos anteriormente, ainda é muito utilizada, com relatos de uso do ponto de corte de 10^6 UFC/mL (FURTADO et al., 2007; NIEDERMAN, 2005; NSEIR et al., 2008; ZHUO et al., 2008), uma vez que é incomum um microrganismo causar pneumonia e não estar presente na cultura do AE (NIEDERMAN, 2005).

Aproximadamente 70% dos casos de PAV são causados por bacilos Gram-negativos (BERGMANS, BONTEN, 2004; KOLLEF, 2005; RELLO et al., 2006), observando-se uma maior mortalidade quando associada à patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* (COMBES et al., 2006; GARCIN et al, 2010; KOLLEF, 2005; KWA et al., 2007; MCCLURE, 2009; ZHUO et al., 2008; ZIMERMANN et al., 2004). Segundo Giantsou e colaboradores (2005), a mortalidade foi maior (18%) em PAVs por *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) do que na causada por outros microrganismos (4%), caracterizando uma pior evolução clínica nestes pacientes.

Os agentes etiológicos mais associados às PAVs segundo a casuística do “*National Nosocomial Infections Surveillance System*” (NNISS, 2004) são: *Pseudomonas aeruginosa*

(21%), *Staphylococcus aureus* (20%), *Enterobacter spp.* (9%) e *Klebsiella pneumoniae* (8%), sendo que nas UTI(s) o agente mais comum é *Pseudomonas aeruginosa* (25%).

Atualmente, tanto no Brasil (FURTADO et al., 2007; ZIMERMANN et al., 2004) quanto em outros países (BASSETTI et al., 2006; GIANTSOU et al., 2005; KOLLEF, 2005; KWA et al., 2007; PARKER et al., 2008) a maioria das PAVs é causada por microorganismos multiresistentes, associada à altas taxas de mortalidade, resultado em parte de terapêuticas inadequadas com regimes antimicrobianos que favorecem a emergência de amostras resistentes aos antibióticos (BASSETTI et al., 2006; BHAT et al., 2007; DWIVEDI et al., 2010; GARCIN et al., 2010; JUNG et al., 2007; KOLLEF, 2000; KWA et al., 2007; NSEIR et al., 2008; PARKER et al., 2008).

Na última década, amostras de *P.aeruginosa* causadoras de PAVs tem adquirido resistência (> 30%) às cefalosporinas (ceftazidime e cefepime), fluorquinolonas e carbapenemas e apresentam taxas elevadas de mortalidade (COMBES et al., 2006; PARK, 2005).

P.aeruginosa é um dos principais exemplos de microrganismo oportunista, caracterizado pela produção de uma variedade de fatores de virulência (KERR, SNELLING, 2009; SOARES, 2005), incluindo mecanismos de adesão e invasão, produção de endotoxina (lipopolissacarídeo da parede celular-LPS) e exotoxinas, como a exotoxina S e A, e enzimas incluindo a elastase, leucicidinas, além da produção de alginato (cápsula), auxiliar na evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (KERR, SNELLING, 2009; SADIKOT et al., 2005; SOARES, 2005). Adicionalmente, *P.aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a muitos antibióticos e pode adquirir resistência mobilizada por vetores como plasmídeos e transposons conjugativos à antibióticos considerados pseudomonicidas, dificultando a antibioticoterapia e aumentando a possibilidade de

terapêutica inadequada o que resulta numa mortalidade mais elevada (SOLH, ALHAJHUSAIN, 2009).

Dentre estes mecanismos de resistência aos antibióticos estão incluídos: diminuição da permeabilidade da membrana celular externa pela perda de porinas OprD, hiperprodução de bombas de efluxo, produção de enzimas que inativam os aminoglicosídeos, inativação por β -lactamases AmpC (grupo C), β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (grupo A) e metalo- β -lactamases (grupoB) (FLAHERTY, STOSOR , 2004; KERR, SNELLING, 2009; MESAROS et al., 2007; SACHA et al., 2008).

A resistência a algumas das classes de antibióticos pode ser mediada por diferentes mecanismos (KERR, SNELLING, 2009; MESAROS et al., 2007; SACHA et al., 2008). A resistência ao imipenem neste microrganismo pode decorrer da produção de carbapenemases, perda ou expressão reduzida de porinas OprD, enquanto a resistência ao meropenem pode ainda ser mediada pela hiperprodução de β -lactamases AmpC e/ou hiperexpressão de bombas de efluxo (KERR, SNELLING, 2009; KOUDA et al., 2009)

A produção de enzimas, como as β -lactamases, é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bactérias Gram-Negativas, incluindo *P.aeruginosa* (JACOBY, MUNOZ-PRICE, 2005; SACHA et al., 2008;). Existem numerosas β -lactamases descritas, codificadas por genes cromossomais e plasmidiais. São classificadas com base na seqüência de amino-ácidos e nucleotídeos em quatro classes: A e C, usando a serina como sitio ativo, B (metalo- β -lactamases – MBLs), com o zinco no sitio ativo e classe D ou OXA-enzimas, serina-proteases, mas distintas das classes A e C (MALTEZOU, 2009; PELEG et al., 2005; QEENAN, BUSH, 2007; SACHA et al., 2008).

Na última década, as MBLs emergiram como um dos mais importantes mecanismos de resistência, conferindo resistência a todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam e usualmente associadas a outros genes de resistência (MALTEZOU, 2009; SACHA et al., 2008). A produção de MBLs é codificada por genes cassetes móveis associados a determinantes de resistência de outras classes de antibióticos, inseridos no cromossoma ou em integrons da classe 1 (genes IMP, VIM e GIM) ou 3 (gene IMP) (CASTANHEIRA et al., 2004; COLLIS et al., 2002) que combinados com vetores genéticos como plasmídeos e transposons conjugativos podem ser disseminados inclusive entre outros microorganismos Gram-negativos que não *P.aeruginosa* (BENNETT, 1999; MALTEZOU, 2009; PATZER et al., 2009; SACHA et al., 2008; WALSH et al., 2005).

A maioria dos genes MBL é encontrada em plasmídeos (TOLEMAN et al., 2004), mas há evidências de transposon como responsável pela disseminação de integrons de classe 1 e de genes bla_{VIM-2} (YATSUYANAGI et al., 2004; SPENCER et al., 2003), aumentando a frequência de bactérias resistentes (KIM et al., 2005; KOUDA et al., 2009; MALTEZOU, 2009; PATZER et al., 2009; SACHA et al., 2008; WALSH et al., 2005).

Nem todos os genes de MBLs estão associados com integrons ou transposons. Análises de amostras brasileiras de *P.aeruginosa* apresentam regiões comuns de elementos chamadas CR (POIREL et al., 2004), sobre os quais o conhecimento é limitado, particularmente como facilitam a mobilização de genes, apesar de sua associação com genes de resistência à antibióticos (PARTRIDGE, HALL, 2003).

P.aeruginosa multiresistente pode ser definida quando apresenta resistência a três ou mais dos agentes antimicrobianos pseudomonídeos: penicilinas antipseudomonais (piperacilina), cefalosporinas antipseudomonais (ceftazidime), fluorquinolonas, carbapenemas (imipenem, meropenem, doripenem) e aminoglicosídeos (gentamicina,

tobramicina, amicacina) (DEFEZ et al., 2004). A multiresistência é frequentemente causada pela existência de vários mecanismos de resistência, citados anteriormente (BONOMO, SZABO, 2006). A presença de metalo- β -lactamases está associada ao fenótipo de multiresistência, porque normalmente já existe neste tipo de cepa resistência a aminoglicosídeos e quinolonas (MALTEZOU, 2009; WALSH et al., 2005).

Atualmente, as MBLs são classificadas em sete tipos diferentes (<http://www.lahey.org/Studies>), incluindo: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM-1, esta última descrita recentemente em *P.aeruginosa* da Austrália e NDM (M.A. Toleman, resultados não publicados) (MESAROS et al., 2007; PATZER et al., 2009; QUEENAN, BUSH, 2007; WALSH et al., 2005), com diferenças na seqüência de aminoácidos e quanto à distribuição geográfica (OLIVER, 2009; PATZER et al., 2009).

A primeira MBL descrita em *P.aeruginosa* foi do tipo IMP-1, detectada no Japão em 1990 (MALTEZOU, 2009; PELEG et al., 2005; QUEENAN, BUSH, 2007; ROSSOLINI, 2005), desde então, a diversidade destas enzimas tem sido revelada nos últimos 10 anos, na Ásia, Europa, assim como Américas do Norte e do Sul, sugerindo uma disseminação rápida dos genes de resistência responsáveis, através de determinados clones prevalentes de *P.aeruginosa* (MALTEZOU, 2009; QUEENAN, BUSH, 2007; ROSSOLINI, 2005; SACHA et al., 2008; WASH et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006a).

Os tipos IMP (de “*active on imipem*”) e VIM (de “*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*”) são os mais prevalentes e com uma ampla distribuição geográfica (GIAKKOUPIS et al., 2003; LOLANS et al., 2005; MALTEZOU, 2009). Inicialmente, MBLs do tipo IMP estavam confinadas quase que exclusivamente no Japão e em países de Sudeste asiático, incluindo a China (PELEG et al., 2005; QUEENAN, BUSH, 2007; ROSSOLINI, 2005), mas atualmente foram detectadas na Austrália, E.U. A., Canadá,

Brasil, Inglaterra, Itália e Portugal, em muitas espécies de *Enterobacteriaceae*, assim como em *P.aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (MALTEZOU, 2009; SADER et al., 2005a; WALSH et al., 2005).

VIM-1 foi inicialmente detectada em *P.aeruginosa* responsável por um surto nosocomial em Verona, Itália em 1997 (LAURETTI et al., 1999). A análise da sequência dos aminoácidos revelou uma similaridade de 31,4% com o tipo IMP-1. As amostras de *P.aeruginosa* produtora de VIM-2, em sua maioria (85,7%), apresentam resistência de nível alto (MIC>120µg/mL) ao imipenem (KIM et al., 2005). Atualmente, o VIM-2 é a MBL dominante globalmente, já descrita em 37 países em cinco continentes (GIAKKOUPIS et al., 2003; LOLANS et al., 2005; MALTEZOU, 2009), incluindo o Brasil (SADER et al., 2005a; SADER et al., 2005b).

O tipo SPM (de “São Paulo metallo-β-lactamase”) foi identificado primeiramente no Brasil em 2001, em uma amostra pan-resistente de *P.aeruginosa*, recuperada de um caso de sepse em uma criança com leucemia linfoblástica aguda (TOLEMAN et al., 2002). Ela apresenta similaridade (36,5%) com o tipo IMP-1 (TOLEMAN et al., 2002). A partir de sua descoberta, SPM-1 foi implicada em surtos hospitalares no Brasil, com dados indicativos da sua endemicidade em vários hospitais (GALES et al., 2003; SADER et al., 2005a; SADER et al., 2005b; ZAVASCKI et al., 2005).

A família GIM (de “German imipenemase”) foi detectada em cinco amostras de *P.aeruginosa* multiresistente de pacientes hospitalizados em Dusseldorf, Germany, em 2002 (CASTANHEIRA et al., 2004). Esta MBL está mais intimamente relacionada ao tipo IMP, com 39% a 43% de similaridade (MALTEZOU, 2009).

O tipo SIM-1 (de “Seoul imipenemase”) foi relatado pela primeira vez em sete amostras de *A.baumannii*, isoladas de várias enfermarias de um hospital de Seul, Coréia do

Sul (LEE et al., 2005) e apresenta similaridade de 64% a 69% com o tipo IMP (LEE et al., 2005).

As MBLs mais conhecidas são IMP-1, VIM-1 e SPM-1 (HELFAND, BONOMO, 2005; MALTEZOU, 2009; QUEENAN, BUSH, 2007;), esta última descrita em hospitais de regiões diferentes brasileiras (São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Pernambuco) (GALES et al., 2003), incluindo na cidade de Uberlândia (CEZÁRIO et al., 2009). Nesse estudo, um surto acometeu 76,7% dos pacientes infectados por *P.aeruginosa* multiresistente, constatando-se uma taxa alta (70%) de mortalidade, similarmente ao descrito por Zavascki e colaboradores. (2006b) no Rio Grande do Sul; retratando um problema de disseminação clonal com necessidade de adoção de medidas preventivas desta dispersão inter e intra-hospitalar (PICÃO et al., 2008).

Como dito anteriormente, os genes de resistência codificadores de metalo- β -lactamases estão inseridos usualmente em integrons de classe-1 em *P.aeruginosa* (FONSECA et al., 2005; MALTEZOU, 2009; SACHA et al., 2008). A presença destes integrons foi detectada em amostras de *P.aeruginosa* multiresistente em São Paulo, assim como na região amazônica do Brasil, com frequências acima de 50% (FONSECA et al., 2005; GALES et al., 2003). A importância destes vetores na dinâmica de aquisição de genes de resistência nestes microrganismos é destacada pela emergência destes fenótipos multiresistentes, dificultando a conduta terapêutica (FONSECA et al., 2005).

Recentemente foram identificados e caracterizados genes cassetes (arr-4 e arr-5) em integrons de classe-1 de amostras clínicas de *P.aeruginosa* no Rio de Janeiro, com evidência de disseminação horizontal intra e inter-hospitalar deste microorganismo (LOURENÇO et al., 2008).

A detecção rápida e acurada de microorganismos produtores de MBLs é crucial para estabelecimento de uma terapia antimicrobiana apropriada e prevenção de sua disseminação (CORNAGLIA et al., 2007; WALSH et al., 2005). Entretanto, não há nenhum método fenotípico padrão para detecção destas amostras, recomendado pelo “*Clinical Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2008), nem por qualquer outro comitê internacional (SINGH et al., 2009; PICÃO et al., 2008). Existem várias publicações (FRANKLIN, LIOLIOS, PELEG, 2006; MARCHIARO et al., 2005; PICÃO et al., 2008) sobre diferentes métodos fenotípicos baseados no emprego dos inibidores de MBL, como o ácido-etil-diamino-tetracético (EDTA) ou compostos derivados do tiol, como 2 ácido-mercaptopropiônico (MPA), que embora simples e baratos quando comparados com as técnicas genotípicas, apresentam resultados discordantes dependendo da metodologia, substratos e dos inibidores de MBL empregados, além da espécie testada (FRANKLIN, LIOLIOS, PELEG, 2006; MARCHIARO et al., 2005; PICÃO et al., 2008).

Qu e colaboradores (2009) relataram quando da utilização do teste de sinergismo de duplo-disco (DDST), com MPA, valor preditivo positivo baixo de 48,8%. Kim e colaboradores (2007) demonstraram que concentrações altas do MPA no teste de sinergismo quando da detecção de MBL estão associadas com resultados falso-positivos em isolados produtores de ESBL, AmpC e algumas carbapenemases da classes A, enquanto baixas concentrações reduzem a sensibilidade do teste.

A utilização de técnicas de biologia molecular é imprescindível no melhor conhecimento da epidemiologia destas infecções (CEZÁRIO et al., 2009; NOUER et al., 2005), uma vez que possibilita a caracterização de surtos e detecção de possíveis fontes de transmissão (SOARES , 2005; ZAVASCKI et al., 2005).

A exemplo de outros patógenos hospitalares como *S.aureus* resistente à oxacilina, *K.pneumoniae*, entre outros (GIAKKOUI et al., 2003c; SOUSA et al., 2001), estudos com técnicas de “DNA fingerprinting” revelaram que a maioria dos surtos por *P.aeruginosa* do fenótipo multiresistente produtor de MBL é de origem mono clonal, aspecto que indica falhas nas práticas de controle de infecção hospitalar como desinfecção inadequada dos equipamentos médicos, além do papel das mãos dos profissionais de saúde como possível via de disseminação destes microorganismos, inclusive dos produtores de MBLs no ambiente hospitalar (FIGUEIREDO-MENDES et al., 2005; MALTEZOU, 2009; PELLEGRINO et al., 2002).

Estudos realizados inclusive no Brasil apontam uma disseminação intra e inter-hospitalar de determinados clones de *P.aeruginosa* em diferentes regiões (FIGUEIREDO-MENDES et al., 2005; FONSECA et al., 2006; MARTINS et al., 2007). O primeiro relato desta disseminação clonal foi de uma amostra de *P.aeruginosa* MBL SPM-1, em hospitais de cinco estados brasileiros (GALES et al., 2003). A seguir, foi documentada a presença de cinco clones intra e inter-centros em UTIs de São Paulo (quatro centros) e Brasília (um centro), utilizando a técnica de “PFGE”, sem descrição do tipo de MBL (FIGUEIREDO-MENDES et al., 2005).

No Sul do País, Zavascki e colaboradores (2005) relataram um surto por um clone bla_{SPM-1}, seguido de infecções endêmicas relacionadas com este clone num hospital terciário de Porto Alegre. No entanto, o mesmo grupo (MARTINS et al., 2007) detectou a presença de dois clones, um em amostras de SPM-1 como nas publicações anteriores e outro englobando amostras de IMP-1 em outro hospital geral de Porto Alegre. Estas investigações incluíram amostras provenientes de diversas unidades e de diferentes tipos de infecções nestes dois hospitais de assistência terciária.

No Rio de Janeiro, em estudo realizado num hospital universitário, houve evidência de uma frequência alta (61,2%) de amostras de *P.aeruginosa* resistente ao imipenem, em diferentes unidades e tipos de infecções, com predomínio de um clone A (76%) de *P.aeruginosa* produtora de MBL (KOKIS et al., 2005).

Em Uberlândia, Cezário e colaboradores (2009) relataram um surto de infecção hospitalar, incluindo predominantemente casos de PAV (85%), acometendo 47 pacientes em sua maioria (76,7%) infectados por *P.aeruginosa* produtora de MBL, com identificação de quatro clones e predomínio de dois, A (61,5%) e B (23,1%), do genótipo bla_{SPM-1}.

II- JUSTIFICATIVAS

Entre as infecções hospitalares em UTIs de adultos, destacam-se pela sua frequência e gravidade, as PAVs. Ao contrário do observado para outras infecções, as medidas de prevenção e controle adotadas para as PAVs em UTIs oferecem resultados menos efetivos. De uma maneira geral, o principal agente destas infecções é *Pseudomonas aeruginosa*, que se apresenta na forma endêmica, bem como em surtos, usualmente associados à amostras epidêmicas e sobretudo determinados clones prevalentes com resistência aos carbapenemas e demais drogas pseudomonicidas.

Esta situação tem se mostrado presente na UTI de adultos do HC-UFU com *P.aeruginosa* responsável por cerca de 30 a 50% das PAVs e frequência significativa de amostras produtoras de metalo- β -lactamases.

Considerando a prática usual de terapêutica antibiótica na Unidade, com utilização de drogas potentes e predomínio de cefepime e/ou imipenem, a chance de antibioticoterapia inadequada com falta de descalonamento, torna a situação preocupante em termos de prognóstico dos pacientes com PAVs e da transmissão horizontal dos microorganismos na Unidade.

O estudo proposto, incluindo o diagnóstico etiológico das PAVs, com análise do perfil e dos mecanismos de resistência aos antibióticos, bem como, os aspectos epidemiológicos, particularmente os fatores de risco associados; utilizando técnicas epidemiológicas clássicas e moleculares, certamente contribuirá para melhor conhecimento destas infecções.

GERAL

- Descrever PAVs por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras ou não de metalo- β -lactamases em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia: incidência, aspectos epidemiológicos e moleculares.

ESPECÍFICOS

- Avaliar os fatores de risco intrínsecos e extrínsecos associados ao desenvolvimento de PAVs por *P.aeruginosa* produtora de MBL;
- Caracterizar as frequências dos fenótipos de resistência: AmpC e MBLs nas amostras de *P. aeruginosa*;
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras de *P.aeruginosa*;
- Detectar a presença de genes relacionados à produção de MBLs através da reação da polimerase em cadeia (PCR);
- Avaliar o polimorfismo das amostras de *P.aeruginosa* MBLs positivas por análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do DNA cromossômico pela eleforese em campo pulsado (PFGE);

1 - UNIDADE

O estudo foi realizado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), instituição de ensino com cerca de 500 leitos que oferece assistência de nível terciário. A UTI de adultos é uma unidade mista, com 15 leitos.

2 - DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de coorte, incluindo pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudomonas aeruginosa*, internados na UTI, no período de janeiro/2004 a novembro/2006.

Foram realizadas culturas qualitativas de material clínico coletado da orofaringe das primeiras 48 horas de internação, após 4 dias da primeira coleta e a seguir semanalmente, até o positivamento para *P.aeruginosa* em secreção traqueal. Culturas quantitativas do aspirado endotraqueal foram realizadas quando de indicação clínico/radiológica de pneumonia dos pacientes submetidos à ventilação mecânica internados na unidade.

Uma ficha individual foi preenchida com características demográficas, fatores de risco intrínsecos como idade, doença de base, tempo de internação hospitalar, diagnóstico na admissão hospitalar, e fatores extrínsecos como uso de antimicrobianos, duração da antibioticoterapia, cirurgia, procedimentos invasivos (prótese ventilatória, cateter vascular central, sonda vesical e outros) (Anexo I), além de um termo de consentimento (Anexo II), assinado pelo familiar ou responsável pelo paciente.

As observações tiveram continuidade até extubação, morte ou alta do paciente da unidade.

3 - DEFINIÇÕES

- **Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV)** – infecção que se manifesta após 48 horas de entubação nos pacientes ventilados mecanicamente (CHASTRE, 2005; KOLLEF, 2005), com presença de critérios clínicos (aparecimento ou modificação de secreção respiratória, hipertermia ou hipotermia), radiológicos (aparecimento ou modificação de imagem radiológica com infiltrado), laboratoriais (leucocitose), segundo “Centers for Diseases Control and Prevention” (CDC) (BERGMANS, BONTEN, 2004; FURTADO et al., 2007; HUGONNET, UÇKAY, PITTET, 2007; JUNG et al., 2007; NSEIR et al., 2008; ZHUO et al., 2008) e microbiológicos (contagem no AE $\geq 10^6$ UFC/mL) (FURTADO et al., 2007; JOURDAIN et al., 1995; NIEDERMAN, 2005).

- **Colonização do trato respiratório superior** – presença de *P.aeruginosa* na mucosa da orofaringe.

- **Multiresistência** – resistência a três ou mais dos seguintes agentes antimicrobianos: penicilinas antipseudomonais (piperacilina), cefalosporinas antipseudomonais (ceftazidima), fluorquinolonas (ciprofloxacina), carbapenemas (imipenem, meropenem e doripenem) e aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina ou ampicacina) (DEFEZ et al., 2004; GISKE et al., 2008).

4 - TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

4.1 - COLETA

A coleta de material clínico da mucosa da orofaringe dos pacientes foi realizada pela própria estudante, com “swab”, transportada em tubos com “*Trypticase Soy Broth*” (TSB - DIFCO®) (DILLON et al., 2005; NSEIR et al., 2008). O aspirado endotraqueal foi coletado por aspiração com sonda em tubo estéril através de técnicas assépticas, pelos fisioterapeutas

ou enfermeiros quando da higiene matinal do paciente; e encaminhados ao laboratório de Microbiologia/ARIMP-UFU para processamento em tempo inferior a 2 horas.

4.2 - CULTIVO PRIMÁRIO

4.2.1 - CULTURA QUALITATIVA

A cultura qualitativa do espécime clínico da orofaringe foi realizada após agitação dos tubos com TSB em “vórtex” e cultivo da suspensão resultante em Ágar Pseudomonas (DIFCO®) pela técnica de esgotamento, seguindo-se incubação à 37° C por 24-48 horas (KONEMAN et al., 2001; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004).

4.2.2 - CULTURA QUANTITATIVA

O aspirado endotraqueal foi submetido à diluições decimais em solução salina fisiológica e volumes de 0,1 mL inoculados na superfície de Ágar Pseudomonas (DIFCO®), com auxílio da alça de Drigalski, seguindo-se incubação à 37° C por 24-48 horas, e determinação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (AYBAR, TOPELI, 2008; KONEMAN et al., 2001; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004).

4.3 – ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS

As colônias presuntivas de *P.aeruginosa* foram subcultivadas em caldo “*Broth Heart Infusion*” (BHI-DIFCO®) acrescido de 15% de glicerol, com incubação a 37⁰C por 24 horas, seguindo-se a conservação em “freezer” a -20⁰ C (KONEMAN et al., 2001; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004).

4.4 - IDENTIFICAÇÃO DE *P. aeruginosa*

As amostras foram identificadas como *P.aeruginosa* pelos seguintes testes: produção de pigmentação, comportamento oxidativo no meio de Hugh-Leifson (OF) (Merck, Darmstadt, Alemanha) acrescido de 1% de glicose (Sigma Chemical Company), reação de

citocromo-oxidase, crescimento a 42° C, descarboxilação da arginina e hidrólise da acetamida (KONEMAN et al, 1999; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004). A cepa de *P.aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo.

4.5 - TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS DE INFECÇÃO

4.5.1 - Teste de difusão em Agar

Foi utilizada a metodologia proposta pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2008), com a utilização dos seguintes discos de antimicrobianos: piperacilina-tazobactam (100/10 µg), polimixina B (300u), ticarciclina-ácido clavulânico (75/10 µg), imipenem (10 µg), ceftazidima (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefepime (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), aztreonam (30 µg), ampicilina-sulbactam. A cepa de *P.aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como padrão.

4.6 - DETECÇÃO FENOTÍPICA DE AMP^C E METALO-β-LACTAMASES (MBLs)

4.6.1 - Detecção fenotípica de Amp^C induzida

As amostras bacterianas de *P.aeruginosa* isoladas de infecção que apresentaram resistência à cefoxitina foram submetidas ao teste de aproximação de disco, “teste D”, para a indução da enzima Amp^C. Foram subcultivadas em caldo TSB, incubadas a 37°C até atingirem turvação equivalente à escala 0,5 McFarland (1-2 x 10⁸ UFC/ml) e semeadas em placas de “petri” contendo Agar Müller- Hinton com auxílio de “swab”, de modo a obter crescimento confluyente. A seguir, um disco de imipenem (30 µg), utilizado como indutor, foi colocado no centro da placa, equidistante 25 mm (centro a centro) dos seguintes discos/substratos: ceftazidima (30µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg) e piperacilina-tazobactam (10/100 µg), seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas.

A presença de um antagonismo entre o indutor e um dos substratos, caracterizado por uma zona de crescimento em forma de um D, medindo 20 mm ou mais na área ao redor do disco/substrato caracterizou o teste como positivo para a presença de AmpC.

Como controles foram utilizadas amostras de *P.aeruginosa* ATCC 27853 (controle positivo) e *E.coli* ATCC 25922 (controle negativo) (DUNE, HARDIN, 2005).

4.6.2 - Detecção fenotípica de MBLs

Teste de sinergismo com duplo-disco

As amostras bacterianas de *P.aeruginosa* isoladas de infecção que apresentaram resistência à ceftazidima e/ou imipenem foram submetidas ao teste de sinergismo com duplo disco, utilizando-se como inibidores soluções de ácido-etil-diamino-tetracético (EDTA) e 2 ácido-mercaptopropiônico (2-MPA) e como indicadores os discos de imipenem (10µg) e ceftazidima (30µg) (ARAKAWA et al., 2000; HELFAND, BONOMO, 2005; JESUDASON et al., 2005; LEE et al., 2001; PICÃO et al., 2008; QUEEN, BUSH, 2007). As amostras foram subcultivas em caldo TSB, incubadas a 37°C até atingirem turvação equivalente à escala 0,5 MacFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml) e semeadas em placas de “petri” contendo Agar Müeller- Hinton com auxílio de uma “swab”, de modo a obter um crescimento confluyente. A seguir, foram acrescentados um disco de imipenem (10 µg) e outro de ceftazidima (30µg) equidistantes 20 mm (centro a centro) de um disco de papel de filtro estéril de 6 mm de diâmetro, sobre o qual foram adicionados 3 µl de solução de 2-MPA, seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas.

O outro substrato quelante utilizado foi o EDTA a 500 mM, com adcionamento de 10 µl sobre outro disco de papel de filtro estéril equidistante 15 mm (centro a centro) dos discos de imipenem (10 µg) e ceftazidima (30µg).

A presença de um halo de inibição ou de um aumento na zona de inibição em torno do disco de imipenem (10 µg) ou de ceftazidima (30µg) caracterizou o teste como positivo para a presença de metalo-β-lactamase (ARAKAWA, 2000; JESUDASON et al., 2005; LEE et al., 2001; PICÃO et al., 2008).

Como cepas controles foram utilizadas *P.aeruginosa* ATCC 27853 (controle negativo) e *P.aeruginosa* PA-319 (controle positivo – cepa doada pela Dra. Ana Gales-Unifesp).

5 - ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob supervisão da Prof^ª Dra. Kátia Regina N. Santos, Prof^ª Adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

5.1 - DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM A PRODUÇÃO DE MBL ATRAVÉS DA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

5.1.1 - EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

A extração do DNA bacteriano foi realizada através da lise térmica. As amostras de *Pseudomonas aeruginosa* positivas nos testes fenotípicos de produção de metalo-β-lactamases foram subcultivadas em placas de “petri” com “*Trypticase Soy Agar*” (TSA - Becton Dickinson), a 37° C por 24 horas. A seguir, cerca de 5 colônias foram adicionadas em um “*eppendorf*” grande, contendo 100 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). Esta suspensão foi mantida à temperatura de 100°C por 10’, em seguida centrifugada por 30 seg a 7000 rpm, o sobrenadante foi coletado e utilizado na reação de PCR (KOKIS et al., 2005; SENDA et al., 1996).

5.1.2 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Nas amostras de *P. aeruginosa*, foram pesquisados os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}. As seqüências de oligonucleotídeos utilizadas e amplicons obtidos nas reações de PCR para detecção de genes que codificam MβLs estão descritas no tabela 1. Foi utilizada a metodologia descrita por Senda e colaboradores (1996), com modificações.

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos utilizadas e amplicons obtidos nas reações de PCR para detecção de genes que codificam MBLs

Gene	Seqüência iniciadora (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>bla</i> _{IMP-1}	CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC GAACAACCAGTTTTGCCTTACC	587	Osano <i>et al.</i> , 1994
<i>bla</i> _{SPM-1}	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAA ATGTTCAAACTTTTGAGTAAG	648	Toleman <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> _{VIM-2}	CTACTCAACGACTGAGCG	801	Poirel <i>et al.</i> , 2005

De forma sintetizada, uma alíquota de 1 µL do DNA bacteriano (*P. aeruginosa*) obtido pelo método da lise térmica foi adicionada à mistura da reação de PCR, que foi composta por 2,5 µL de tampão da enzima 10x (Tris HCl 10 mM, KCl 25 mM), 1 mM de MgCl₂ (Biotools, Madri, Espanha), 0,5 µM de cada iniciador (Genemed Synthesis, San Francisco, CA, EUA), 100 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e água livre de nucleases para um volume final de 25µL. A amplificação dos fragmentos codificados pelos genes acima descritos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha).

Os parâmetros de amplificação para os genes *bla*_{IMP-1} e *bla*_{SPM-1} foram os seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, de anelamento a 62°C por 1 minuto, de extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para o gene *bla*_{VIM-2}, os parâmetros foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em TBE (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Após corrida de 90 minutos a 80 V, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 30 minutos, e sua imagem capturada sob luz ultra-violeta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Marne-la-Valleé, França). Como padrão de DNA, utilizamos o marcador 100 pb DNA ladder (Life Technologies, São Paulo, Brasil).

Como cepas controles foram utilizadas amostras de *P.aeruginosa* (SPM-1 - 48-1997A), cedida pela Dr^a Ana Gales (Laboratório Alerta, Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo), *P.aeruginosa* (VIM-2 – JMI Laboratories, Iowa, North Liberty, USA) cedida por Dr^o Ronald Jones e amostras de *A.baumannii* (IMP-1-48695), cedida também pela Dr^a Ana Gales.

5.2 – TIPAGEM MOLECULAR

5.2.1 – ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *P.aeruginosa* foi realizada através de eletroforese em campo pulsado “*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*” (PFGE), Foi empregado um protocolo adaptado daquele utilizado por Pellegrino e colaboradores (2002).

As amostras foram subcultivadas em meio de “*Trypticase Soy Agar*” (TSA - Becton Dickinson), e incubadas a 35°C, por 18 horas. A partir desse crescimento, foram feitas suspensões em 3 mL de solução salina, de modo a obter uma turvação semelhante à do padrão 6 da escala de McFarland, em seguida, 250 µL destas suspensões foram centrifugadas a 12000 rpm por 5', o sobrenadante foi descartado e o “pellet” resuspenso em 250 µL de tampão PIV (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM – pH 7,6).Esse volume de suspensão bacteriana foi misturado com um volume igual de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve GTG agarose; FMC BioProducts, Rockland, Maine, EUA) a 2%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a mistura foi distribuída em moldes, para a formação de blocos, que foram mantidos a 4°C por 15 minutos.

Após solidificação, os blocos de agarose foram estocados em 2,0 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6 mM, pH 7,6; NaCl 1M; EDTA 100mM – pH 7,5; 0,5% de Brij-58; 0,2% de desoxicolato sódico; 0,5% de lauril sarcosinato de sódio), estando viáveis por até 2 anos.

Um ou dois blocos de agarose foram selecionados e colocados em tubos contendo 2,0 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6 mM, pH 7,6; NaCl 1M; EDTA 100mM – pH 7,5; 0,5% de Brij-58; 0,2% de desoxicolato sódico; 0,5% de lauril sarcosinato de sódio; 1 mg/mL de lisozima) e incubados por um período de 24 h, a 35°C. Após esse período, os

tubos foram resfriados a 4° C, e a solução de lise foi substituída por 3,0 mL de solução ESP (EDTA 0,4M, pH 9 a 9,5; 1% de lauril sarcosinato de sódio), contendo 10 µL de proteinase K (Sigma) a 20 mg/mL, e incubados em banho-maria, a 50°C, por um período de 24 horas.

A solução foi substituída por nova solução ESP e os tubos incubados a 50°C por 24 horas. Após, a solução ESP foi substituída por 3,0 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA 0,1 mM) para iniciar a lavagem dos blocos sob agitação suave a 35°C.

O procedimento de lavagem com TE foi realizado por cinco vezes; as três primeiras lavagens foram feitas em um intervalo de 20 a 30 minutos cada uma; a quarta com intervalos de 2 horas, e a última de 18 horas a 24 horas. Após a última incubação, os blocos foram colocados em solução TE a 4° C e preparados para digestão enzimática, onde foi utilizada a enzima de restrição *SpeI* (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, Indiana, EUA). Seguiu-se incubação durante 2 horas, a 35° C, numa solução contendo 200µL de tampão para a enzima de restrição (20 µL de tampão B 10x concentrado + 180 µL de água Milli Q estéril). A solução de tampão foi removida e substituída por nova solução ainda sem a enzima, e novamente os blocos foram incubados sob as mesmas condições. Após esse período, estes foram submetidos ao tratamento com solução contendo a enzima (15 U) por um período de 24 horas, a 35° C, e posteriormente os blocos foram retirados da solução e fundidos a 72° C e aplicados nos reservatórios do gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 0,5x (Tris 0,89 M, EDTA 0,025 M e ácido bórico 0,89 M).

Foram incluídos padrões de tamanho de DNA (Pulse Marker, 50-1000 Kb; Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EUA).

Os fragmentos foram separados através de eletroforese realizada no sistema de eletroforese em campo pulsado CHEF DR III SYSTEM (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA), utilizando tempo de pulsos crescentes de 5 a 35 segundos, por 24 horas a 6 V/cm, num ângulo de 120° e na temperatura de 11°C.

Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), por 30 minutos e descorado com água destilada, durante 1 a 2 horas, observado sob luz UV e finalmente fotografado.

Foi efetuada a inspeção visual dos perfis de fragmentação obtidos, seguindo o critério utilizado para a interpretação proposto por Tenover e colaboradores (1995), de forma que as amostras foram consideradas idênticas se coincidissem em todas as bandas, similares (subtipos) se diferirem em uma ou até três bandas claramente visíveis e diferentes quando houvesse diferenças em quatro ou mais bandas. A análise da clonalidade também foi realizada utilizando-se o programa “*Molecular Analyst Fingerprinting Plus software package (version 1.12) of the Image Analysis System (Bio-Rad)*” para confecção de um dendograma.

6 - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (n° 215/06) (Anexo III).

7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados epidemiológicos foram analisados através do programa Epi – Info Versão 5.0 (DEAN *et al.*, 2000), SPSS for Windows, Version 17.0 and Bioestat, Version 5.0

(AYRES JUNIOR, AYRES, SANTOS, 2000), utilizando os testes X^2 e exato de Fisher, para variáveis categóricas e t de “*Student*” para as contínuas, na análise univariada.

As variáveis com $p < 0,2$ foram incluídas no modelo de regressão logística da análise multivariada, para avaliação quanto aos fatores de risco de PAV por *P.aeruginosa* produtora e não produtora de metalo- β -lactamases.

A significância foi considerada quando $p \leq 0,05$, calculando-se os “*odds ratio*” e os intervalos de confiança.

1 – ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE COORTE

Um total de 207 pacientes desenvolveu PAV durante o período do estudo. Destes, 93 (45%) por *P.aeruginosa*, seguido de *S.aureus* (40%), *Enterobacteriaceae* (10%) e *Acinetobacter spp.* (5%). Dos 93 pacientes incluídos neste estudo, 40 (43 %) tiveram PAV por *P.aeruginosa* do fenótipo produtor de metalo- β -lactamase (PA-MBL) e 53 (57%) PAV por amostras do fenótipo não produtor desta enzima.

Foi observada uma taxa de mortalidade hospitalar de 37,63% entre os casos de PAV por *P.aeruginosa*.

A colonização prévia do trato respiratório superior por *P.aeruginosa* foi observada em 98,0% dos pacientes, com desenvolvimento de infecção posterior, sem diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, FATORES DE RISCO E MORTALIDADE DOS PACIENTES COM PAV POR *P.aeruginosa* MBL POSITIVA E NEGATIVA

Os fatores de risco significativos identificados em análise univariada ($p \leq 0,05$) para desenvolvimento de PAV por PA-MBL foram: escore ASIS, diagnóstico clínico na admissão, hospitalização prévia, estadia prolongada na UTI, uso prolongado de VM, uso de carbapenemas, fluorquinolonas e uso de três ou mais antibióticos. A taxa de mortalidade neste grupo foi também significativamente maior no grupo de PAV por PA-MBL (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise univariada dos fatores de risco e evolução para PAV por *P.aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase (PA-MBL).

Variáveis	PAV por <i>P.aeruginosa</i>				
	MBL + (n-40)	MBL - (n-53)	OR (95% CI)	<i>p</i>	
Idade (anos) ^a	52.87	48.92	0.7 (0.2 - 2.7)	0.99	
Sexo (masculino)	26(65.0)	37 (69.8)	0.80 (0.33 – 1.93)	0.62	
ASIS score ^a	4.60	3.69	2.43 (1.44 – 4.09)	0.001	
Diagnóstico de admissão	clínico	25 (62.5)	17(32.07)	3.53 (1.49 – 8.35)	0.004
	cirúrgico	08 (20.0)	17(32.07)	0.53 (0.20 – 1.39)	0.19
	trauma	07(17.5)	19 (35.85)	0.38 (0.14 – 1.02)	0.08
Imunocomprometimento	25 (62.5)	28 (52.83)	1.49 (0.64 -3.44)	0.35	
Cirurgia prévia	29 (72.5)	35 (66.04)	1.36 (0.55 -3.32)	0.51	
Hospitalização prévia	36 (90.0)	35 (66.04)	4.63 (1.42- 15.05)	0.011	
Duração de estadia UTI (dias) ^a	47.45	17.20	1.07 (1.03-1.10)	<0.001	
Duração de VM (dias) ^a	44.25	13.07	1.09 (1.04-1.13)	<0.001	
Presença \geq 3 dispositivos invasivos	37 (92.5)	44 (83.0)	2.52 (0.63-10.0)	0.19	
Uso de antibióticos					
B-lactâmicos	40 (100.0)	45 (84.90)	6.93 (0.83-57.91)	0.07	
Cefalosporinas de 3 ^a /4 ^a geração	34(85.0)	39 (73.6)	2.03 (0.70 – 5.87)	0.19	
Carbapenêmicos	26 (65.0)	15 (28.30)	4.70 (1.95 -11.37)	0.001	
Fluoroquinolonas	17(42.5)	09(16.9)	3.6 (1.39 – 9.37)	0.008	
Aminoglicosídeos	14 (35.0)	09 (16.98)	2.63 (1.00 – 6.93)	0.08	
Anaerobicidas	12 (30.0)	19 (35.8)	0.77 (0.32 – 1.85)	0.55	
\geq 3 antibióticos	29(72.5)	24(45.28)	3.19 (1.32 – 7.68)	0.010	
Mortalidade hospitalar	22 (55.0)	13 (24.5)	3.76 (1.55 -9.09)	0.003	

MBL, metalo- β -lactamase; + produtoras; - não-produtoras

Valores em números (%); ^a Média

OR - “odds ratio”; CI - intervalo de confiança

As variáveis que apresentaram $p < 0,2$ na análise univariada foram incluídas na regressão logística. A hospitalização prévia e o tempo prolongado de VM apresentaram-se como fatores de risco independentemente associados com desenvolvimento de PAV por PA-MBL quando da análise multivariada. Adicionalmente, a taxa de mortalidade hospitalar continuou significativa no grupo de PAV por PA-MBL (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise multivariada dos fatores de risco e evolução para PAV por *P.aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase (PA-MBL).

Variáveis	OR (95%CI)	<i>p</i>
Hospitalização prévia	6.91(1.25 – 38.24)	0.026
Duração de VM (dias) ^a	1.09 (1.05 – 1.15)	< 0.001
Mortalidade hospitalar	4.95 (1.50 – 16.35)	0.008

^aMédia

OR - “odds ratio”; CI - intervalo de confiança

3 - DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MBL E AmpC EM AMOSTRAS DE *P.aeruginosa*

Entre as 93 amostras de *P.aeruginosa* recuperadas dos casos de PAV, 40 (43%) foram identificadas como produtoras de MBL pelo teste fenotípico de sinergismo com duplo-disco, sendo (38%) e (40%) pelo uso dos inibidores EDTA e MPA, respectivamente ($p>0,05$).

A pesquisa do fenótipo AmpC evidenciou que a maioria (59,14 %) das amostras expressou estas β -lactamases de amplo espectro. Estes dados estão na figura 1.

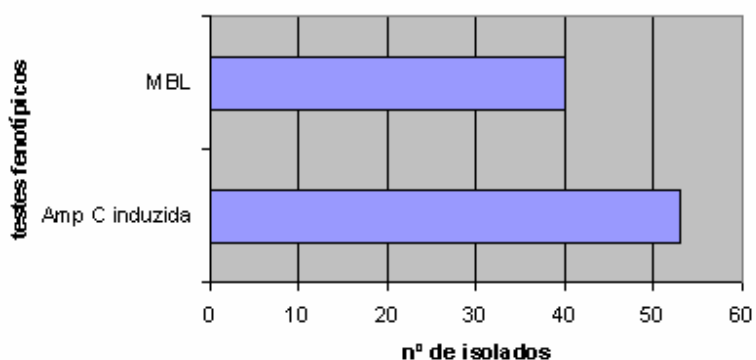


Figura 1. Frequência dos fenótipos AmpC induzida e MBL em amostras de *P.aeruginosa*

4 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *P.aeruginosa* MBL POSITIVAS E NEGATIVAS FRENTE AOS ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR

A resistência aos agentes antimicrobianos das amostras de *P.aeruginosa* está sumarizada na Tabela 4. A resistência tanto aos agentes β -lactâmicos quanto não- β -lactâmicos foi significativamente maior nas amostras de PA-MBL positivas.

No total, 36 amostras (36/93 – 38,7%) apresentaram resistência ao imipenem, destas 80,5% foram produtoras de MBL. O fenótipo de multiresistência foi observado em 33 amostras (33/93 – 35,5%), sendo todas pertencentes ao fenótipo MBL (33/40 - 82,5%).

Tabela 4 - Resistência antimicrobiana das amostras de *P.aeruginosa* isoladas de PAV

Antibióticos	MBL + n=40 (%)	MBL - n=53 (%)	<i>p</i>
Aztreonam	13 (32.5)	07 (13,2)	<0.001
Cefepime	24 (60.0)	08 (15,1)	<0.001
Ceftazidime	28 (70.0)	04 (7.6)	<0.001
Imipenem	29 (72.5)	07 (13,2)	<0.001
Piperacillin/tazobactam	13 (32.5)	05 (9,4)	<0.001
Ciprofloxacina	20 (50,0)	06 (11,32)	<0.001
Gentamicina	19 (47.5)	0	<0.001
Polimixina B	0	0	-

5 - DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM A PRODUÇÃO DE MBL

A presença de genes que codificam a produção de MBL foi investigada através da metodologia de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos em 16 amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram teste fenotípico positivo para produção de MBL, as outras 24 amostras MBL positivas apresentaram problemas em sua reativação. Foi investigada a presença dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}.

Somente 3 (18,75%) das 16 amostras MBL (+) de *P. aeruginosa* geraram produtos de PCR compatíveis com o fragmento amplificado dos genes pesquisados, sendo que estas 3 amostras apresentaram fragmento correspondente à amplificação do gene *bla_{SPM-1}* (648 pb). Os genes *bla_{IMP-1}* (587 pb) e *bla_{VIM-2}* (801 pb) não foram encontrados. Nas 13 amostras restantes não foram observados amplicons para os genes pesquisados (Figura 2).

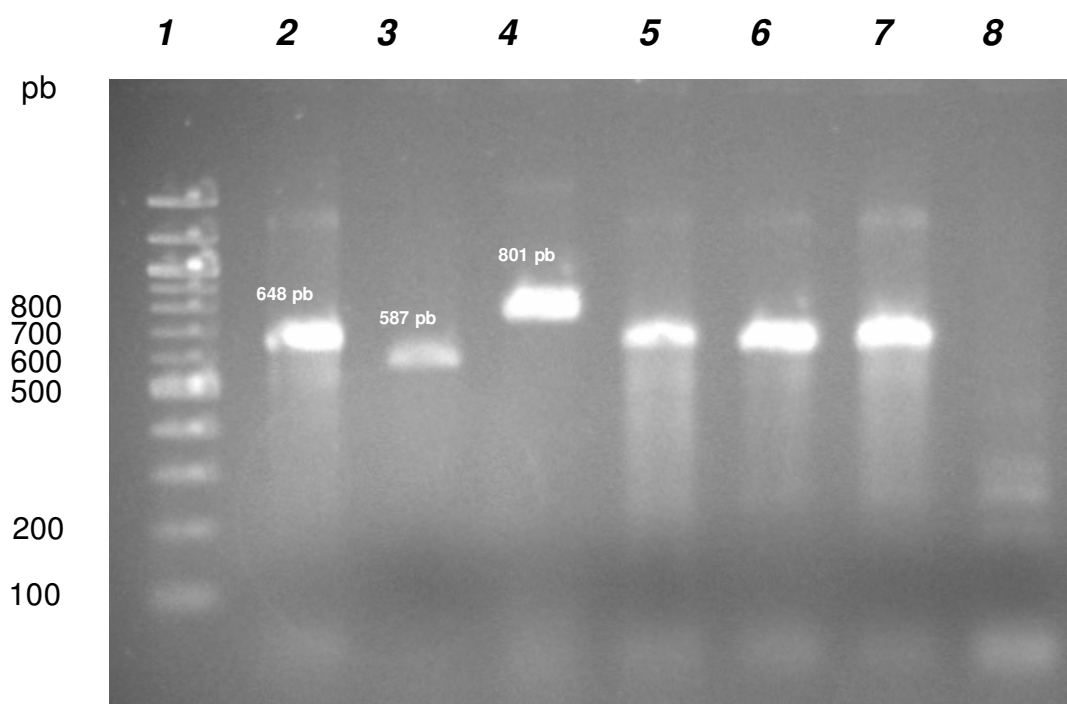


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 648 pb do gene *bla_{SPM-1}*, 587 pb do gene *bla_{IMP-1}* e 801 pb do gene *bla_{VIM-2}*. Linha 1 – Padrão de tamanho molecular (100 pb DNA ladder [BioLabs]); Linha 2 – amostra controle de *P. aeruginosa* *bla_{SPM-1}* positiva; Linha 3 – amostra controle de *A. baumannii* *bla_{IMP-1}* positiva; Linha 4 – amostra controle de *P. aeruginosa* *bla_{VIM-2}* positiva; Linhas 5 a 7 – amostras clínicas de *P. aeruginosa* positivas para o gene *bla_{SPM-1}* (85 c-2006, 97c-2006, 64S-Sec9-2005); Linha 8 – controle negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853)

6 - ANÁLISE DO PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DO DNA DE *P.aeruginosa*

A diversidade genômica foi avaliada para 20 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem, pela técnica do PFGE após tratamento com a enzima de restrição *SpeI* (Figura 3).

Entre as 20 amostras testadas, 16 foram escolhidos com base na positividade do teste fenotípico para produção de MBL; mesmas amostras submetidas ao PCR; compreendendo duas representativas do ano de 2004 (surto), quando ocorreu o primeiro relato de PAV por *P.aeruginosa* MBL positiva no hospital e 14 do período de 2005 a 2006. Outras 4 amostras resistentes ao imipenem do ano de 2009 (recuperadas fora do período deste estudo) foram incluídas na análise para comparação de similaridade com as amostras MBLs. Em dois casos foram analisadas uma amostra de colonização e outra de infecção do mesmo paciente.

Pela análise do dendograma (Figura 4) gerado por análise computadorizada dos perfis clonais do DNA de *P.aeruginosa* em PFGE, observamos um total de 19 perfis de fragmentação do DNA genômico, obtido nas 24 amostras analisadas. Os perfis de fragmentação foram incluídos em 16 genótipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P). Os genótipos foram designados com letras maiúsculas e aos subtipos dentro do mesmo genótipo foram adicionados números subsequentes. Onze (45,8%) amostras foram incluídas em apenas 5 genótipos (A, B, C, D e E), inclusive as 3 produtoras de MBL, detectadas pelo PCR, que pertenceram ao clone A, descrito como prevalente em vários hospitais brasileiros.

O genótipo B foi representado por duas amostras idênticas (recuperadas do mesmo paciente, uma associada à colonização e outra a infecção), enquanto os genótipos C, D e E apresentaram duas amostras cada um, com similaridades maiores que 90%, sendo que em

relação ao genótipo D, como o B, as duas amostras corresponderam à colonização e infecção do mesmo paciente.

As amostras correspondentes ao surto (2003) foram distribuídas nos genótipos C(C₁) e F.

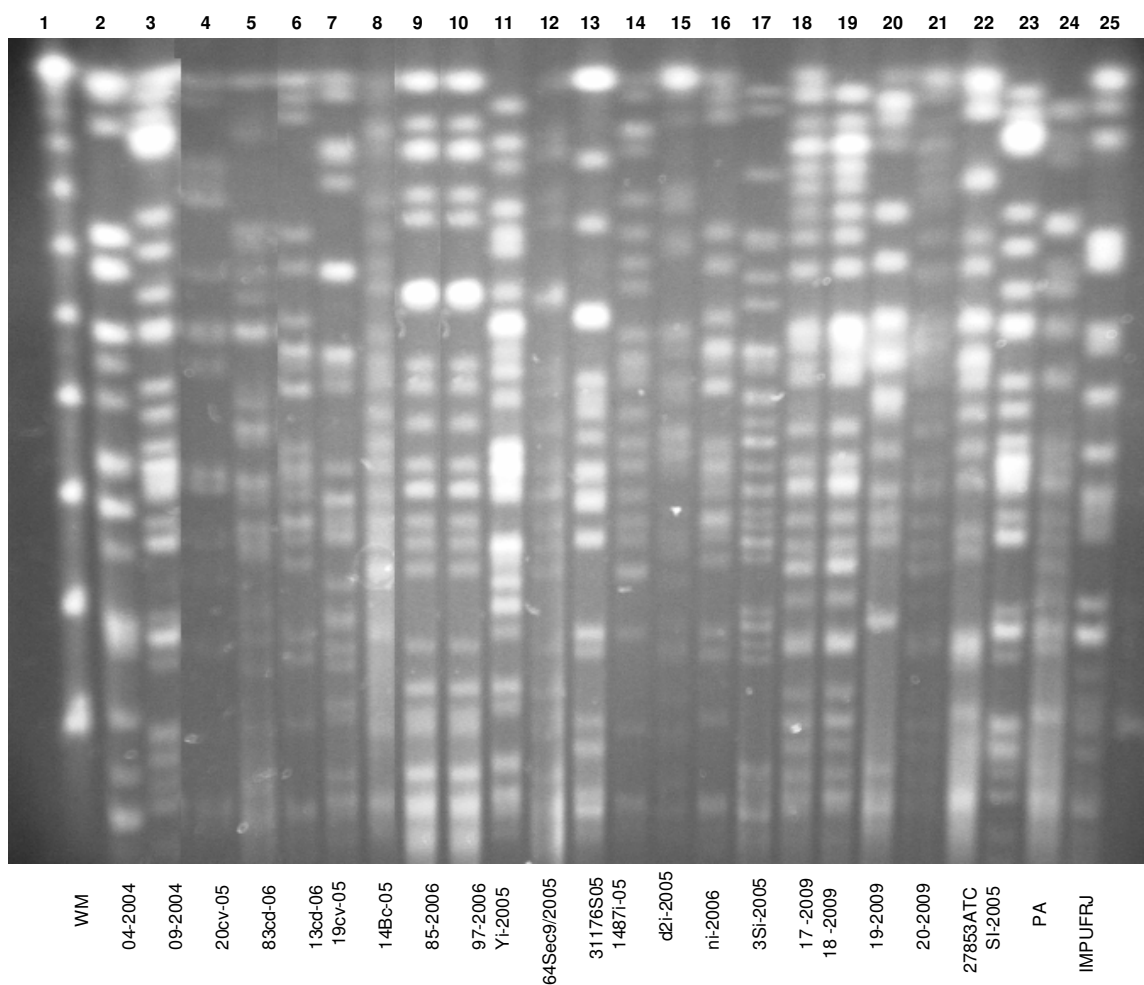


Figura 3. Perfil de macrorestrição do DNA de *P.aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas de pacientes com PAV internados na UTI de adultos do HC-UFU. Linha 1, marcador de tamanho molecular, linhas 9, 10 e 12 : clone A (amostras: 85-2006, 97-2006 e 64Sec9/2005) – MBL positivas, linhas 6 e 16: clone B (amostras: 13cd-06 e ni-2006).

List: Noname

Entries: 24

Correlation: Bands, Dice (Tol 1.0%, Opt 0%, Min area 0.0%)

Zones: [1-400]

Clustering: UPGMA

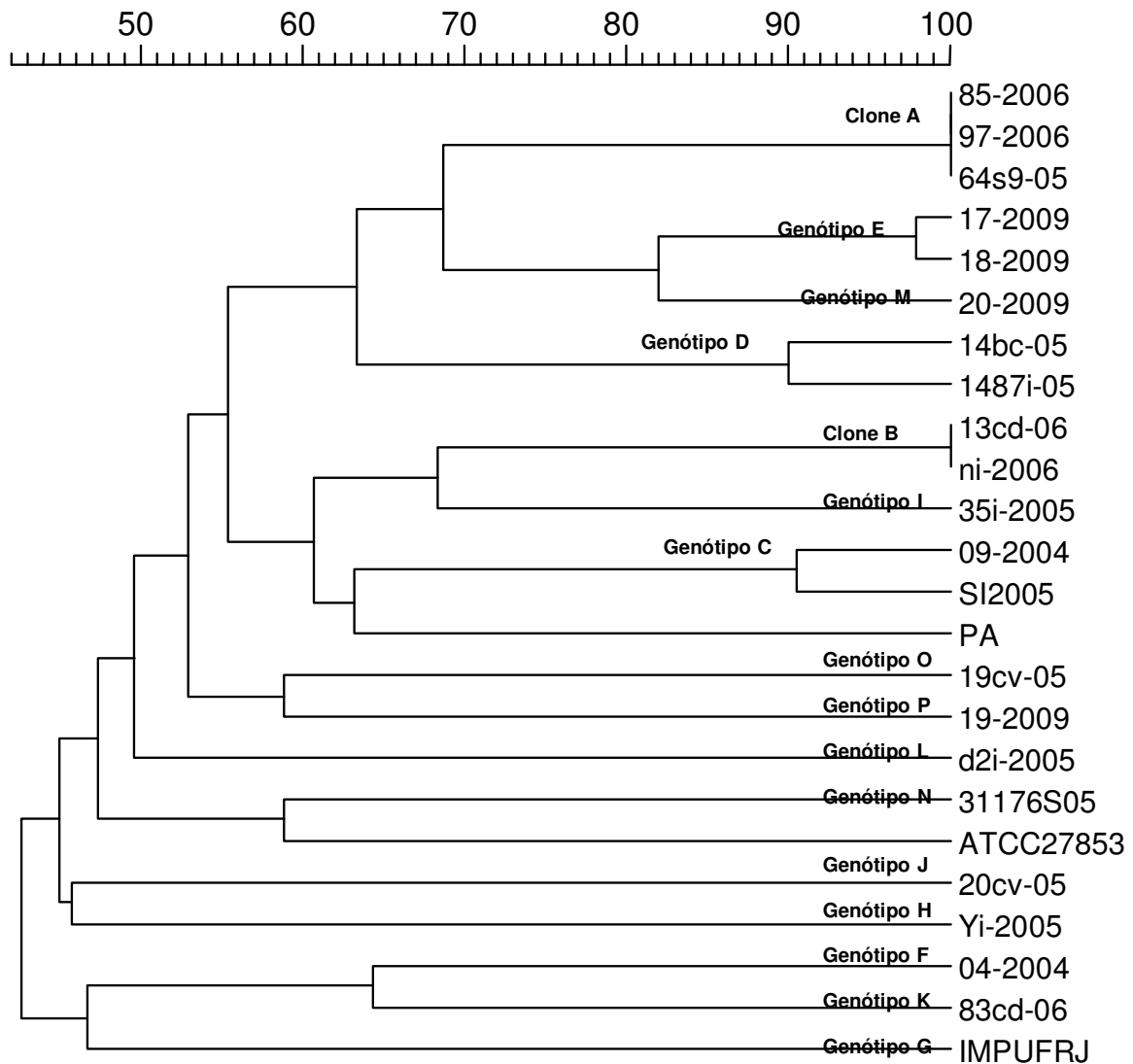


Figura 4. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais do DNA de *P.aeruginosa* em PFGE.

7 - CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE *P.aeruginosa* MBL POSITIVAS PELO PCR

Foram observadas as mesmas características entre duas das três amostras MBL positivas para os genes bla_{SPM}, inclusive uma relação temporal (Figura 5).

Tabela 5 - Características das três amostras de *P.aeruginosa* produtoras de MBL que apresentaram detecção do gene bla_{SPM-1} pelo PCR.

Identificação da amostra	Data do isolamento	Unidade Clínica	Perfil de resistência									AmpC induzida	Perfil PFGE
			AZT	CFO	CAZ	CPM	CIP	GEN	IMP	PPT	POL		
85	21/10/2006	UTI	S	R	R	R	R	R	R	R	S	negativa	A
97	30/10/2006	UTI	S	R	R	R	R	R	R	R	S	negativa	A
64S-S9	07/11/2005	UTI	R	R	R	S	R	R	R	R	S	negativa	A

As PAVs são as infecções hospitalares mais frequentes em UTIs de adultos (DWIVEDI et al., 2010; GARCIN et al., 2010), com taxas de incidência variáveis, de 10 a 52 / 1.000 dias de ventilação conforme dados de vigilância em 55 UTIs de oito países em desenvolvimento (“*International Nosocomial Control Consortium*” - (INICC, 2006). Neste estudo, a taxa de incidência de PAV relacionada à prótese ventilatória foi de 22,1/1.000 dias de ventilação, muito superior à de 4 a 14/1.000 dias de ventilação da casuística “*NNISS*” (2004) nos EUA, mas similar à taxa média (24,1/1.000 dias de ventilação) de países latino americanos (ROSENTHAL et al., 2006).

Pseudomonas aeruginosa é o principal agente etiológico de pneumonias hospitalares, incluindo PAVs em UTIs de hospitais em países desenvolvidos (FAGON et al., 1989; RELLO et al., 2006) e em desenvolvimento (ANDRADE et al., 2003; SADER et al., 2001), incluindo o Brasil (CEZÁRIO et al., 2009; GUIMARÃES, ROCCO, 2006; ROCHA et al., 2008; SADER et al., 2001; ZAVASCKI et al., 2006a). Isto foi confirmado em nossa investigação, quando este microorganismo respondeu por 45% do total das PAVs estudadas (RODRIGUES, CEZÁRIO, GONTIJO FILHO, 2009).

As PAVs por *P.aeruginosa* são graves com freqüências de mortalidades hospitalar e atribuída da ordem de 20% - 45% e 18,5%, respectivamente (AYBAR, TOPELI, 2008; MCCLURE et al., 2009; ROSENTHAL et al., 2006; VALLÉS et al., 2007). Apresentam tratamento difícil (KERR, SNELLING, 2009), considerando que a antibioticoterapia destas infecções é usualmente empírica (GARCIN et al., 2010) e o microorganismo apresenta resistência intrínseca à maioria dos antimicrobianos (KONEMAN et al., 2001; SOLH, ALHAJHUSAIN, 2009) e pode adquirir resistência à muitos dos antibióticos

pseudomonicidas (KERR, SNELLING, 2009). Em nossa investigação foi encontrada uma taxa de mortalidade hospitalar (37,6%) em pacientes com PAV por *P.aeruginosa* semelhante à relatada por outros estudos no Brasil (ZAVASCKI et al., 2006a) e no Chile (RUIZ et al., 2007), quando de condições endêmicas. Em situações epidêmicas, tem sido observadas taxas de mortalidade hospitalar geralmente mais altas (70%), como relatado no Brasil por Cezário e colaboradores (2009).

Atualmente, amostras emergentes resistentes ao imipenem, multiresistentes, com resistência concomitante à cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), piperacilina com tazobactam e fluorquinolonas representam um desafio no tratamento e controle destas infecções em UTIs (DESPANDE, FRITSCHÉ, JONES, 2004; GOOSSENS, 2003; KERR, SNELLING, 2009). Segundo dados do “NNISS” (2004), a frequência deste fenótipo em UTIs nos EUA foi de 21,1%, no período de janeiro a dezembro de 2003, com aumento de 15% de resistência ao imipenem quando comparado com o período de 1998 a 2002.

Em estudo multicêntrico realizado na Europa, incluindo 23 países (“*European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*”), a taxa de prevalência de resistência ao imipenem variou de 9% a 50,5%, dependendo do país (SOULI, GALANI, GIAMARELLOU, 2008). Esta resistência está frequentemente associada à multiresistência, limitando as opções terapêuticas, exigindo a prescrição de antibióticos como a colistina, que possui toxicidade renal (KERR, SNELLING, 2009).

No Brasil, a frequência de resistência de *P.aeruginosa* ao imipenem tem variado na última década de 30 a 61% em muitos hospitais (KOKIS et al., 2004; ROCHA et al., 2008; SADER et al., 2005a; ZAVASCKI et al., 2006a). Em nossa investigação, estes dados foram confirmados, com 38,7% das amostras apresentando resistência ao imipenem.

A inativação enzimática de carbapenêmicos pelas metalo- β -lactamases é considerada atualmente o principal mecanismo em termos de importância epidemiológica (KOUDA et al., 2009; NOUÉR et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006b). Amostras de *P.aeruginosa* com resistência aos carbapenêmicos pela produção de MBLs foram detectadas inicialmente no Japão (MALTEZOU, 2009; PELEG et al., 2005) e posteriormente em outros países (MALTEZOU, 2009; QUEENAN, BUSH, 2007; ROSSOLINI, 2005; SACHA et al., 2008; WASH et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006a). A aquisição de genes codificadores destas enzimas confere resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas em nível alto (CMI > 32 mg/L) (LIVERMORE, 2002; NORDMANN, POIREL, 2002). A resistência aos carbapenemas em nível baixo (CMI 8-32 mg/L) está associada como resultado de perda de porinas OprD, expressão contínua de β -lactamases Amp C e superexpressão de bombas de efluxo (LIVERMORE, 2002).

Nesta investigação, investigamos entre os mecanismos de resistência a produção de metalo- β -lactamases e β -lactamases de espectro ampliado Amp C, através de testes fenotípicos e genotípicos, este em relação ao primeiro grupo de enzimas e detectamos 40 amostras (43%) produtoras de MBL e 55 (59,14%) produtoras de AmpC.

Estudos no Canadá, Grécia e Itália revelaram freqüências altas de 46%, 62% e 72%, respectivamente, de amostras de *P.aeruginosa* produtoras de MBL, entre amostras resistentes ao imipenem (GIAKKOUPIS et al., 2003; LAGATOLLA et al., 2004; PITOUT et al., 2005). Dados publicados de hospitais brasileiros mostraram freqüências de 43,9% a 77,8% de produção de metalo- β -lactamases em amostras de *P.aeruginosa* resistentes ao imipenem (CEZÁRIO et al., 2009; FIGUEIREDO-MENDES et al., 2005; TOLEMAN et al., 2005). Em nossa investigação foi detectada uma freqüência elevada (80,5%) de produção de MBL entre as amostras resistentes ao imipenem.

A suposição é de que a disseminação de genes de MBL é influenciada pelo consumo local de cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenemas (LOMBARDI et al., 2002; MALTEZOU, 2009; PATZER et al., 2004). Isto ocorre em nossa UTI, onde o consumo de cefalosporinas de 3^a/4^a geração, assim como o de carbapenemas são mais altos do que ocorre em UTIs nos EUA e Europa (MOREIRA et al., 2008).

Os fatores predisponentes associados ao desenvolvimento de PAVs por *P.aeruginosa* multiresistente incluem o uso prévio de antibióticos, hospitalização prévia, gravidade da doença de base, hospitalização prolongada, VM por mais que sete dias, cirurgia e imunossupressão (CAO et al., 2004; GALES et al., 2003; NOUÉR et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006b). Também o uso de alguns antibióticos como fluorquinolonas (NOUÉR et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006b), cefepime (NOUÉR et al., 2005), antibióticos anaerobicidas (SOUZA et al., 2008) e carbapenemas (ZAVASCKI, CRUZ, GOLDANI, 2005) foram fatores de risco independentes para infecção nosocomial por *P.aeruginosa* multiresistente.

Estudos epidemiológicos considerando amostras de *P.aeruginosa* multiresistente produtoras de MBL associam estas infecções à comorbidades, cirurgia, admissão em UTIs, tempo de hospitalização, quimioterapia, corticóides, cateteres urinários, uso de antibióticos e colonização prévia do trato respiratório (CORNAGLIA et al., 2000; HIRAKATA et al., 2003; HORIANOPOULOU, 2006; PATZER et al., 2004).

No presente estudo, gravidade clínica (escore ASIS), diagnóstico clínico na admissão, hospitalização prévia, estadia prolongada na UTI, uso prolongado de VM, uso de carbapenemas, fluorquinolonas e de três ou mais antibióticos foram fatores de risco para desenvolvimento de PAV por *P.aeruginosa* produtora de MBL na análise univariada. Estes

resultados foram concordantes com os observados em outros estudos, incluindo brasileiros (CEZÁRIO et al., 2009; NOUÉR et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006b) e de outros países (HIRAKATA et al., 2003; HORIANOPOULOU et al., 2006).

A análise de regressão logística apontou que os pacientes internados em nossa UTI com PAV por *P.aeruginosa* produtora de MBL estavam mais comumente expostos à hospitalização prévia e à um tempo prolongado de uso de VM, como relatado em estudos anteriores com fatores de risco para *P.aeruginosa* multiresistente (CAO et al., 2004; FURTADO et al., 2009; GARCIN et al., 2009; HORIANOPOULOU et al., 2006; ORTEGA, GROENEVELD, SCHULTSZ, 2004).

Um histórico médico de reinternações e/ou transferências intra e inter-hospitalares é um fator importante para seleção de pacientes de alto risco, com doenças de base graves, que são potenciais carreadores de bactérias de difícil tratamento entre as quais *P.aeruginosa* (GARCIN et al., 2010). Esta sugestão justificou o fato da hospitalização prévia ter sido apontada como fator de risco independente de PAV por *P.aeruginosa* produtora de MBL, no nosso estudo.

As UTIs são consideradas o epicentro da resistência bacteriana, sendo a principal fonte de bactérias multiresistentes (BERGMANS, 1998). Dentre os fatores contribuintes, destacam-se o consumo abusivo de antimicrobianos, além do uso de dispositivos invasivos acrescido à maior susceptibilidade dos pacientes às infecções (ALOUSH et al., 2006; BERGMANS, 1998; TEIXEIRA et al., 2004). Os pacientes hospitalizados na UTI, sob uso de VM por tempo prolongado, estão mais expostos à colonização por patógenos nosocomiais multiresistentes, como os produtores de MBL, com subsequente desenvolvimento de infecções por estes microorganismos (HORIANOPOULOU et al., 2006; RELLO et al., 2006). Nossos resultados indicaram além de hospitalização prévia, o

uso de VM por tempo prolongado como fator independente ao desenvolvimento de PAV por *P.aeruginosa* produtora de MBL, confirmando que o uso destes dispositivos pode aumentar o risco de PAV por *P.aeruginosa* produtora de MBL.

A pressão seletiva gerada pelo uso de antibióticos, especialmente β -lactâmicos como ceftazidima e imipenem, é um fator de risco importante para infecções por *P.aeruginosa* resistentes, criando um ambiente favorável e selecionando clones resistentes (NOUER et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006b). Os dados obtidos neste estudo, não apontaram o uso de antibióticos como fluorquinolonas e β -lactâmicos como fatores de risco independentes, na análise multivariada, para PAV por *P.aeruginosa* produtora de MBL, conforme relatado anteriormente (NOUER et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2006b), embora mostrassem significância quando da análise univariada.

Infecções causadas por microorganismos multiresistentes resultam em taxas mais elevadas de mortalidade devido à limitação da antibioticoterapia adequada no tratamento de infecções graves em UTIs, como PAVs por *P.aeruginosa* produtora de MBL (HIRAKATA et al., 2003; LAUPLAND et al., 2005; RAMPHAL, 2005). Isto foi ratificado em nossa pesquisa, com uma taxa de mortalidade hospitalar de 55% no grupo de pacientes com PAV por *P.aeruginosa* MBL positivas vs. 24,5% entre os pacientes com PAV por *P.aeruginosa* MBL negativas, ($p < 0,05$) nas análises uni e multivariada. Similarmente às taxas de 57,1% e 29,6%, encontradas por Zavascki e colaboradores (2006a) em dois hospitais de ensino no Sul do país, comparando pacientes com pneumonia hospitalar por *P.aeruginosa* produtora de MBL e aqueles com pneumonia por *P.aeruginosa* não-produtora desta enzima, respectivamente.

Embora o teste de sinergismo com duplo-disco, utilizado neste estudo, seja considerado o mais sensível na detecção de MBLs (YAN et al., 2004) e tenha demonstrado

ser de fácil execução, a subjetividade quando de sua interpretação é uma desvantagem do teste (PICÃO et al., 2008; YAN et al., 2004).

A interpretação dos resultados de nossos testes gerou algumas dúvidas. Picão e colaboradores (2008) relataram que dependendo da concentração utilizada de inibidores de MBL, pode haver inibição do crescimento bacteriano (expansão do halo de inibição de crescimento), decorrente da atividade bactericida do inibidor e não pela produção de MBL. Bastos (2006) relatou a mesma dificuldade na interpretação dos testes fenotípicos realizados.

A correlação baixa (18,5%) encontrada em nosso estudo entre os testes fenotípicos e genotípicos para detecção de MBL pode ser explicada, pelo menos em parte, pela possibilidade da presença de enzimas ainda não caracterizadas em nosso hospital, pela interferência dos inibidores de MBL ou outros mecanismos associados. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Barroso e colaboradores (2008) e Martins e colaboradores (2007) que evidenciaram ausência de detecção de genes relacionados à produção de MBL em 100% e em 30,3%, respectivamente, das amostras de *P.aeruginosa* do fenótipo MBL positivas testadas.

Sader e colaboradores (2005a) detectaram a presença de MBL através do teste de disco-aproximação, em 54 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao meropenem, imipenem e ceftazidima, isoladas na América Latina, porém, somente 25 (46,3%) das amostras de *P. aeruginosa* apresentaram genes codificadores de MBLs. Da mesma forma, Marra e colaboradores (2006) caracterizaram genotipicamente apenas sete (30,4%) das 23 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL isoladas de pacientes internados em um hospital universitário em São Paulo.

No Brasil, como referido anteriormente, foram relatadas amostras de *P.aeruginosa* produtoras de MBL do tipo SPM-1, IMP-1 e VIM-2 (MARTINS et al., 2007; SADER et al., 2005a; SADER et al., 2005b), com a SPM-1 disseminada em hospitais de diferentes regiões brasileiras (GALES et al., 2003), apresentando maior frequência e restrição ao Brasil (CEZÁRIO et al., 2009; GALES et al., 2003; SADER et al., 2005b). Em nossa investigação, não detectamos pela técnica do PCR, as MBLs do tipo VIM-2 e IMP-1, mas o gene bla_{SPM-1} foi encontrado em 18,7% das amostras testadas, similarmente aos resultados encontrados (26,7%) para a MBL do tipo SPM-1 por Cezário e colaboradores (2009) na mesma UTI deste estudo.

A análise molecular de nossas amostras de *P.aeruginosa* detectou que as três amostras produtoras de MBLs do tipo bla_{SPM-1} pertenceram ao clone A (12,5%), relatado como o circulante em hospitais de diferentes regiões no país (CEZÁRIO et al. 2009; GALES et al., 2003; KOKIS et al., 2005; ZAVASCKI et al., 2005). Observou-se uma relação temporal, além de outras características, entre dois destes pacientes, evidenciando uma possível transmissão horizontal entre eles.

No entanto, a natureza endêmica dos episódios de PAV por *P.aeruginosa* no nosso estudo, evidenciou um maior número de clones, como reportado na literatura (ABOUFAYCAL et al., 2007; ORTEGA, GROENEVELD, SCHULTSZ, 2004) quando comparado a estudos de surtos (CIPRIANO et al., 2007; GALES et al., 2004; ZAVASCKI et al., 2005), incluindo o descrito por Cezário e colaboradores (2009). As duas amostras de *P.aeruginosa* do fenótipo MBL (genótipo C₁ e F), correspondentes ao surto referido (CEZÁRIO et al. 2009), não apresentaram similaridade clonal com as MBL positivas recuperadas durante nossa investigação (clone A).

A colonização prévia da mucosa de orofaringe como fator de risco para PAVs por *P.aeruginosa* foi confirmada em dois pacientes nos quais esta relação foi investigada através do PFGE, achados similares já foram descritos (HORIANOPOULOU et al., 2006; ORTEGA, GROENEVELD, SCHULTSZ, 2004).

A emergência de microorganismos multiresistentes no ambiente hospitalar resulta do uso abusivo e pouco judicioso de antibióticos, situação agravada pela deficiência de práticas de prevenção e controle de infecções, particularmente em UTIs (MACGOWAN, METCHOCK, 1995; PATERSON, 2002), onde há usualmente uma densidade alta de prescrição destes fármacos (HARRIS et al., 2002; PATERSON, 2002).

A transmissão de infecções por microorganismos multiresistentes quando de uma predominância clonal, caracteriza disseminação horizontal, sobretudo pelas mãos dos profissionais de saúde, enquanto que a presença de vários clones evidencia uma política inadequada de uso de antibióticos, sobretudo quando em condições endêmicas (ORTEGA, GROENEVELD, SCHULTSZ, 2004; PATERSON, 2002; WIDMER et al., 1993). Na unidade em que foi realizada nossa investigação, os dois componentes epidemiológicos estão presentes, ou seja, adesão baixa à higienização das mãos (BORGES, ROCHA, GONTIJO FILHO, 2006) e uso abusivo de antibióticos potentes como cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e carbapenêmicos (MOREIRA, 2008), mas os resultados obtidos apontam que maioria dos casos de PAV por amostras de PA-MBL não resultou de uma transmissão horizontal, e sugerem que a pressão ecológica do uso de antibióticos foi o principal responsável.

VII-CONCLUSÕES

- A incidência de PAVs por *P.aeruginosa* foi de 45% do total de PAVs desenvolvidas durante o período do estudo;
- Os pacientes com PAV por *P.aeruginosa* MBL positiva apresentaram tempo prolongado de ventilação mecânica e hospitalização prévia como fatores de risco independentes para o desenvolvimento destas infecções;
- A taxa de mortalidade hospitalar apresentou-se mais elevada nos pacientes com PAV por *P.aeruginosa* MBL positiva;
- De um total de 93 amostras de *P.aeruginosa* recuperadas dos casos de PAVs, 40 (43%) foram identificadas como produtoras de MBL pelo teste fenotípico de sinergismo com duplo-disco e 59,14 % expressaram β -lactamases AmpC;
- A resistência tanto aos agentes β -lactâmicos quanto não- β -lactâmicos foi significativamente maior nas amostras de PA-MBL positivas;
- 38,7% das amostras apresentaram resistência ao imipenem, destas, 80,5% foram produtoras de MBL;
- 35,5% das amostras apresentaram fenótipo de multiresistência, sendo todas pertencentes ao fenótipo MBL (33/40 - 82,5%);
- Foi observada uma policlonalidade das amostras de *P.aeruginosa* resistentes ao imipenem, sugerindo resultar da força pressora do uso abusivo de antibióticos potentes na Unidade;
- A detecção na nossa Unidade de MBLs do tipo SPM-1, que é a mais freqüente no país, pertencentes ao clone A, o prevalente em hospitais de diferentes regiões brasileiras, com evidências de transmissão horizontal entre eles, representa uma grave ameaça aos pacientes, pois confirma uma disseminação inter-hospitalar a âmbito nacional e intra-

hospitalar, reflexo de falhas nos programas de controle e prevenção de infecções, o que exige medidas mais efetivas com ênfase na racionalidade do uso de antibióticos e lavagem de mãos.

VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUFAYCAL, H. bla VIM 2 and bla VIM7 Carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in a tertiary care medical center in the United States: report from the MYSTIC program. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.2, p.614-615, 2007.

ALP, E. et al. Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in Intensive Care Units. **Annals Clinical Microbiology Antimicrobials**, London, v.3, n.17, 2004.

AYBAR, M.T.; TOPELI, A.I. Ventilator-associated pneumonia caused by high risk microorganisms: A matched case-control study. **Tuberkuloz ve Toraks Dergisi**, v.56, n.2, p.139-149, 2008.

AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 2.0: statistics applications in the biomedical sciences**. Belen: Society Mamirauá civil, Brasília: CNPq, 2000.

ALLOUSH, V. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v.50, n. 1, p. 43-48, 2006.

ANDRADE, S.S. et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centers: a 5 years report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.52, p.140-141, 2003.

ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.1, p. 40-43, 2000.

BASSETTI, M. et al. Efficacy of the combination of levofloxacin plu ceftazidime in the treatment of hospital-acquired pneumonia in the intensive care unit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v.28, p.582-585, 2006.

BASTOS, C. C. R. **Caracterização fenotípica, molecular e epidemiológica de amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas em um hospital geral na cidade do Rio de Janeiro.** 2006. 91p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

BERGMANS, D. C.J. J.; BONTEN, M. J. M. Nosocomial Pneumonia. In: MAYHALL, C. G. (Ed.). **Hospital Epidemiology and Infection Control.** 3th Ed. Philadelphia: LLippincott, Willians e Wilkins, 2004, Cap. 22, p. 311-330.

BERGMANS, D. Cross-colonization with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit . **Thorax**, v.53, p.1053-1058, 1998.

BENNETT, P. M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.43, p.1-4, 1999.

BERTHELOT, P. et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 27, p.503-512, 2001.

BHAT, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the Intensive Care Unit: can the adequacy of empirical beta-lactam antibiotic therapy be improved? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v.30, p.458-462, 2007.

BORGES, L.F.A.; ROCHA, L.A.; GONTIJO FILHO, P.P. Adesão à prática de higienização das mãos e sua associação às taxas de infecção hospitalar em um hospital

universitário mineiro. In: **Anais do 2º Congresso Mineiro de Infectologia, Uberlândia**, 2006.

CAO, B. et al. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Hospital Infection**, London, v.57, p.112-118, 2004.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, p.4654–4661, 2004.

CEZÁRIO, R.C. et al. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in na adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v.27, n.5, p.269-274, 2009.

CIPRIANO, R. et al. Coexistence of epidemic colistin-onlu-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the bla_{SPM} clone, spread in Hospitals in a Brazilian Amazon city. **Microbial Drug Resistance**, United States, v.13, p.142-146, 2007.

CHASTRE, J. Conference Sumary: Ventilator-associated Pneumonia. **Respiratory Care**, Philadelphia, v.50, n.7, p.975-983, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18, 28(1), 2008.

COLLIS, C.M. et al. Integron encoded Intl integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. **Molecular Microbiology**, v.46, p.1415–1427, 2002.

COMBES, A. et al. Impact of piperacillin resistance on the outcome of pseudomonas ventilator-associated pneumonia. **Intensive Care Medicine**, Berlin,v.32, p.1970-1978, 2006.

CORNAGLIA, G. et al. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- β -lactamase. **Clinical of Infectious Diseases**, Chicago,v.31, p.1119–25, 2000.

CORNAGLIA, G.M. et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in gram-negative pathogens: open issues. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 29, p.380–388, 2007.

Copyright Statsoft, Inc. 1993. *Statistica for Windows 4.5*.

DEAN, A. G. *et al.* Epi Info, Versão 5.0: **A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Stone Mountain, GA: USD, Ins; 2000.

DEFEZ, C. et al. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.57, p.2009-216, 2004.

DESPANDE, L. M., FRISTCE, T. R., JONES, R. N. Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: a global report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, United States, v. 49, N.4, p.231-236, 2004.

DIAZ, E. et al. Management of Ventilator-associated pneumonia. **Infectious Diseases Clinical of North American**, United States, v.23, p.521-533, 2009.

DILLON, B. et al. Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. **Journal of Microbiological Methods**, United States, v. 62, p. 221-232, 2005.

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

DWIVEDI, M. et al. Ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* carrying multiple metallo-beta-lactamase genes. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, India, v.52, n.3, p.339-342, 2010.

FAGON, J.Y. et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation: Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v.139, p.877-884, 1989.

FIGUEIREDO-MENDES et al. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, Espanha, v.23, n.7, p.402-405, 2005.

FLAHERTY, J. P., STOSOR, V. Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In: MAYHALL, C. G. (Ed.). **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 3th Ed. Philadelphia: Lippincott, Williams e Wilkins, 2004.

FONSECA, E. L., et al.. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.44, n.3, p. 303-309, 2005.

FURTADO, G.H.C. et al. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v.30, p.315-319, 2007.

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

GALES, A.C. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. São Paulo, v.8, n.4, p.267-271, 2004.

GARCIN, F., et al. C .Non-adherence to guidelines: an avoidable cause of failure of empirical antimicrobial therapy in the presence of difficult-to-treat bacteria. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v.36, n.1, p.75-82, Jan, 2010.

GIANTSOU, E. et al. Both early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia are caused mainly by potentially multiresistant bacteria. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 31, p. 1488-1494, 2005.

GIAKKOUPI, P. et al. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, p.3893-3896, 2003.

GISKE, C.G. et al. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.52, n.3, p.813-821, Mar, 2008.

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

FURTADO, G.H.C. et al. Imipenem –resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: Risk factors and mortality. **Journal of Critical Care**, Orlando, v.24, p.625.e9-625e.14, 2009.

GUIMARÃES, M.M.; ROCCO, J.R. Prevalence of ventilator-associated pneumonia in a university hospital and prognosis for the patients affected. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n.4, p.339-46, Jul-Aug, 2006.

HELFAND, M. S., BONOMO, R. A. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases on the treatment of resistant gram-negative pathogens. **Current Opinion in Pharmacology**, London, v. 5, p. 452-458, 2005.

HIRAKATA, Y. *et al.* Clinical and Bacteriological Characteristics of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.37, p.26-32, 2003.

HORIANOPOULOU, M. *et al.* Frequency and predictors of colonization of the respiratory tract by VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* in patients of a newly established intensive care unit. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.55, p. 1435-39, 2006.

HUGONNET, S., UÇKAY, L., PITTET, D. Staffing level: a determinant of late-onset ventilator-associated pneumonia. **Critical Care**, London, v.11, n.4, 2007.

JESUDASON, M. V., KANDATHIL, ^a J., BALAJI, V. Comparison of two methods to detect carbapenemase e Metallo- β -lactamases production in clinical isolates. **The Indian Journal of Medical Research**, India, v. 121, p. 780-783, 2005.

JOURDAIN, B. *et al.* Role of quantitative cultures of endotracheal aspirates in the diagnosis of nosocomial pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 152 , p. 241 – 246 , 1995.

KERR, K.G., SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.73, p.338-344, 2009.

KIENINGER, A.N., LIPSETT, P.A. Hospital –Acquired Pneumonia: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **The Surgical Clinics of North America**, v. 89, p. 439–461, 2009.

KIM, I.S. et al. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo- β -lactamase producers in a Korean hospital. **Microbial Drug Resistance**, United States, v. 11, p. 355–359, 2005.

KIM, S.Y. et al. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo- β -lactamases in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.9, p.2798-2801, 2007.

KOKIS, V.M. et al. Identification of a imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone among patients in a hospital in Rio de Janeiro. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.60, p.19-26, 2005.

KOLLEF, M. H. What is Ventilator-associated Pneumonia and Why is it important? **Respiratory Care**, v.50, n.6, p.714-721, 2005.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHECKENBERGER, P. C., WINN, Jr., W. C. **Diagnosis Microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

KOUDA, S. et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the bla_{IMP-1} in Hiroshima. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.64, p.46-51, 2009.

KWA, A.L.H. et al. The impact of multidrug resistance on the outcomes of critically ill patients with Gram-negative bacterial pneumonia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, United States, v.58, p.99-104, 2007.

LAGATOLLA, C. et al. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- β -lactamase determinants in European hospital. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v.10, p.535–538, 2004.

LAUPLAND, K.B. et al. Population-Based Epidemiological study of Infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Importance of Metallo- β -lactamase (MBL) – Producing Strains. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, n.9, p.1606-1612, 2005

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 43, p.1584–1590, 1999.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v. 7, p. 88-91, 2001.

LEE K, YUM KH, YONG D, LEE HM, KIM HD, DOCQUIER JD, et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.49, p.4485–91, 2005.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.34, p.634-640, 2002.

LOLANS, K. et al.. First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo-lactamase (VIM-2) in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, p.3538–3540, 2005.

LOURENÇO, E.F. et al. Detection of New *arr-4* and *arr-5* gene Cassettes in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, May, p.1865-1867, 2008.

LUNA, C.M. et al. Experimental Severe *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia and Antibiotic Therapy in Piglets receiving Mechanical Ventilation. **Chest**, v.132, n.2, p.523-531, 2007.

MACGOWAN, J.E.; METCHOCK, B. Infection Central Epidemiology and clinical microbiology. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**, P.C.: ASM Oress, Washington, 1995, p.182-189.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 Ed., São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004.

MALTEZOU, H. Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v.33, p. 405e1-405e7, 2009.

MARTINS, A.F. et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- β -lactamases in hospitals from Southern Brazil. **Infection**, Munchen, v.35, n.6, p.457-460, 2007.

MARCHIARO, P. et al. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p.5648–5652, 2005.

MARRA, A. R. et al. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.50, n.1, p. 388-390, 2006.

MASTERTON, R.G., TURNER, P.J. Trends in antimicrobial susceptibility in UK centers: the MYSTIC Programme (1997- 2002). **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v.27, n.1, p.69-72, Jan, 2006.

MCCLURE, J.R. et al. Outcome of late-onset hospital-acquired pneumonia related to causative organism. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.71, p.348-352, 2009.

MESAROS, N.et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v.13, n.6. p.560-578, 2007.

MIMA, T. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa* et al. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 49, n. 11, p. 999-1002, 2005.

MOREIRA, M.R. Consumo de antibióticos, fatores de risco e evolução de pneumonia associada à ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* sensível ou resistente à oxacilina em pacientes internados na unidade de terapia intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro. 2008. **(Dissertação)** Mestrado em Imunologia e Parasitologia aplicadas-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p.51.

“*NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE*” (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v.32, p.470-485, 2004.

NIEDERMAN, M. S. The clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, Philadelphia, v. 50, n. 6, 2005.

NOUÉR, S.A. *et al.* Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM Metallo- β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.49, p. 3663-7, 2005.

NSEIR, S. *et al.* Impact of antifungal treatment on *Candida-Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case-control study. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v.33, n.1, p.137-142, Jan, 2006.

NSEIR, S. *et al.* Antimicrobial treatment for ventilator-associated tracheobronchitis: randomized, controlled, multicenter study. **Critical Care**, London, v.12, n.3, 2008.

NORDMEN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v.8, p.321-331, 2002.

OLIVER, A. Impact of dissemination of metallo-beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: present and future. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, Espanha, v.27, n.5, p.255-256, 2009.

ORTEGA, B.; GROENEVELD, J.; SCHULTSZ, C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v.25, n. 10, p.825-831, 2004.

PACHECO-FOWLER, V. *et al.* Antiseptic impregnated endotracheal tubes for the prevention of bacterial colonization. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v. 57, n. 2, p. 170-174, 2004.

PARK, D. R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, Philadelphia, v.50, n. 6, 2005.

PARKER, C.M. et al. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence, incidence, risk factors, and outcomes. **Journal of Critical Care**, Orlando v.23, p.18-26, 2008.

PARTRIDGE, S. R.; HALL, R. M. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.185, p.6371–6384, 2003.

PATERSON, D.I. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: a 21st-century approach. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.34, p.1564-1567, 2002.

PATZER, J.A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*VIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.53, p. 451–456, 2004.

PATZER, J.A. et al. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998–2006. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.63, p.269-273, 2009.

PELEG, A.Y. et al. Dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{imp-4} among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.41, p.1549-1556, 2005.

PELLEGRINO, F.L.P.C. et al. Occurrence of a Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 7, p. 2420-2424, 2002.

PICÃO, R.C. et al. Metallo β lactamase detection: Comparative Evaluation of Double Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM- producing Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.46, n.6, p.2028-2037, June, 2008.

PITOUT, J.D.D. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, p. 3129–35, 2005.

POIREL, L.M. et al. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, p.1406–1409, 2004.

QU, T. et al. Evaluation of Phenotypic Tests for Detection of Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains in China. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.47, n. 4, p. 1136–1142, Apr, 2009.

QUEENAN, A. M., BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.20, n.3, p.440-458, July, 2007.

RAMPHAL R. Importance of adequate initial antimicrobial therapy. **Chemotherapy**, Basel, v.51, p. 171-176, 2005.

RELLO, J. et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. **Chest**, Chicago, v.122, n.6, p.2115-2121, 2002.

RELLO, J. et al. Risk factors for ventilator-associated pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* in presence of recent antibiotic exposure. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.105, n.1, p.709-714, 2006.

ROCHA, L.D. et al. Ventilator-Associated Pneumonia in an Adult Clinical-Surgical Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital: Incidence, Risk factors, Etiology, and Antibiotic Resistance. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, São Paulo, v.12, n.1, p. 80-85, 2008.

RODRIGUES, D.O; CEZÁRIO, R.C.; GONTIJO FILHO, P.P. Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) caused by Multidrug-Resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* vs. other microorganisms at an Adult Clinical-Surgical Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital: Risk factors and outcomes. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v.1, n. 10, p.432-437, 2009.

ROSENTHAL, V.D. et al. Device-associated nosocomial infection in 55 intensive care units, in 8 developing countries. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.45, n.8, p.582-591, 2006.

ROSSOLINI, G. M. Acquired Metallo- β -lactamases: An Increasing Clinical Threat. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, p. 1557-1558, 2005.

RUIZ MC, GUERRERO J, ROMERO CP. Etiología de la neumonía asociada a ventilación mecánica em um hospital clínico. Asociación com co-morbilidad, uso prévio de antimicrobianos y mortalidad. **Revista Chilena de Infección**, Chile, v.24, n.2, p.131-136, 2007.

SACHA, P.et al..Metallo- β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*- a novel mechanism resistance to β -lactam antibiotics. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v.46, n.2, p.137-142, 2008.

SADER, H.S. et al. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Netherlands, v. 25, p.57-61, 2005a.

SADER, H.S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, São Paulo, v.5, n.4, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v.11, n. 1, p.73-76, 2005 b.

SADIKOT, R.T. et al. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 171, p.1209-1223, 2005.

SAFDAR, N.; CRNICH, C. J.; MAKI, D. G. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. **Respiratory Care**, Philadelphia, v.50, n.6, p.725-739, 2005.

SENDA, K. et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, 40: 309-353, 1996.

SINGH, S.P. et al. Comparative evaluation of phenotypic tests for identification of metallo β -lactamases producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.129, pp 713-715, June, 2009.

SOARES, M.C.S.T. *Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de Pseudomonas aeruginosa isoladas em Hospitais da cidade de Niterói- RJ*. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Eurosurveillance**, v.13, p.1-11, 2008.

SOUZA, C.R. et al. Clindamycin and metronidazole as independent risk factors for nosocomial acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.69, p. 402-403, 2008.

SOUZA, M.A. et al. Three-year assessment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.2197-2205, 2001.

SOLH, A.A.E.; ALHAJHUSAIN A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.64, n.2, p. 229-38, Aug, 2009.

SPEIJER, H. et al.. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.3654-3656, 1999.

SPENCER, J. et al. Abstract. **43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Chicago, Ill., abstr. C1-568. 2003

STRAUSBAUGH, L.J. Nosocomial Respiratory Infections. In: MANDELL, G. L., BENNE, J. E., DOLLN, R. **Mandell, Dougl's and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6th Ed. V.2, 2005, Cap. 301, p. 3362-3370.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p.2233-2239, 1995.

TEIXEIRA, P.J.Z. et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multiresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v.30, n.6, 2004.

TOLEMAN, M.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 50, p.673–679, 2002.

TOLEMAN, M. A. et al. *bla*VIM-7, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, p.329–332, 2004.

TOLEMAN, M.A. et al. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.55, p.61-70, 2005.

TULLU, M. S., DESHMUKH, C. T., BAVEJA, S. M. Nosocomial pneumonia in Paediatric intensive care unit. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay v.46, p. 18-22, 2000.

VALLÉS, J. et al. Excess ICU mortality attributable to ventilator associated pneumonia: The role of early vs late onset. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 33, p.1363–1368, 2007.

WALSH, T. R., et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.18, p. 306-325, 2005.

WARREN, D. K. et al. Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v.31, n. 5, p. 1312-1317, 2003.

WINDMER, A.F. et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in surgical intensive care unit probable transmission via hands of health care worker. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.16, p.372-376, 1993.

YAN, J.J. et al. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.49, p.5-11, 2004.

YATSUYANAGI, J. S. et al. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene *bla*VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.48, p. 626–628, 2004.

ZAVASCKI AP, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, p.1148–1151, 2005.

ZAVASCKI, A.P.; CRUZ, R.P.; GOLDANI, L.Z. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. **Journal of Hospital Infection**, Atlanta, v.59, p.96-101, 2005.

ZAVASCKI, A.P. et al. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo- β -lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Critical Care**, London, v.10, n.4, p.100-110, 2006a.

ZAVASCKI, A.P. et al. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.58, p.882-885, 2006b.

ZAVASCKI, A.P. et al. High prevalence of metallo- β -lactamases-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.135, p.323-345, 2007.

ZHUO, H. et al. Increased mortality of ventilated patients with endotracheal *Pseudomonas aeruginosa* without clinical signs of infection. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v.36, n.9, 2008.

ZIMERMANN, P.J.T. et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multiresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v.30, n.6, 2004.

ANEXO I

Ficha individual (UTI PEDIATRICA)

1. Identificação:

1.1. Ficha nº: _____ 1.2. Prontuário: _____ 1.3. Leito: _____
 1.4. Nome: _____ 1.5. Idade: ____ 1.6. Sexo: M () F ()

2. Data da internação:

2.1. Hospital: _____ 2.2. Unidade: _____
 2.3. Evolução:
 2.3.1. Alta: _____ 2.3.2. Morte: _____ 2.3.3. Transferência: _____

3. Diagnósticos:

3.1. Doença de base: _____
 3.2. Indicação de UTI: _____
 3.3. Diagnóstico admissão\definitivo: _____
 3.4. Pneumonia: VM (S\N) Febre (>38°C): S\N
 Hipotermia (<36°C): S\N Leucocitose (>15.000): S\N
 3.5. Diagnóstico radiológico: infiltrado: S\N, consolidação: S\N, cavitação: S\N
 3.6. Diagnóstico microbiológico: S\N Contagem: _____ UFC/ml
 Hemocultura positiva: S\N Microrganismo: _____
 Espectro de resistência: _____

3.7. Outras infecções: S\N Sítio anatómico: _____ Natureza: HVC

4. Fatores de risco:

4.1. Internação prévia: S\N
 4.2. Cirurgia: S\N 4.3. Qual: _____
 4.4. Trauma: S\N 4.5. Má-nutrição (albumina): ____ 4.6. Nível de consciência: ____
 4.7. Imunocomprometimento: S\N 4.8. Uso prévio de antibióticos: S\N
 4.9. Quais? _____
 4.10. Dispositivos invasivos: S\N
 4.11. Quais? CVC, SV, PV, Orstomia, Dreno, SNG, Outros _____
 4.12. Ventilação mecânica: S\N Início - _____ Fim - _____

5. Tratamento atual com antibióticos: Quais? _____

6. Colonização por *P. aeruginosa*: (0, semanas, positivo/negativo):

6.1. C0- _____	C1- _____
C2- _____	C3- _____
C4- _____	C5- _____
C6- _____	C7- _____

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho, membro do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HC da UFU e professor titular de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, coordenará uma pesquisa com o objetivo de realizar um estudo sobre os padrões de resistência específicas para infecções graves (sepse e pneumonia) e benignas (infecções do trato urinário) em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos do HC da UFU. Para maiores informações o paciente/responsável pode entrar em contato diretamente com o pesquisador através do fone: 3218-2236 ou com o Comitê de Ética no telefone: 3218-4131.

Se eu ou meu responsável concordar em participar deste estudo:

Autorizo que os dados demográficos e clínicos que estão associados à colonização/infecção por este microorganismo sejam coletados a partir de meu prontuário, assim como a coleta de espécimes clínicos: sangue, lavado ou secreção traqueal e urina, utilizando procedimentos de rotina pelo hospital de modo que não acarretará problemas locais ou gerais para os pacientes.

Tenho plena consciência e total liberdade para me informar quanto ao resultado da pesquisa, bem como desistir a qualquer momento do projeto o qual estou envolvido. Os dados serão discutidos com outros pesquisadores, mas sem que em nenhum momento haja perda da minha privacidade.

Assinatura: _____

Assinatura do responsável: _____

Data: ___ / ___ / ____

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho
Coordenador da pesquisa
Tel.: 3218-2236

ANEXOIII



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 215/06

Registro CEP: 016/06

Projeto Pesquisa: "Pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) por Pseudomonas aeruginosa em Unidades de Terapia Intensiva de adultos (UTI) de um Hospital Mineiro: mecanismos de resistência e epidemiologia microbológica e clínica"

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

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

Situação: Projeto aprovado.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

Data para entrega do 1º Relatório Parcial: abril/2007

Data para entrega do 2º Relatório Parcial: dezembro/2007

Data para entrega do 3º Relatório Parcial: setembro/2008

Data para entrega do Relatório Final: janeiro/2009

Uberlândia, 08 de agosto de 2006.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.1) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento