UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp. MULTIRRESISTENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Silvana Oliveira dos Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2014

ESTUDO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp. MULTIRRESISTENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Silvana Oliveira dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática
da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Silvana Oliveira dos
Estudo de isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter spp. multirresistentes do Hospital Universitário de Santa Maria. / Silvana Oliveira dos Santos.-2014.
70 p.; 30cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Pseudomonas aeruginosa 2. Acinetobacter spp. 3. Perfil de sensibilidade 4. Carbapenêmicos I. Hörner, Rosmari II. Título.

© 2014
Todos os direitos autorais reservados a Silvana Oliveira dos Santos. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: sil.o.santos@hotmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

ESTUDO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp. MULTIRRESISTENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

elaborada por
Silvana Oliveira dos Santos

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rosmari Hörner, Dr[a]. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Verginia Medianeira Dallago Rossato, Dr[a]. (UFSM)

Andreia Rosane de Moura Valim, Dr[a]. (UNISC)

Santa Maria, 21 de março de 2014.

Aos meus pais, ***João Antonio*** *e* ***Neiva,***

Aos meus irmãos ***Gustavo*** *e* ***Naiana,***

Ao meu noivo ***Tiago,***

que deixaram de ser mestres para que eu me tornasse mestra!

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo a Deus, Ele sempre esteve do meu lado durante esta caminhada, muitas vezes o caminho tornou-se tortuoso e pensei em desistir, porém Ele me enviou alguns anjos "sem asas" para que esta caminhada fosse um pouco menos difícil, a saber:

Meus pais, João Antonio e Neiva que deixaram de lado muito dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, eles, embora distante sempre estiveram comigo, ensinando, apoiando, vibrando com minhas vitórias e muito mais, amando-me incondicionalmente.

Aos meus irmãos Gustavo e Naiana, exemplos de companheirismo e amor mútuo, dispostos em todos os momentos para cada desafio desta "vida de gente grande".

Ao Tiago, meu noivo, que com seu amor, seu apoio, bons conselhos e serenidade teve mais do que ninguém muita paciência para "aguentar meus surtos" de que nunca chegaria até aqui hoje!

A minha professora orientadora Drª Rosmari Hörner, por acreditar em mim e aceitar como orientanda, apoiar e incentivar diariamente na carreira acadêmica desde a graduação e conduzir-me com dedicação para o meu crescimento profissional, muito obrigada por tudo Profª!

Não há como descrever, a imensa ajuda nos experimentos, conversas e apoio incondicional de todo o pessoal que passou e que continua no nosso Laboratório de Bacteriologia: Ani, Camille, Cláudia, Dani, Dari, Jaque, Lívia, Liliana, Liti, Maísa, Mari, Mônica, Melise, Roberta, Rosiéli, Ruzi, Tati e Taíse meu muito obrigada pela dedicação e empenho de todas para realização deste trabalho!!!

Agradeço também as minhas amigas de São Luiz Gonzaga, as companheiras da 98º turma de Farmácia: Carla, Fernanda, Fabianne, Julia, Priscila, Tatiana por estarem sempre me acompanhando e entendendo a minha ausência em alguns momentos de diversão. Aos colegas de mestrado, por compartilhar das mesmas dificuldades e tornarem a convivência uma experiência enriquecedora.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do curso de mestrado, ao Hospital Universitário de Santa Maria e às farmacêuticas do Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas, que me proporcionaram executar este trabalho, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que você deixa de existir”

Steves Jobs.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter* spp. MULTIRRESISTENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

AUTORA: SILVANA OLIVEIRA DOS SANTOS
ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de março de 2014

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter* spp. são bacilos Gram negativos não fermentadores (BGN-NF), incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através da fermentação, são considerados oportunistas e possuem grande importância clínica nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). A elevada resistência aos antimicrobianos que estas espécies apresentam atribui-se a uma série de fatores como pressão seletiva dos antimicrobianos, terapia antimicrobiana empírica inadequada, longos períodos de hospitalização e fatores relacionados ao paciente. Um total de 102 isolados do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) foram estudados sendo 63 *Pseudomonas aerugionosa* e 39 *Acinetobacter* spp.. A avaliação do seu perfil de sensibilidade foi realizada utilizando o método convencional de difusão do disco. Comparando os dois gêneros, neste estudo, *P. aeruginosa* apresentou maior sensibilidade que *Acinetobacter* spp., frente aos antimicrobianos testados. *P. aeruginosa* mostrou 85,7% de sensibilidade à polimixina B e *Acinetobacter* spp. 41,0% à tetraciclina. O mecanismo de AmpC cromossômica, pesquisado através do teste fenotípico de indução de beta-lactamase do Grupo 1, somente foi detectado em *P. aeruginosa* (68,2%). Nenhuma das amostras apresentou beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) avaliado pelo teste do sinergismo ou da aproximação dos discos. Entre as *P. aeruginosa,* 57,1% apresentaram sensibilidade simultânea ao imipenem e meropenem, sendo que as cepas resistentes a estes carbapenêmicos foram 100% sensíveis à polimixina B e 61,5% à tobramicina. No gênero *Acinetobacter* somente 15,4% foram sensíveis ao imipenem e 17,9% ao meropenem, mas as amostras resistentes a esta classe apresentaram 100% de sensibilidade à polimixina B e 59,4% à tetraciclina. A multirresistência aos antimicrobianos detectada neste nosocômio, principalmente dos isolados de *Acinetobacter* spp. mostra a importância do monitoramento do perfil de sensibilidade para a promoção da segurança do paciente com a instituição do tratamento empírico efetivo, além de constituir-se numa tentativa de minimização da resistência bacteriana.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.. Perfil de sensibilidade. Carbapenêmicos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

CLINICAL STUDY OF ISOLATED *Pseudomonas aeruginosa* AND *Acinetobacter* spp. MULTIRESISTANT THE UNIVERSITY HOSPITAL SANTA MARIA

AUTHOR: SILVANA OLIVEIRA DOS SANTOS
GUIDANCE: ROSMARI HÖRNER
Date and Place of Defence: Santa Maria, 21th March, 2014.

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter* spp. are non-fermenting Gram negative bacilli (NF-BGN), unable to use carbohydrates as an energy source through fermentation, are considered opportunistic and have great clinical importance in Related to Health Care Infections (HAIs). The high resistance to antimicrobials that these species present is attributed to a number of factors such as selective pressure of antimicrobials, inadequate empirical antimicrobial therapy, long periods of hospitalization and patient-related factors. A total of 102 isolates from the University Hospital of Santa Maria (HUSM) were studied with 63 *Pseudomonas aerugionosa* and 39 *Acinetobacter* spp.. The assessment of their sensitivity profile was performed using the standard disc diffusion method. Comparing the two genus, in this study, *P. aeruginosa* showed higher sensitivity than *Acinetobacter* spp. the antimicrobials tested. *P. aeruginosa* showed 85,7% sensitivity to polymyxin B and *Acinetobacter* spp. 41,0% to tetracycline.The mechanism of chromosome AmpC searched by the phenotypic test for beta-lactamase induction in Group 1 was only detected in *P. aeruginosa* (68,2%). None of the samples showed beta-lactamase extended spectrum (ESBL) evaluated the test of synergism or bringing the disks. Among *P. aeruginosa*, 57,1% were simultaneously sensitive to imipenem and meropenem, with these carbapenem-resistant strains were 100% sensitive to polymyxin B and tobramycin 61,5%. In the genus *Acinetobacter* only 15,4% were susceptible to imipenem and 17,9% to meropenem, but resistant to this class samples showed 100% sensitivity to polymyxin B and 59,4% to tetracycline. Multidrug resistance to antimicrobials detected this nosocomio mainly isolates of *Acinetobacter* spp. shows the importance of monitoring the sensitivity profile for the promotion of patient safety with the introduction of effective empiric treatment, and to constitute an attempt to minimize bacterial resistance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.. Profile of sensitivity. Carbapenems

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – *Pseudomonas aeruginosa* em meio Trypticase Soy Agar (TSA). 14
FIGURA 2– *Acinetobacter* spp. em meio ágar sangue 16
FIGURA 3 – A: teste de aproximação de discos ESBL positivo; B: teste de aproximação de discos AmpC positivo 21

Manuscrito 2

Figura 1 47
Figura 2 48

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Tabela 1 31
Tabela 2 32

Manuscrito 2

Tabela 1 48
Tabela 2 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii= *Acinetobacter baumannii*
AIM= Australian imipenemase
AmpC= beta-lactamase cromossômica classe C
ANVISA= Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN-NF= Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores de Glicose
CAPES= Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCIH= Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CEP=Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI= *Clinical and Laboratory Standard Institute*
CRAb=*A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos
EDTA= ácido etilenodiaminotetracético
ESBL= β-lactamase de espectro estendido – do inglês *Estended-Spectrum β-Lactamase*
GIM= German imipenemase
HUSM= Hospital Universitário de Santa Maria
IL-1= interleucina -1
IMP= imipenemase
IRAS= Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU= Infecções do Trato Urinário
LPS= lipopolissacarídeo
MDR= multirresitentes
MDT= Manual de Estrutura de Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses
MβLs= metalo-β-lactamases
NDM-1=New Delhi metalo-β-lactamase
NHSN= *National Healthcare Safety Network*
P. aeruginosa= *Pseudomonas aeruginosa*
PA=Pronto Atendimento
PPGCF= Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
SIM= Seoul imipenemase
SPM= São Paulo metalo-β-lactamase
TNF= fator de necrose tumoral
UFSM= Universidade Federal de Santa Maria
UTI= Unidade de Tratamento Intensivo
VAP= Pneumonias Associadas à Ventilação
VIM=Verona imipenemase
μm = micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 *Pseudomonas aeruginosa* 13
1.1.1 Características microbiológicas 13
1.1.2 Manifestações clínicas 14
1.1.3 Fatores de virulência e patogenicidade 15
1.2 *Acinetobacter* spp. 16
1.2.1 Características microbiológicas 16
1.2.2 Manifestações clínicas 17
1.2.3 Fatores de virulência e patogenicidade 17
1.3 Resistência aos antimicrobianos 18
1.4 β-lactamases do tipo AmpC e ESBL 19
1.5 Identificação fenotípica de ESBL e AmpC 20
1.6 Resistência aos carbapenêmicos e metalo-β-lactamases 21
1.7 Justiticativa 23
1.8 Objetivos 24
1.8.1 Objetivo geral 24
1.8.2 Objetivos específicos 24

2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS 25

2.1 MANUSCRITO 1- Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados em um hospital terciário 26
Resumo 26
Sumarry 27
Introdução 28
Materiais e métodos 29
Resultados 30
Discussão e conclusões 32
Referências 36
2.2 MANUSCRITO 2- *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria 42
Resumo 42
Abstract 43
Introdução 44
Métodos 44
Resultados 46
Discussão 49
Referências 53

3 DISCUSSÃO GERAL 59

4 CONCLUSÕES 62

REFERÊNCIAS 63

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são bacilos Gram negativos não fermentadores (BGN-NF), aeróbios, não esporulados e se caracterizam por serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de fermentação. Essas bactérias destacam-se nos casos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) e estão entre as mais isoladas em hemoculturas e amostras do trato respiratório de grandes hospitais, podendo colonizar e causar infecções oportunistas, em especial em pacientes graves submetidos a procedimentos invasivos (BRASIL, 2013a).

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Características microbiológicas

Pseudomonas aeruginosa caracteriza-se por ser um microrganismo Gram negativo, oportunista que faz parte do conjunto de batérias não fermentadoras da glicose. Esta espécie utiliza glicose e outros carboidratos oxidativamente, é oxidase positiva rápida, propriedade importante para diferenciá-la de alguns membros da família *Enterobacteriaceae* (KONEMAN et al., 2008). É uma bactéria não formadora de esporo, móvel, reta, brevemente curva, apresentando-se aos pares medindo de 1 a 5 µm de comprimento e 0,5 a 1 µm de largura (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Em meio de culturas sólidos produz alguns pigmentos como piocianina (azul), pioverdina (verde), piomelanina (preto) ou piorrubina (vermelho), além de produzir um odor doce semelhante à uva decorrente da produção de trimetilamina (KONEMAN et al., 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Na Figura 1 apresenta-se *P. aeruginosa* em meio Trypticase Soy Agar (TSA) com o pigmento pioverdina.

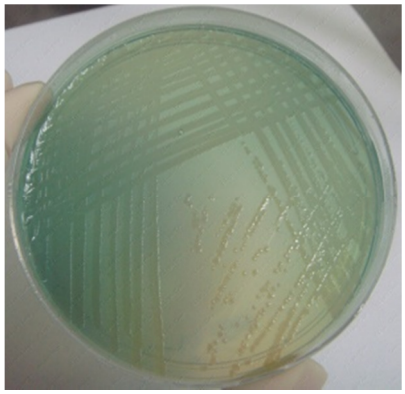


FIGURA 1 – *Pseudomonas aeruginosa* em meio Trypticase Soy Agar (TSA).
Fonte: http://microdidatica.wordpress.com/microbiologia-geral/aspectos-culturais/

A *P. aeruginosa* é um microrganismo ubíquo, sendo encontrada no solo, na água e em humanos; neste caso, pode ser isolada de locais com maior umidade. A umidade é um fator favorável para a manutenção de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar, fator este que permite um isolamento frequente em equipamentos respiratórios, soluções de limpeza, medicamentos, desinfetantes, sabões, pias e vegetais (ZAVASCKI, 2003).

Uma característica importante é que *P. aeruginosa* apresenta a capacidade de formação de biofilme, o que torna ainda mais complicado o tratamento de infecções ocasionadas por esse microrganismo, especialmente as que estão associadas aos dispositivos médicos, como cateteres e próteses (RICE, 2006). Esta espécie por apresentar esse novo fator de virulência está cada vez mais associada a bacteremias nosocomiais, infecções relacionadas a dispositivos invasivos e feridas de queimaduras em pacientes imunocomprometidos (GILLHAM et al., 2009).

1.1.2 Manifestações clínicas

Grande parte das cepas de *P. aeruginosa* envolvidas em infecções provêm da produção de fatores de virulência de superfície (que permite fixação bacteriana, colonização e invasão) e dos fatores de virulência secretados (produção de citocinas) (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). A combinação destes fatores é determinante para a expressão de síndromes específicas que acompanham uma infecção. Na prática clínica, é difícil distinguir

entre colonização simples da infecção propriamente dita, sendo que, até o momento nenhuma ferramenta de diagnóstico é ideal para avaliar o potencial de virulência em *P. aeruginosa* (MESAROS et al., 2007).

A *P. aeruginosa* é considerada um importante patógeno relacionado a Infecções do Trato Urinário (ITUs) podendo causar infecções crônicas, sistema respiratório, ocasionando pneumonias graves, infecções da pele como dermatites e foliculites e dos tecidos moles, oftalmológicas, ósseas, articulares e outras infecções sistêmicas.

1.1.3 Fatores de virulência e patogenicidade

O potencial patogênico de *P. aeruginosa* está relacionado com a produção de alguns fatores de virulência, como: - lipopolissacarídeo (LPS) que são responsáveis por promover a síndrome do choque séptico, por meio da liberação de mediadores com função de vasodilatação (citocinas como IL-1, TNF), ativação do complemento e coagulação intravascular disseminada (KURAHASHI et al., 1999); - exotoxina A que destrói o tecido e interrompe a atividade dos macrófagos; - produção de leucocidina que inibe a ação de neutrófilos e linfócitos; -piocianina que inibe o crescimento de outras bactérias; e - fímbrias que promovem a aderência na superfície (KONEMAN et al., 2008).

Alguns fatores de virulência merecem um importante destaque nas infecções por *P. aeruginosa*, como é o caso do alginato, um exopolissacarídeo que envolve a célula bacteriana e atribui às cepas o aspecto mucóide. Este fator de virulência é mais comum em pacientes com fibrose cística e apresenta mau prognóstico pela dificuldade da ação antibacteriana efetiva (HEAD; YU, 2004; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; JÁCOME et al., 2012).

A formação de biofilmes é um fator de virulência importante da *P. aeruginosa* para a colonização e infecção. O biofilme é caracterizado por complexos formados por colônias bacterianas envoltas por uma matriz orgânica de polímeros e componentes celulares que aderem a superfícies de biomateriais e dificultam a ação antimicrobiana (HOGARDT et al., 2004; PEREZ; BARTH, 2011).

1.2 *Acinetobacter* spp.

1.2.1 Características microbiológicas

O *Acinetobacter* spp. é um importante patógeno a nível nosocomial. Apresenta-se como bacilos cocóides ou cocos Gram negativos, catalase positivo, oxidase negativo, imóveis, são aeróbicos, não fermentadores da glicose e não esporulados (KONEMAN et al., 2008; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Apresentam colônias opacas, não pigmentadas em ágar sangue, com diâmetro de 1,5 a 3 mm (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008) como observado na Figura 2. *A. baumannii* normalmente cresce a 42 ºC enquanto as demais espécies desse gênero não crescem nessa temperatura (KONEMAN et al., 2008).

FIGURA 2 - *Acinetobacter* spp. em meio ágar sangue
Fonte: http://www.acinetobacter.org/

As espécies de *Acinetobacter* apresentam diversos habitats naturais tendo sido isoladas no solo, na água, em vegetais e em hospedeiros animais e humanos (HOUANG et al. 2001). O *Acinetobacter* spp. pode compor transitoriamente a pele, especialmente as regiões axilares e inguinais, podendo também ser encontradona cavidade oral e no trato respiratório de adultos hígidos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007); desta forma não produz graves problemas, sendo considerado colonizante. No entanto, no ambiente hospitalar, ele assume grande importância quando acomete indivíduos imunodeprimidos (FERREIRA et al., 2011).

1.2.2 Manifestações clínicas

As demonstrações clínicas mais comuns pelo gênero *Acinetobacter* incluem pneumonia associada a bacteriemia, infecções da pele e dos tecidos moles e meningite (GAYNES et al., 2005). A bacteremia geralmente é secundária a uma infecção no sistema respiratório e/ou pelos cateteres venosos (FOURNIER; RICHET, 2006). As infecções da pele e tecidos moles pelo *Acinetobacter* spp. na maioria das vezes atinge as extremidades dos membros (DAVIS et al., 2005). As cepas de *Acinetobacter* podem ainda provocar endocardite particularmente em próteses valvulares, além de sinusite, peritonite e infecções oculares como a endoftalmite e ceratite (FOURNIER; RICHET, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

1.2.3 Fatores de virulência e patogenicidade

A virulência do microrganismo *Acinetobacter* spp. tem sido discutida e sugerem que a característica em provocar infecções graves esteja relacionada a sua capacidade de adaptação metabólica em ambientes hospitalares agressivos (CERQUEIRA; PELEG, 2011).

Vários fatores são atribuídos a patogenicidade do *Acinetobacter* spp. como a sua capacidade de formar biofilmes e resistir a dessecação em superfícies inanimadas (LOEHFELM; LUKE; CAMPAGNARI, 2008), capacidade de aderir, colonizar e invadir células epiteliais humanas (LEE et al., 2008), além de apresentar mecanismos de resistência aos antimicrobianos devido a capacidade de aquisição de material genético através da transferência lateral de genes para promover a sua própria sobrevivência sob pressões de antimicrobianos (SMITH et al., 2007; ADAMS et al., 2008).

1.3 Resistência aos antimicrobianos

O elevado número de infecções microbianas por microrganismos multirresistentes (MDR) adquiridas tanto a nível comunitário quanto nosocomial tem demonstrado atenção dos profissionais de saúde (CAUMO et al., 2010).

A resistência aos antimicrobianos é um problema de importância mundial, principalmente pela emergente disseminação de patógenos nosocomiais e comunitários resistentes como bacilos Gram negativos não fermentadores (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

O mecanismo de adaptação desenvolvido pelas bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estão submetidos caracteriza-se resistência bacteriana (LIVERMORE, 1995). Alguns elementos contribuem para essa disseminação da resistência entre os microrganismos MDRs principalmente a nível hospitalar como, por exemplo, as mutações nos genes de resistência; troca de informações genéticas para novos microrganismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a disseminação de microrganismos resistentes e a proliferação e disseminação de clones multirresistentes (TENOVER, 2001).

Recentemente, o Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program)* se propôs em avaliar a resistência nos bacilos Gram negativos na América Latina entre os anos de 2008 – 2010 e evidenciou que o perfil dos isolados de *Acinetobacter* spp. coletados em diferentes regiões, e até mesmo em centros médicos localizados no mesmo país apresentam um aumento significativo na taxa de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, com destaque para o imipenem. Este estudo ainda apresentou a colistina (ou polimixina E) como o agente antimicrobiano mais ativo contra *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, com taxas de sensibilidades estáveis. Entretanto, no Brasil, alguns isolados de *P. aeruginosa* exibiram atividade reduzida à colistina e isolados de *Acinetobacter* spp. na Argentina, Brasil e México também mostraram sensibilidade diminuída à este agente (GALES et al., 2012).

Dados como este, evidenciam o crescente desenvolvimento da resistência aos antibióticos pelos microrganismos Gram negativos tornando limitadas as opções de tratamento e, a descoberta de novos fármacos com propriedades antibacterianas demonstra-se como uma alternativa importante para o avanço deste grave problema de saúde pública (CAUMO et al., 2010).

1.4 β-lactamases do tipo AmpC e ESBL

Os antimicrobianos β-lactâmicos são os principais agentes utilizados para o tratamento de uma variedade de infecções causadas por bactérias Gram negativas e Gram positivas (POOLE, 2004). No entanto, um mecanismo enzimático de resistência aos antibacterianos bastante relatado é a produção de β-lactamases, que são enzimas capazes de destruir parcial ou totalmente os β-lactâmicos (BUSH, 2001; WALSH et al., 2005; MEYER; PICOLI., 2011).

Segundo Ambler (1980) as β-lactamases estão classificadas de acordo com sua estrutura primária em quatro classes: A, B, C e D, as quais foram agrupadas em serina-β-lactamases (classes A, C e D) e metalo-β-lactamases (MβLs) (classe B), de acordo com diferenças em seus mecanismos catalíticos. As classes A, C e D possuem um resíduo de serina no local ativo da enzima, enquanto as da classe B possuem um resíduo de cisteína e utilizam íons divalentes, usualmente zinco (Zn^{++}) como cofator para a reação de hidrólise do anel β-lactâmico (AMBLER, 1980). Recentemente Bush; Jacoby (2010) sugerem uma nova classificação: - Grupo1: É o grupo das cefalosporinases do tipo AmpC pertencentes à classe molecular C, de Ambler, que não são inibidas por inibidores de β-lactamases, como o ácido clavulânico e tazobactam; -Grupo 2: São as serino-β-lactamases, enzimas pertencentes ao grupo A e D, de Ambler, representadas pelo maior grupo de β-lactamases. Este grupo é dividido em subgrupos conforme o espectro de ação de cada enzima. Como representantes temos as *Estended-Spectrum β-Lactamase* (ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); - Grupo 3: São as metalo-β-lactamases (MβLs). Tem habilidade de hidrolisar carbapenêmicos e são inibidas por quelantes de íons, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (BUSH; JACOBY, 2010).

A produção de β-lactamases do tipo AmpC são reconhecidamente expressas pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia, Providencia, Morganella* e *Pseudomonas* e são enzimas produzidas por genes de localização cromossômica (NORDAMNN; MAMMERI, 2007; PITOUT, 2008). Sua produção pode ser induzida *in vitro* quando estes isolados clínicos são expostos a agentes β-lactâmicos (cefoxitina e imipenem). A hiperprodução desta enzima pode acarretar hidrólise do aztreonam, cefalosporinas de 1º, 2º e 3º geração e penicilinas de amplo espectro ocasionando falha terapêutica durante tratamento com estes agentes (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Outro mecanismo de resistência bastante frequente em microrganismos da família *Enterobacteriaceae* é o ESBL, ele é codificados por genes inseridos em plasmídeos e

caracteriza-se por enzimas que apresentarem a capacidade de hidrolisar antimicrobianos β-lactâmicos de amplo espectro. A ação hidrolítica deste tipo de enzimas confere clinicamente resistência a todas penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de 1º, 3º e 4º geração e monobactâmicos, podendo em alguns casos, ser inibido por inibidores de β-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (PATERSON; BONOMO, 2005; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

1.5 Identificação fenotípica de ESBL e AmpC

Na rotina laboratorial, alguns métodos fenotípicos são propostos para a investigação de ESBL e AmpC, eles baseiam-se na capacidade dos inibidores de β-lactamases em impedir a ação da enzima, como por exemplo o teste de aproximação de discos e o teste do disco combinado.

O teste de aproximação de discos é uma triagem laboratorial para o mecanismo de ESBL, ele fundamenta-se na aproximação do disco de amoxicilina com ácido clavulânico aos discos de cefalosporinas de 3º e 4º geração e aztreonam a fim de verificar o aparecimento de uma zona de sinergismo ou fantasma entre o halo de inibição da amoxicilina com ácido clavulânico e o halo das cefalosporinas e/ou aztreonam (JALIER et al., 1988). O teste do disco combinado é um teste fenotípico confirmatório para ESBL e utiliza discos de cefalosporinas de 3º geração associadas com ácido clavulânico e os mesmos substratos sem o inibidor de β-lactamases. O teste é considerado positivo quando ocorrer um aumento ≥ 5 mm no halo de inibição da cefalosporinas com ácido clavulânico em relação ao disco sem inibidor (CARTER et al., 2000).

Para a triagem de cepas produtoras de AmpC, um método fenotípico bastante difundido é o teste de aproximação de discos que consiste na aproximação dos discos de imipenem e cefoxitina a um disco de ceftazidima central. O achatamento do halo da cefalosporina de 3ª geração induzida por imipenem ou ceftazidima caracteriza um teste positivo para AmpC (COUDRON; MOULAND; THOMSON, 2000). Embora os testes fenotípicos sejam de fácil execução na rotina laboratorial, no entanto não possuem sensibilidade e especificidade ideal, sendo a detecção genotípica o método de escolha. Na Figura 3 visualizamos os testes fenotípicos de disco aproximação de ESBL e AmpC positvos.

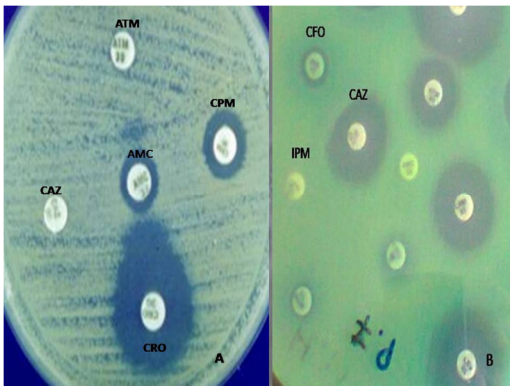


FIGURA 3 - A: teste de aproximação de discos ESBL positivo; B: teste de aproximação de discos AmpC positivo

CAZ=ceftazidima; ATM=aztreonam; AMC=amoxicilina ácido clavulânico; CPM=cefepime; CRO=ceftriaxona; CFO=cefoxitina; IPM=imipenem

Fonte: arquivo pessoal

1.6 Resistência aos carbapenêmicos e metalo-β-lactamases

A emergência dos mecanismos de resistência como AmpC e ESBL limitou o uso das cefalosporinas de amplo espectro, como ceftazidima e cefepime (JEAN et al., 2002), as quais, durante muitos anos, representaram a terapia de escolha para o tratamento de infecções graves, causadas por bactérias Gram negativas (MOOSDEEN, 1997). Com a crescente propagação de bactérias produtoras de AmpC e ESBL iniciou-se o uso de carbapenêmicos, os quais foram uma nova opção de tratamento para infecções bacterianas graves, entretanto logo a resistência aos carbapenêmicos começou a ser observada nas enterobactérias, *P. aeruginosa* e em *Acinetobacter* spp. (WALSH et al., 2005).

O mecanismo de resistência apresentado pelos BGN-NF aos carbapenêmicos pode ocorrer devido à produção de carbapenemases, as quais são enzimas com capacidade de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem e meropenem (BONOMO; SZABO, 2006). Além da produção das carbapenemases, outros mecanismos podem levar à resistência aos carbapenêmicos como, por exemplo, a perda de porina com redução da expressão de proteínas de membrana externa, e as bombas de efluxo, as quais exportam o antimicrobiano do espaço periplasmático para o meio externo (DRAWZ; BONOMO, 2010). A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. deve-se principalmente pela expressão de MβLs e oxacilinases (POIREL; NORDMANN, 2006).

As MβLs se caracterizam por hidrolisar todos os β-lactâmicos com exceção do monobactâmico aztreonam, necessitam de íons zinco ou outros cátions divalentes como cofatores para a sua atividade catalítica e não são inibidas pelos inibidores de β-lactamases disponíveis comercialmente, sendo inibidas por agentes quelantes como o EDTA (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH, 2001). Essas enzimas podem ser codificadas cromossomicamente ou transmitidas por elementos genéticos móveis (WALSH et al., 2005). Desde a identificação da primeira MβL adquirida (móvel), em um isolado de *P. aeruginosa*, no Japão em 1991 (WATANABE et al.,1991), as MβLs têm sido identificadas em isolados clínicos em todo o mundo. Até o presente momento são conhecidas sete subclasses de MβLs adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo-β-lactamase), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase), AIM (Australian imipenemase) e, mais recentemente, NDM-1 (New Delhi metalo-β-lactamase) (WATANABE et al.,1991; LAURETTI et al., 1999; TOLEMAN et al., 2002; CASTANHEIRA et al., 2004; LEE et al. 2005; YONG et al. 2007, YONG et al. 2009).

Nos *A. baumannii* as carbapenemases da classe D (oxacilinases) têm sido relatado com frequência, este tipo de enzima é capaz hidrolisar fracamente imipenem e meropenem, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam. A atividade é inibida pelo ácido clavulânico, uma propriedade incomum para oxacilinases com exceção da OXA-23, que é resistente ao ácido clavulânico (NORDMANN; POIREL, 2002; BOO; WALSH; CROWLEY, 2006).

A diminuição na sensibilidade aos carbapenêmicos tem sido observada em diversas partes do mundo inclusive na América Latina. O Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program)* nos anos de 2008 – 2010 detectou a presença do gene OXA-23 em espécies de *Acinetobacter* spp. em 26,8% dos isolados provenientes da Argentina e 73,2% dos isolados do Brasil (GALES et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e a disseminação em todo o Brasil deste tipo de resistência tanto em membros da família *Enterobacteriaceae* quanto em BGN-NF (ZAVASCKI at al., 2009; ZAVASCKI et al., 2010; BEIRAO et al., 2011; SEKI et al., 2011) tornou-se um grave problema clínico e epidemiológico em várias instituições de saúde. Por essa razão foi elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2010 a primeira nota técnica (Nota Técnica Nº1/2010) que normatiza medidas para identificação, prevenção e controle de infecções MDRs, entre esses se destacam *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumanii* resistentes aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). Em 2013, esse documento foi reformulado em consequência do aumento

significativo dos casos deste tipo de resistência em centros hospitalares brasileiros (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013b).

Atualmente, há descrições mundiais sobre o problema endêmico dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDRs associado aos elevados índices de morbi-mortalidade. No Brasil, surtos de infecção ocasionados por *P. aeruginosa* têm sido relacionados com a disseminação clonal principalmente da espécie SPM-1 (NEVES et al., 2011). Infecção graves por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb) como a relatada por Martins e colaboradores (2012) descreve a resistência aos carbapenêmicos em um receptor de pulmão durante um transplante, demonstrando o atual desafio no controle da transmissão de infecções por microrganismos MDRs.

1.7 Justificativa

P. aeruginosa e *Acinetobacter* spp. representam os microrganismos mais isolados nas infecções do trato respiratório de pacientes internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), assim também como em outros nosocômios, nacionais e internacionais.

O HUSM é um hospital escola considerado referência para a região central do estado do Rio Grande do Sul no atendimento ambulatorial e internação de pacientes com diversas patologias, entretanto é desconhecido o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

A importância destes patógenos hospitalares é fortalecida por apresentarem, frequentemente, resistência à múltiplas classes de antimicrobianos (MDR), e até pan-resistência, isto é, resistência à todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis.

Diante das altas taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., a avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e informações sobre os isolados resistentes aos carbapenêmicos são importantes para o conhecimento das características clínicas des cepas resistentes para que medidas eficazes possibilitem a instituição da correta terapia antimicrobiana empírica e que o controle da disseminação seja efetivo.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

Avaliar os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. no período de agosto de 2011 a janeiro de 2012, no Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS.

1.8.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade de todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. pelo método de difusão do disco;
- Determinar as unidades hospitalares e os espécimes clínicos em que *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. possuem prevalência de isolamento;
- Conhecer os mecanismos de resistência AmpC e ESBL em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.;
- Determinar o perfil de sensibilidade nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos;
- Identificar as unidades hospitalares e os espécimes clínicos nos quais *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos foram predominantemente isolados.

2 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Para a apresentação dos resultados da dissertação de mestrado, optou-se pelo formato de publicações científicas, o que é permitido institucionalmente, conforme o Manual de Estrutura de Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses (MDT) (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2012). Considerando os aspectos estruturais de uma dissertação, serão apresentados dois manuscritos que foram elaborados a partir dos resultados da pesquisa como requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

O primeiro manuscrito, intitulado "Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados em um hospital terciário", apresenta o perfil de sensibilidade dos isolados em estudo conforme o método de difusão do disco. Este manuscrito foi elaborado de acordo com as normas editoriais para publicação na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, qualis B3 para Farmácia.

O segundo manuscrito, intitulado "*Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria", encontra-se de acordo com as normas editoriais e está submetido para publicação na Revista Scientia Medica, qualis B5 para Farmácia.

2.1 MANUSCRITO 1

Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isolados em um hospital terciário

Profile antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a tertiary hospital

Silvana Oliveira dos Santos[1]; Tatiana Feyh Wagner[2]; Rosmari Hörner[3]

[1]Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil
[2]Aluna de Graduação do Curso de Ciências Biológicas, UFSM, Brasil
[3]Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFSM, Brasil

Resumo

Avaliamos o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 63 *Pseudomonas aeruginosa* e 39 *Acinetobacter* spp. isolados no Hospital Universitário de Santa Maria, no período compreendido entre agosto de 2011 a janeiro de 2012, segundo o método de difusão do disco. *P. aeruginosa* apresentou 85,7% de sensibilidade à polimixina B e os isolados de *Acinetobacter* spp. 41,0% foram sensíveis à tetraciclina. Em 68,2% das amostras de *P. aeruginosa* foi detectado teste fenotípico positivo ao mecanismo de AmpC cromossômica e nenhuma cepa apresentou teste de sinergismo positivo para β-lactamases de espectro ampliado (*Estended-Spectrum β-Lactamase* – ESBL). Encontramos também elevada resistência das amostras de *Acinetobacter* spp. aos carbapenêmicos imipenem e meropenem (79,5%). A diferença nos resultados obtido

com as bactérias deste estudo, quando comparados a outros nosocômios, ratifica a importância do monitoramento do perfil de sensibilidade aos antibióticos em cada instituição, para a promoção da segurança do paciente com a instituição do tratamento empírico efetivo, além de constituir uma tentativa de minimização da resistência bacteriana.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa. Acinetobacter*spp.. Testes de Sensibilidade Microbiana.

Sumarry

We evaluated the antimicrobial susceptibility profile of 63 *Pseudomonas aeruginosa* and 39 *Acinetobacter* spp. isolated at the University Hospital of Santa Maria, in the period from august 2011 to january 2012, according to the disc diffusion method. *P. aeruginosa* showed 85,7% sensitivity of polymyxin B and isolates *Acinetobacter* spp. 41,0% were sensitive to tetracycline. In 68,2% of *P. aeruginosa* was detected positive phenotypic test the chromosomal AmpC mechanism and no strain showed positive synergism test for β-lactamase spread spectrum (Estended-Spectrum β-Lactamase - ESBL). Also found high resistance of samples of *Acinetobacter* spp. carbapenems to imipenem and meropenem (79,5%). The difference in results obtained with bacteria in this study, when compared to other nosocômios, confirms the importance of monitoring of antibiotic sensitivity profile for each institution for the promotion of patient safety with the introduction of effective empiric treatment, besides being in an attempt to minimize bacterial.

Keys Words: *Pseudomonas aeruginosa***.** *Acinetobacter* spp.. Microbial Sensitivity Tests.

Introdução

Atualmente um dos grandes problemas de saúde pública é a emergência de microrganismos multirresistentes com destaque para os bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose (BGN-NFG) (Laranjeira et al., 2010). *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. estão entre os BGN-NFG mais frequentemente envolvidos em infecções principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). *P. aeruginosa* configura-se como a mais prevalente em UTIs dos Estados Unidos e a terceira espécie mais comum nas UTIs do Canadá (Obritsch et al., 2004; Zhanel et al., 2008), enquanto que o *Acinetobacter* spp. é uma das 20 espécies mais comum nas UTIs do Canadá (Zhanel et al., 2008).

P. aeruginosa e *Acinetobacter* spp. representam os principais agentes de surtos hospitalares no mundo inteiro (Cortes et al., 2009; Hosoglu et al., 2011). No Brasil já existem alguns relatos de casos de resistência aos carbapenêmicos por estas bactérias (Prates et al., 2011). Este tipo de mecanismo de resistência aliado aos débeis investimentos da indústria farmacêutica em novos antimicrobianos conduziu à retomada na utilização de uma classe de agentes muito antiga, como as polimixinas, para o tratamento de suas infecções graves (Giamarellou, 2010).

Atualmente o termo multirresistência (MDR) é empregado para designar os microrganismos que se apresentam resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados a nível laboratorial. *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. MDRs estão entre os principais agentes relatados como os responsáveis por Infecções Relacionadas à Saúde (IRAS) (Brasil, 2010).

O ambiente hospitalar é o local que armazena agentes infecciosos multirresistentes, principalmente por acolher diversas pessoas com inúmeras condições

clínicas debilitantes as quais estão mais suscetíveis à infecções, e tornam então, esse local bastante favorável para a propagação da resistência (Nogueira et al., 2009).

Informações sobre os padrões locais de sensibilidade de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. minimizam as taxas de morbimortalidade dos pacientes e conduz para o controle de infecções e escolha da terapia antimicrobiana adequada, portanto o objetivo deste estudo foi determinar o perfil de sensibilidade e o mecanismo de resistência AmpC de isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) no período de agosto de 2011 a janeiro de 2012.

Materiais e métodos

Foram isolados 63 amostras de *P. aeruginosa* e 39 *Acinetobacter* spp. de diferentes espécimes clínicos de pacientes admitidos no HUSM, um hospital público da região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de agosto de 2011 a janeiro de 2012. Sendo selecionado apenas um isolado de cada paciente. A identificação das cepas foi realizada utilizando o procedimento operacional padrão do sistema automatizado – MicroScan® – Siemens no laboratório de análises clínicas do HUSM.

Para avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado o método da difusão do disco. Os discos de antimicrobianos utilizados para ambos os gêneros foram: amicacina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacino (5 µg), meropenem (10 µg), tobramicina (10 µg), piperacilina-tazobactam (110 µg) e polimixina B (300 UI) da marca Sensidisc®. Para *P. aeruginosa* também foi testado norfloxacino (10 µg) e nos isolados de *Acinetobacter* spp. ampicilina-sulbactam (20 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (25 µg), tetraciclina (30 µg) e cefotaxima (30 µg). Foram empregadas como controles as cepas padrão *American Type Culture Collection*

(ATCC): *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 28753 e *E. coli* ATCC 35218, e foram seguidas as orientações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para interpretação como sensível, intermediário ou resistente (CLSI, 2011; CLSI 2012).

A avaliação fenotípica do mecanismo de resistência da cefalosporinase cromossomicamente codificada do tipo AmpC induzível e β-lactamases de espectro ampliado (*Estended-Spectrum β-Lactamase* – ESBL) mediadas por plasmídeos foi realizada. Para AmpC, os discos de imipenem e cefoxitina foram dispostos a 20 mm (centro a centro) do disco central de ceftazidima. A indução da produção de AmpC promove o achatamento do halo da cefalosporina de 3ª geração. Para a detecção de ESBL, discos de ceftriaxona, ceftazidima, cefepime e aztreonam foram dispostos a 20 mm (centro a centro) de um disco central de amoxicilina-ácido clavulânico. O aparecimento de uma zona de sinergismo, ou zona fantasma entre amoxicilina-ácido clavulânico e pelo menos um dos antimicrobianos dispostos a sua volta caracteriza teste positivo para ESBL.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o número CAAE 0125.0.243.000-06.

Resultados

O maior isolamento de *P. aeruginosa* ocorreu no pronto atendimento (14/63-22,2%), acompanhado das unidades hospitalares mais significativas: ambulatório (12/63-19,0%), clínica cirúrgica (9/63-14,3%) e UTI (8/63-12,7%). O espécime clínico no qual prevaleceu o isolamento de *P. aeruginosa* foram as secreções respiratórias (23/63-41,3%) que incluem aspirado traqueal, escarro e lavado bronco-alveolar, seguido da secreção em geral/líquidos (secreção de ferida operatória, líquido sinovial, líquido

peritonial, ponta de cateter) (14/63-22,2%); urina 13/63 (20,6%); sangue (9/63-14,3%) e fezes (1/63-1,6%).

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* apresentou boa sensibilidade aos antimicrobianos testados, destacando 85,7% (54/63) de sensibilidade à polimixina B e 65,0% (41/63) à tobramicina (Tabela 1). Encontramos em 43 dos 63 (68,2%) isolados de *P. aeruginosa* o mecanismo de AmpC positivo (teste fenotípico positivo) e nenhuma cepa foi positiva para ESBL.

Tabela 1- Perfil de sensibilidade dos 63 isolados de *P. aeruginosa* do Hospital Universitário de Santa Maria

Antimicrobiano	**Sensível, n (%)**	**Intermediário, n (%)**	**Resistente, n (%)**
Amicacina	38/63 (60,3%)	2/63 (3,2%)	23/63 (36,5%)
Aztreonam	23/63 (36,5%)	13/63 (20,6%)	27/63 (42,8%)
Cefepime	39/63 (61,9%)	5/63 (7,9%)	19/63 (30,1%)
Ceftazidima	3/63 (4,8%)	1/63 (1,6%)	59/63 (93,6%)
Ciprofloxacino	38/63 (60,3%)	3/63 (4,8%)	22/63 (34,9%)
Gentamicina	38/63 (60,3%)	5/63 (7,9%)	20/63 (31,7%)
Imipenem	36/63 (57,1%)	5/63 (7,9%)	22/63 (34,9%)
Levofloxacino	36/63 (57,1%)	3/63 (4,8%)	24/63 (38,0%)
Meropenem	36/63 (57,1%)	9/63 (14,3%)	18/63 (28,7%)
Norfloxacino	42/63 (66,7%)	1/63 (1,6%)	20/63 (31,6%)
Piperacilina-Tazobactam	38/63 (60,3%)	8/63 (12,7%)	17/63 (27,0%)
Polimixina B	**54/63 (85,7%)**	**-**	**9/63 (14,3%)**
Tobramicina	41/63 (65,0%)	1/63 (1,6%)	21/63 (33,3%)

Referente aos isolados de *Acinetobacter* spp. em estudo, a UTI foi a unidade hospitalar que este microrganismo prevaleceu 18/39 (46,1%), acompanhado da clínica médica 5/39 (12,8%) e pronto atendimento 3/39 (7,7%). As secreções respiratórias (escarro e secreção traqueal) e secreções em geral (ponta de cateter, secreção de ferida operatória, secreção de pé diabético) também foram os espécimes clínicos em que

ocorreu maior isolamento 24/39 (61,5%), 12/39 (30,8%) respectivamente, seguido de urina 2/39 (5,1%) e sangue 1/39 (2,6%).

Na Tabela 2 se observa o perfil de sensibilidade dos *Acinetobacter* spp. evidenciando que estes isolados apresentaram boa sensibilidade à tetraciclina 41,0% (16/39) e baixa sensibilidade aos carbapenêmicos meropenem e imipenem 17,9% (7/39) e 15,4% (6/39) respectivamente. Nenhum isolado de *Acinetobacter* spp. foi positivo para o teste de AmpC e ESBL.

Tabela 2- Perfil de sensibilidade dos 39 isolados de *Acinetobacter* spp. do Hospital Universitário de Santa Maria

Antimicrobiano	**Sensível, n (%)**	**Intermediário, n (%)**	**Resistente, n (%)**
Amicacina	1/39 (2,6%)	2/39 (5,1%)	36/39 (92,3%)
Ampicilina-Sulbactam	5/39 (12,8%)	15/39 (38,5%)	19/39 (48,7%)
Cefepime	1/39 (2,6%)	-	38/39 (97,4%)
Cefotaxima	-	1/39 (2,6%)	38/39 (97,4%)
Ceftazidima	1/39 (2,6%)	-	38/39 (97,4%)
Ceftriaxona	-	2/39 (5,1%)	37/39 (94,9%)
Ciprofloxacino	3/39 (7,7%)	-	36/39 (92,3%)
Gentamicina	1/39 (2,6%)	2/39 (5,1%)	36/39 (92,3%)
Imipenem	6/39 (15,4%)	2/39 (5,1%)	31/39 (79,5%)
Levofloxacino	1/39 (2,6%)	-	38/39 (97,4%)
Meropenem	7/39 (17,9%)	1/39 (2,6%)	31/39 (79,5%)
Piperacilina-Tazobactam	2/39 (5,1%)	-	37/39 (94,9%)
Sulfametoxazol-Trimetropim	1/39 (2,6%)	-	38/39 (97,4%)
Tetraciclina	**16/39 (41,0%)**	**15/39 (38,5%)**	**8/38 (20,5%)**
Tobramicina	2/39 (5,1%)	-	37/39 (94,9%)

Discussão e conclusões

Bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. tem atraído a atenção nos últimos anos como os principais agentes

de infecções nosocomiais (Rossolini & Mantengoli, 2005; Peleg et al., 2008) por apresentarem elevada multirresistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, limitando assim as opções terapêuticas (Scheffer et al., 2010). Esses microrganismos por serem oportunistas são frequentemente relatados em infecções que acometem especialmente pacientes imunocomprometidos como os de UTIs (Cezario et al., 2009; Casares et al., 2010).

Existem evidências de que o consumo de antimicrobianos sem o conhecimento do perfil de sensibilidade local é um dos fatores que contribuem para a seleção de cepas multirresistentes (Rossi, 2011). Nossa pesquisa destacou que os isolados de *P. aeruginosa* em estudo apresentaram boa sensibilidade aos antimicrobianos como tobramicina (65,0%), e piperacilina-tazobactam (60,3%), esse percentual é semelhante ao encontrado por Almeida et al. (2012) que avaliou os isolados de *P. aeruginosa* hospitalares do Hospital de Urgência e Emergência de Belém e encontrou 41,7% e 75,0% de sensibilidade respectivamente a esses dois agentes, e 33,3% ao aztreonam. Outro estudo, que avaliou 102 isolados de *P. aeruginosa* resistente ao meropenem desenvolvido por McCraken et al. (2011) apresentou 67,7% de sensibilidade a amicacina, dado similar ao do nosso estudo (60,3%), no entanto, a sensibilidade a gentamicina foi de 28,4% diferentemente da encontrada em nossa pesquisa (60,3%).

As cefalosporinas de amplo espectro foram durante muitos anos o tratamento de escolha para o tratamento para as infecções por bactérias Gram negativas, no entanto, a produção de enzimas β-lactamases do tipo AmpC e espectro estendido ESBL restringiu o uso das cefalosporinas iniciando-se o emprego mais frequente dos carbapenêmicos. Nossa pesquisa detectou a presença de 68,2% (43/63) para o mecanismo de resistência AmpC nos isolados de *P. aeruginosa*, dado inferior ao evidenciado por outro estudo realizado no mesmo nosocômio em 2009, no qual a prevalência foi de 97,9% nos

isolados de *P. aeruginosa* (Capelari & Hörner, 2009). Essa redução deve- se a atuação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), a qual instituiu medidas como a terapia antimicrobiana de descalonamento e a capacitação dos profissionais, aliada ao maior rigor na dispensação dos antimicrobianos.

Os carbapenêmicos com sua atividade de amplo espectro, são uma classe de antimicrobianos que possui atualmente, resistência documentada frente aos gêneros *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., família *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (Papp-Wallace et al., 2011). Nossos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. em estudo apresentaram taxas de 34,9% e 79,5% respectivamente de resistência ao imipenem, dados superiores aos encontrados por Siqueira et al. (2013), no qual as amostras de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isoladas de um Hospital Universitário do Noroeste do Paraná demonstraram 25,4% e 54,8% de resistência a este agente respectivamente.

Frente ao meropenem as cepas pesquisadas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. exibiram resultados semelhantes ao imipenem com 28,7% e 79,5% de resistência, respectivamente. Um estudo realizado no Canadá em 2011, envolvendo 1477 isolados de *P. aeruginosa* do período de 2007-2009 evidenciou 6,9% das cepas resistentes ao meropenem (McCraken et al., 2011). Já em outro estudo envolvendo 40 cepas de *Acinetobacter baumannii* no ano de 2010 no Hospital "Hermanos Ameijeiras" em Cuba foi encontrado uma taxa de 90,0% de resistência ao meropenem (Casares et al., 2010).

O ressurgimento na utilização das polimixinas ocorreu como opção terapêutica para tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos (McCraken et al., 2011). Nosso estudo evidenciou um percentual de 85,7% de sensibilidade à polimixina B entre os isolados de *P. aeruginosa*, taxa esta inferior a encontrada na pesquisa de Fernandes et al. (2010) em que 100,0% dos

isolados de *P. aeruginosa* de hemoculturas foram sensíveis. Entretanto, cabe ressaltar que este antimicrobiano embora seja efetivo apresenta propriedades nefrotóxicas e neurotóxicas (Falagas & Kasiakou 2005).

As cepas de *Acinetobacter* spp. de nossa instituição apresentaram elevado índice de resistência aos antimicrobianos com destaque para β-lactâmicos como cefepime (97,4%), ceftazidima (97,4%), piperacilina-tazobactam (94,9%) estes dados se assemelham ao encontrado por Casares et al. (2010) onde 92,5% dos isolados de *Acinetobacter baumannii* foram resistentes ao cefepime, 100,0% resistentes a ceftazidima e 92,5% resistentes a piperacilina-tazobactam.

Em nosso nosocômio, nos isolados de *Acinetobacter* spp. também foi evidenciada baixa sensibilidade aos aminoglicosídeos com 2,6% para a amicacina e 2,6% para gentamicina. Estas porcentagens de sensibilidade são inferiores as encontradas na pesquisa desenvolvida por Rodríguez et al. (2010) no Hospital de Clínicas da Universidade de Buenos Aires no qual avaliou isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos entre os anos de 2002-2008 e estes apresentaram 12,9% se sensibilidade à amicacina e 24,2% se sensibilidade a gentamicina.

A tetraciclina foi o antimicrobiano que mostrou maior sensibilidade frente às espécies de *Acinetobacter* spp. em nossa instituição, estudos de Coelho et al. (2006) e Scheetz et al. (2007) evidenciaram que as tetraciclinas clássicas (minociclina e doxacilina) podem apresentar satisfatória atividade antimicrobiana contra *Acinetobacter* spp..

Analisando as unidades hospitalares, o maior isolamento de *P. aeruginosa* ocorreu no pronto atendimento (14/63- 22,2%), Teixeira et al. (2004) em Porto Alegre (RS), referem que o pronto socorro é uma importante via de admissão de pacientes graves que requerem maior número de procedimentos invasivos aumentando dessa

forma os riscos para contrair infecção por bactérias multirresistentes. As espécies de *Acinetobacter* spp. foram prevalentemente, em nosso estudo isoladas na UTI (18/39-46,15%), dado similar aos resultados de McCraken et al. (2011) que também encontrou maior isolamento deste tipo de microrganismo na UTI (42,4%).

As secreções respiratórias foram o espécime clínico no qual as cepas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. de nossa pesquisa tiveram o maior isolamento. Em um estudo desenvolvido no Canadá, os isolados de *P. aeruginosa* provieram principalmente do trato respiratório enquanto que *Acinetobacter* spp. foi isolado em maior número em culturas de sangue (McCraken et al. 2011).

Nossa pesquisa revelou que as cepas analisadas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. do HUSM já apresentam multirresistência aos antimicrobianos. O conhecimento da epidemiologia local é extremamente importante com o intuito de minimizar das taxas de morbidade e mortalidade por estes microrganismos, cerceamento da resistência bacteriana e redução dos custos hospitalares.

Agradecimentos

Os autores agradecem a toda a equipe de funcionários do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, bem como, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Referências

Almeida MGC, Chase SAN, Coelho MZR, Damasceno CEC, Dolabela MF. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar e ambulatorial oriundas de laboratórios público e privado, em Belém, estado do Pará. Rev Bras Anan Clin. 2012; 44:44-49.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica N°1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes de 25 de outubro de 2010.

Capelari AP, Hörner, R. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* no hospital Universitário de Santa Maria-RS. Rev Saú. 2009; 35:37-44.

Casares MH, Rivera FE, Posada MCH, Batista MLM, Méndez ZMO. Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clinicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". Rev Cub Med. 2010; 49:218-227.

Cezario RC, Duarte De Morais L, Ferreira JC, Costa-Pinto RM, Darini AL, Gontijo-Filho PP. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27:269-274.

Clinical and Laboratory Standards Institute.Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-first informational supplement, document M100-S21.2011. CLSI, Wayne PA. USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-two informational supplement, document M100-S22. 2012 CLSI, Wayne PA. USA.

Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R. Pitt TL, Patel BC, Livermore DM. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiples hospitals in London and southeast England. Jour Clin Microbiol. 2006; 44:3623-27.

Cortes JA, Cuervo SI, Urdaneta AM, Potdevin G, Arroyo P, Bermúdez D, Correa A, Villegas MV. Identifying and controlling a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a Latin-American cancer centre and its associated risk factors. Braz J Infect Dis, 2009; 13(2):99-103.

Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Critical Care. 2006; 10:1-13.

Fernandes TA, Pereira CAP, Petrili AS, Pignatari A C C. Caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e produtoras de metalo-β-lactamase isoladas em hemoculturas de crianças e adolescentes com câncer. Rev da Soc Bras de Med Trop. 2010; 43:372-376.

Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. Int. J. Antimicrob. Agents, 2010; 36:50-54.

Hosoglu S, Hascuhadar M, Yasar E, Uslu S, Aldudak B. Control of an *Acinetobacter baumannii* outbreak in a neonatal ICU without suspension of service: a devastating outbreak in Diyarbakir, Turkey. Infection. 2012; 40(1): 107.

Laranjeira VD, Marchetti DP, Steyer JR, Corção G, Picoli SU. Pesquisa de *Acinetobacter*sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo-β-lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc* Bras de Med Trop. 2010; 43(4):462-464.

McCracken M, Mataseje LF, Loo V, Walkty A, Adam HJ, Hoban DJ, Zanhel GG, Mulvey MR. Characterization of *Acinetobacter baumannii* and meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Canada: results of the CANWARD 2007–2009 study. Diag Microb and Infec Dis. 2011; 69:335–341.

Nogueira PSF, Moura ERF, Costa MMF, Monteiro WMS, Brondi L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. Rev. Enferm. UERJ, 2009; 17:96-101.

Obritsch M, Fish DN, MacLaren R, Jung R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. Antimicrob Agents Chemother, 2004; 48:4606–4610.

Papp-Wallace KM, Endiamiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. Agent and Chemother. 2011; 55:4943–4960.

Peleg AY, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:538-92.

Prates CG, Martins AF, Superti, SV, Lopes FS, Ramos F, Cantarelli VV, Zavascki AP. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenemresistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. Epidemiol Infect. 2011; 139(3):411-418.

Rodríguez CH, Nastro M, Weyland B, Losada M, Vay C, Famiglietti A. Bacteriemias causadas por *Acinetobacter* spp. y resistencia a carbapenemes. Acta Bioq Clín Latinoam. 2010; 44: 243-248.

Rossi F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. Antimicrob Resist. 2011; 52:1138-1143.

Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2005; 4:17-32.

Scheetz, M.H, et al. In vitro activities of various antimicrobials alone and in combination with tigecycline against carbapenem-intermediate or-resistant *Acinetobacter baumannii.* Antim Agents Chemother.2007; 51:1621-1626.

Scheffer MC, Bazzo M , Steindel M, Darini AL, Climaco E, Dalla-Costa LM. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University

Hospital in Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43:367–371.

Siqueira VLD, Cardoso RF, Pádua RAF, Caleffi-Ferracioli KR, Helbel C, Santos ACB, Aoaki EE, Nakamura CV. High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil. Braz Jour of Pharm Scienc. 2013; 49:49-56.

Teixeira PLZ, Hertz FT, Cruz DB, Caraver F, Hallal RC, Moreira JS. Pneumonia associada a ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. J Bras Pneumol. 2004; 30:540-458.

Zhanel GG, DeCorby M, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Karlowsky JA, Lagacé-Wiens P, Walkty A, Mulvey MR, Hoban DJ. Antimicrobial susceptibility of 3931 organisms isolated from intensive care units in Canada: Canadian National Intensive Care Unit Study, 2005/2006. Diagn Microb Infect Dis, 2008; 62(1):67–80.

2.2 MANUSCRITO 2

Acinetobacter spp. e _Pseudomonas aeruginosa_ resistente aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria

Acinetobacter spp. and _Pseudomonas aeruginosa_ carbapenem-resistant at the University Hospital of Santa Maria

Daiane Brezolin[1], Silvana Oliveira dos Santos[2], Rosmari Hörner[3]

[1]Farmacêutica, formada pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). E-mail: daí.brez@gmail.com
[2]Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). E-mail: sil.o.santos@bol.com.br
[3]Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). E-mail:rosmari.ufsm@gmail.com

Resumo

Objetivos: Avaliar *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, isolados entre agosto de 2011 a janeiro de 2012 de pacientes internados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Métodos:** Trata-se de um estudo retrospectivo realizado através da consulta no banco de dados do Laboratório de Microbiologia do HUSM, onde foram incluídos todos os isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* provenientes de diferentes espécimes clínicos coletadas de pacientes internados que apresentaram resistência ou perfil intermediário aos antimicrobianos carbapenêmicos de uso neste nosocômio (imipenem, meropenem e ertapenem) verificados através de metodologia convencional pela técnica de difusão do disco (Kirby-Bauer) ou metodologia automatizada (MicroScan® – Siemens) de acordo com as normas preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Resultados:** No período estudado foram encontradas 58 amostras de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores resistentes

aos carbapenêmicos, sendo 32 do gênero *Acinetobacter* e 26 *P. aeruginosa.* O *Acinetobacter* spp. foi mais isolados na Unidade de Tratamento Intensivo, enquanto que Pronto Atendimento e Ambulatório foram as unidades hospitalares em que prevaleceu *P. aeruginosa.* Ambos os microrganismos provieram principalmente de secreções respiratórias. Neste estudo *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* apresentaram elevada resistência aos antimicrobianos. A polimixina B mostrou-se um bom antimicrobiano para o tratamento de infecções de microrganismo resistentes aos carbapenêmicos neste nosocômio. **Conclusões:** Conhecer os padrões nosocomiais locais de resistência bacteriana é de importância significativa como medida preventiva no controle do aparecimento de microrganismos multirresistentes.

Descritores: *Acinetobacter* spp.; *Pseudomonas aeruginosa;* carbapenêmicos.

Abstract

Aims: Avaluate *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant isolated in august 2011 to january 2012 from patients at the University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Methods**: This is a retrospective study conducted by consulting the database of the Microbiology Laboratory of the HUSM where were included all isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* from different clinical specimens collected hospitalized patients that showed resistance or intermediate profile carbapenem antimicrobial use this nosocomio (imipenem, meropenem and ertapenem) verified through conventional methodology technique by disc diffusion (Kirby-Bauer) or automated method (MicroScan ® - Siemens) according to the standards recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Results**: In the period studied were found 58 samples of Gram negative Non Fermenters resistant to carbapenems, 32 of the genus *Acinetobacter* and 26 *P. aeruginosa*. *Acinetobacter* spp. was more frequently isolated in the Intensive Care Unit, while the Emergency and Ambulatory units were the hospitals that

prevailed in *P. aeruginosa*. Both microorganisms came mainly from respiratory secretions. In this study, *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* showed high antimicrobial resistance. Polymyxin B showed a good antimicrobial for the treatment of infections resistant to carbapenems this microorganism nosocomio. **Conclusions:** Knowing the local patterns of nosocomial bacterial resistance is of significant importance as a preventive measure to control the appearance of multiresistant microorganisms.

Key words: *Acinetobacter* spp.; *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenems.

Introdução

Acinetobacter spp. e *Pseudomonas aeruginosa* são Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores de Glicose (BGN-NF) os quais possuem grande importância clínica por estarem frequentemente envolvidos em infecções nosocomiais e apresentarem múltipla resistência as drogas antimicrobianas despertando preocupações aos profissionais da saúde, principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). [1-3]

Estes microrganismos possuem ampla distribuição na natureza e por apresentarem necessidades nutricionais mínimas, conseguem sobreviver por longos períodos em superfícies secas e úmidas, podendo ser encontrados no solo, água, alimentos, além de colonizar a pele de seres humanos saudáveis e locais úmidos do corpo humano, como a orofaringe, períneo, mucosa nasal e axilas. Em ambientes hospitalares tornam-se uma ameaça aos pacientes imunodeprimidos podendo provocar infecções no trato respiratório, urinário e nos sítios de cateterização, progredindo para septicemias. [4-6]

Os fatores de risco para infecções hospitalares por *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* incluem práticas invasivas como a ventilação mecânica, cateter urinário, cateter arterial, permanência prolongada em UTIs e o uso prévio de antimicrobianos como cefalosporinas de

terceira geração, fluorquinolonas ou carbapenêmicos, sendo os últimos, fatores de risco significativos para o desenvolvimento da multirresistência. [7-10]

Devido ao crescente aumento no isolamento de BGN-NF, entre eles o *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* resistentes às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, os carbapenêmicos passaram a ser a principal opção terapêutica contra esses microrganismos Gram negativos multirresistentes. [11] Diversos mecanismos de resistência têm contribuído na elevação do isolamento de cepas resistentes a esta classe de antimicrobianos como: baixa permeabilidade da membrana externa devido à perda da porina, superexpressão de bombas de efluxo, hidrólise enzimática com produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, de betalactamases e presença de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs – do inglês, *penicillin-binding proteins*) com baixa afinidade por carbapenêmicos. [2,5]

Este expressivo aumento de isolados clínicos multirresistentes de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, verificado nos últimos, certamente é consequência da pressão seletiva gerada pela utilização de antibióticos de amplo espectro, sobretudo os carbapenêmicos, limitando o tratamento para as infecções causadas por esses microrganismos. [12]

Nosso estudo teve por objetivo avaliar as características como unidade, material clínico e perfil de sensibilidade dos isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* resistentes ou intermediários aos carbapenêmicos, obtidos de culturas efetuadas de pacientes internados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), em Santa Maria, RS, Brasil.

Métodos

Trata-se de um estudo retrospectivo realizado através da consulta no banco de dados do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), de agosto de 2011 a janeiro de 2012. Neste período foram isoladas todas as amostras dos BGN-NF resistentes ou intermediários aos carbapenêmicos do gênero *Acinetobacter* e de *P. aeruginosa*, provenientes de diferentes espécimes clínicos coletadas de pacientes internados

no HUSM. Este nosocômio localizado na cidade de Santa Maria, no sul do Brasil, presta atendimento terciário para a região central do estado do Rio Grande do Sul e conta com 291 leitos de internação, sendo 37 de tratamento intensivo.

Foram incluídos nesse estudo todos os isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* que apresentaram resistência ou perfil intermediário aos antimicrobianos carbapenêmicos de uso neste nosocômio (imipenem, meropem e ertapenem) verificados utilizando metodologia convencional pela técnica de difusão do disco (Kirby-Bauer) ou através da metodologia automatizada (MicroScan® – Siemens). Para avaliar a sensibilidade frente a polimixina B nos isolados de *P. aeruginosa* foi utilizado a difusão do disco, enquanto para os isolados de *Acinetobcter* spp., foi realizado o *E-test*® de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). [13,14]

Somente a primeira amostra bacteriana de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* isolada de cada paciente foi utilizada nesta pesquisa.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria e aprovado sob número CAAE 0125.0.243.000-06.

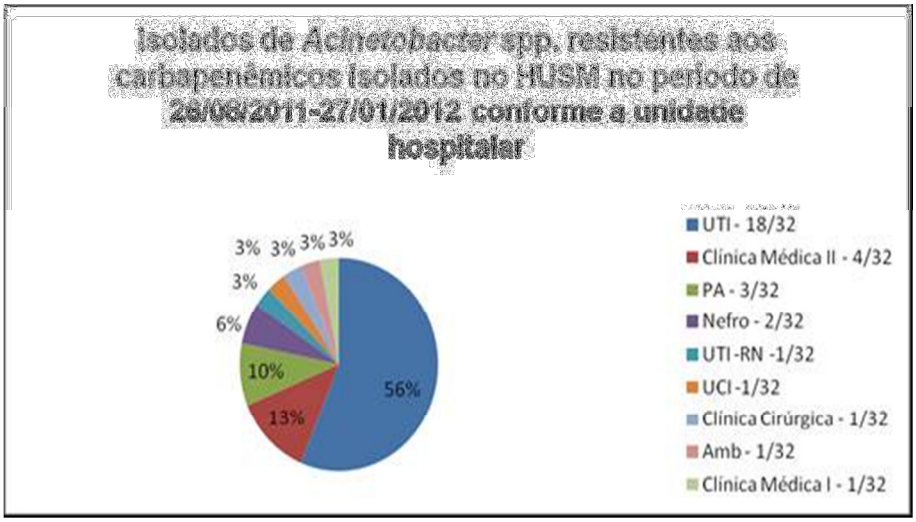
Resultados

No período de estudo foi encontrado 58 amostras de BGN-NF resistentes aos carbapenêmicos, sendo 27 de *Acinetobacter baumannii*, 4 de *Acinetobacter* spp. e 1 de *Acinetobacter lwoffi* e 26 de *P. aeruginosa*, provenientes de diversas amostras clínicas de pacientes internados no HUSM.

Os materiais clínicos dos quais os isolados de *Acinetobacter* spp. provieram foram secreções respiratórias 71,8% (23/32), seguida de secreções em geral (que incluem: ponta de cateter; escaras; swab de membro inferior esquerdo; secreção de pé diabético) 18,8% (6/32), urina 6,2% (2/32) e sangue 3,1% (1/32).

Na Figura 1 podemos visualizar o percentual de isolamento de *Acinetobacter* spp. de acordo com as diferentes unidades hospitalares, sendo que na UTI adulto ocorreu o isolamento do maior número de *Acinetobacter* spp. com 56,2% (18/32) dos casos.

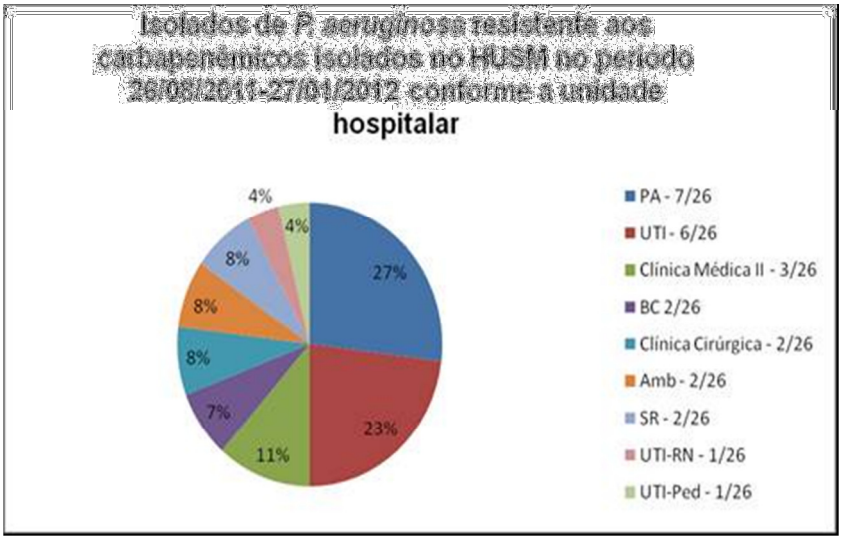
Figura 1 - Distribuição do *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos isolados no HUSM no período de 26/08/2011-27/01/2012 conforme a unidade hospitalar.



Para a *P. aeruginosa,* os sítios, foram: secreções respiratórias 53,7% (14/26), sangue 26,9% (7/26), secreções em geral (que incluem: secreção de cateter; secreção biliar; drenagem de tórax; secreção peritoneal) 15,4% (4/26) e urina 3,8% (1/26).

Na Figura 2 encontra-se ilustrada a distribuição dos isolados de *P. aeruginosa* conforme unidade de internação hospitalar. As unidades que apresentaram maior número de isolamentos de *P. aeruginosa* foi o Pronto Atendimento (PA) com 26,9% (7/26) seguido da UTI adulto com 23,0% (6/26) dos casos.

Figura 2 - Distribuição de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isoladas no HUSM no período de 26/08/2011-27/01/2012 conforme a unidadehospitalar.



Na Tabela 1 encontra-se o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados para os isolados de *Acinetobacter* spp..

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade dos 32 isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos

Antimicrobiano[a]	Sensíveis, n (%)	Intermediários, n(%)	Resistentes, n (%)
Tetraciclina(B)	19 (59,4)	11 (34,4)	-
Polimixina B (O)	8 (100,0)	-	-
Meropenem (A)	2 (6,2)	-	30(93,7)
Ampicilina-Sulbactam (A)	2 (6,2)	3 (9,4)	26 (81,2)
Amicacina (B)	1 (3,1)	-	31 (96,9)
Levofloxacino (A)	1 (3,1)	-	28 (87,5)
Ticarcilina-Ácido Clavulânico (B)	-	2 (6,2)	27 (84,4)
Tobramicina (A)	-	1 (3,1)	27 (84,4)
Imipenem (A)	-	1 (3,1)	11 (34,4)
Cefepime (B)	-	-	30 (93,7)
Cefotaxima (B)	-	-	29 (90,6)
Ceftazidima (A)	-	-	32 (100,0)
Ceftriaxona (B)	-	-	32 (100,0)
Ciprofloxacino (A)	-	-	31 (96,9)
Gentamicina (A)	-	-	30 (93,7)
Sulfametozaxol –Trimetropim (B)	-	-	30 (93,7)

[a]Grupo a que pertence o antimicrobiano, de acordo com o CLSI 2012.
Grupo A - primeira escolha, testados e reportados na rotina
Grupo B – primeira escolha, testados e reportados seletivamente, agentes importantes principalmente em infecções nosocomiais;
Grupo O - outros não rotineiramente utilizados

Na Tabela 2 podemos visualizar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados dos isolados de *P. aeruginosa* que fazem parte deste estudo.

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade dos 26 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos

Antimicrobiano[a]	Sensíveis, n (%)	Intermediárias, n (%)	Resistentes, n (%)
Polimixina B (O)	18 (100,0)	-	-
Ciprofloxacino (B)	16 (61,5)	-	10 (38,5)
Tobramicina (A)	16 (61,5)	-	10 (38,5)
Levofloxacino (B)	15 (57,7)	-	10 (38,5)
Amicacina (B)	13 (50,0)	-	12 (46,1)
Pìperacilina-Tazobactam (B)	12 (46,1)	-	14 (53,8)
Cefepime (B)	10 (38,4)	6 (23,1)	9 (34,6)
Gentamicina (A)	10 (38,4)	4 (15,4)	11 (42,3)
Norfloxacino (U)	10 (38,4)	-	-
Aztreonam (B)	7 (26,9)	2 (7,7)	-
Ceftazidima(A)	6 (23,1)	3 (11,5)	16 (61,5)
Meropenem (B)	5 (19,2)	5 (19,2)	13 (50,0)
Imipenem (B)	1 (3,8)	3 (11,5)	20 (76,9)
Cefotaxima (A)	-	1 (3,8)	11 (42,3)
Ceftriaxona (B)	-	-	2 (7,7)

[a]Grupo a que pertence o antimicrobiano, de acordo com o CLSI 2012.
Grupo A - primeira escolha, testados e reportados na rotina
Grupo B – primeira escolha, testados e reportados seletivamente, agentes importantes principalmente em infecções nosocomiais;
Grupo O - outros não rotineiramente utilizados
Grupo U – teste suplementar para urina

A identificação da resistência frente aos carbapenêmicos para o *Acinetobacter* spp. foi realizada, em 29/32 (90,6%) dos isolados por sistema automatizado (MicroScan® - SIEMENS) e o restante, pelo método convencional de difusão do disco 3/32 (9,4%); para os isolados de *P. aeruginosa* 13/26 (50,0%) foram identificados pelo método automatizado e os restantes 50,0% pelo método convencional.

Discussão

No mundo todo, o aumento na prevalência de infecções hospitalares causadas por microrganismos multirresistentes, principalmente *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* comprometeu a seleção adequada do tratamento, ocasionando com isso um aumento na morbiletalidade.[3,5,6,15]

Acinetobacter spp. é um patógeno oportunista que pode causar, desde infecções leves até mais severas, sendo frequentemente envolvido como agente etiológico de infecções do

trato respiratório. [16] Conforme estudo realizado por Ferreira et al. [17]o *Acinetobacter* sp. foi mais frequentemente isolado no aspirado traqueal com 26%, seguido por escarro com 20%, sangue 13%, na urina com 9%, cateter 8%, secreções 6% e queimaduras 4%. Em nosso estudo, nas secreções respiratórias o *Acinetobacter* spp. foi o microrganismo mais isolado (71,8%), seguido das secreções em geral (18,8%), das Infecções do Trato Urinário (ITUs) (6,2%) e corrente sanguínea (3,1%).

Em relação a unidade de isolamento, uma pesquisa no hospital Geral de Fortaleza, realizada por Pontes et al.[18] constatou que a UTI adulto possuía a maior prevalência de *Acinetobacter baumannii* com (42,0%), dado semelhante ao encontrado em nosso estudo (56,2%). Esta unidade devido a gravidade das doenças, ao tempo prolongado de internação, e aos procedimentos invasivos torna-se um local de crescente isolamento deste tipo de microrganismo. [19]

Nosso estudo identificou um grande isolamento de *P. aeruginosa* nas secreções respiratórias 53,9% (14/26), seguido de infecções da corrente sanguínea 26,9% (7/26%), secreções em geral 15,4% (4/26) e urina 3,8% (1/26). Resultados da rede de vigilância *National Healthcare Safety Network* (NHSN) citam a *P. aeruginosa* como sendo o segundo agente etiológico mais importante em Pneumonias Associadas a Ventilação (VAP) e o quarto em infecções urinárias causadas por cateter urinário. [20] Em outro estudo realizado por Marques e colaboradores [21]em Belém do Pará, foi observado maior isolamento de *P. aeruginosa* na urina (34,1%), seguido de secreções em geral (27,1%), lavado brônquico (21,2%), cateter central de curta permanência (9,4%), sonda e escarro (3,5%) e hemocultura (1,2%).

A *P. aeruginosa,* em nossa pesquisa, teve seu isolamento mais frequente no Pronto Atendimento (PA) (26,9%) dos casos, seguido da UTI adulto (23,0%). Um estudo realizados por Teixeira et al. [22]em Porto Alegre (RS), mencionam que o pronto socorro é uma importante

via de admissão de pacientes graves que requerem maior número de procedimentos invasivos aumentando dessa forma os riscos para contrair infecção por bactérias multirresistentes.

Torna-se importante o conhecimento do perfil de sensibilidade de bactérias como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. pois a resistência aos carbapenêmicos está crescendo e as opções terapêuticas são limitadas dificultando assim a erradicação da infecção provocada por esses microrganismos. [23,24]

No nosso estudo, os isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos mostraram-se 59,4% sensíveis à tetraciclina. Em outro estudo realizado por Figueiredo et al.[6] em Niterói (RJ), encontrou 71,9% de sensibilidade frente à tetraciclina.

Todos os isolados de *Acinetobacter* spp. e de *P. aeruginosa* do presente estudo foram sensíveis à polimixina B. Monteiro et al.[25] na Espanha, encontrou somente 57,0% de sensibilidade a este antibacteriano, frente aos isolados de *Acinetobacter* spp.. Em pesquisa, no hospital São José dos Campos (SP), realizada por Alves et al. [26]todos os isolados de *P. aeruginosa* dos pacientes da UTI adulto também foram sensíveis à polimixina B.

Em nossa pesquisa frente a classe das fluorquinolonas, *P. aeruginosa* apresentou 61,5% de sensibilidade para ciprofloxacino e 57,7% para levofloxacino; Figueiredo et al.[27] em Recife (PE), encontrou 49,7% de sensibilidade ao ciprofloxacino entre as cepas de *P. aeruginosa* de seu estudo.

Para os isolados de *P. aeruginosa* do nosso estudo, frente aos aminoglicosídeos foi observado 61,5% de sensibilidade à tobramicina e 50,0% à amicacina; Almeida et al. [28]em Belém, encontrou 41,7% dos isolados de *P. aeruginosa* sensíveis à tobramicina. Figueiredo et al.[27] no Recife (PE), encontrou uma taxa de 59,4% de sensibilidade desse microrganismo, frente à amicacina.

As polimixinas tiveram seu uso restrito no início dos anos de 1980, devido a sua toxicidade, especialmente à sua nefrotoxicidade; porém com o aumento da resistência

bacteriana e devido às limitações terapêuticas, pelo pequeno investimento da indústria farmacêutica no arsenal de antimicrobianos, estes agentes ressurgiram para o tratamento de infecções, especificamente as ocasionadas por *Acinetobacter* spp. e *P.aeruginosa* multirresistentes.[4] No entanto, já existem relatos de resistência a este fármaco. [29]

Em relação ao tratamento de microrganismos multirresistentes, a nota técnica nº1 de 2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a terapia polimicrobiana, com a utilização de uma polimixina (B ou E) acrescida de um aminoglicosídeo, carbapenêmico, ou tigeciclina para isolados de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. [30]

Nos últimos anos, o aumento na frequência de isolamento a nível hospitalar, de microrganismos resistentes às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações levou ao aumento na utilização de antimicrobianos β-lactâmicos mais potentes, como os carbapenêmicos. Este tipo de pressão selecionou as bactérias mais resistentes a produzir mecanismos multifatoriais, como a redução na expressão de porinas, aumento na expressão da bomba de efluxo, entre outros.

Atualmente, atribui-se à produção das enzimas carbapenemases como a principal responsável pela resistência nos BGN-NF aos carbapenêmicos. No presente estudo, os isolados de *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* apresentaram maior prevalência nas secreções respiratórias e em unidades críticas como UTI e PA, entre os antimicrobianos testados, não foi encontrada nenhuma resistência à polimixina B, podendo este antimicrobiano constituir como tratamento de pacientes graves, infectados por estes microrganismos em nosso nosocômio.

Conhecer os padrões nosocomiais locais de resistência bacteriana é de importância significativa, tanto para diminuir a morbidade e letalidade dos pacientes graves internados principalmente nas UTIs quanto como medida auxiliar no controle do aparecimento de microrganismos multirresistentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a toda a equipe de funcionários do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Referências

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

2. Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metalo-ß-lactamases. J Bras Patol Med Lab.2006; 42:103-13.

3. Laranjeira VS, Marchetti DP, Steyer JR, Corção G, Picoli SV. Pesquisa de *Acinetobacter*sp.e*Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo-ß-lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43:462-64.

4. Karageorgopoulos DE, Falagas M.E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Lancet Infect Dis. 2008; 8:751-62.

5. Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia 4ª.ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 359-68.

6. Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, Teixeira LM, Mondino SSB. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. J Bras Patol Med Lab. 2009; 45:177-84.

7. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007; 5:939-51.

8. Graf T, Fuentefria D B, Corção G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de matalo- ß-lactamases bla_{SPM-1} em amostras clínicas. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41:306-8.

9. Tsai HT, Wang JT, Chen CJ, Chang SC. Association between antibiotic usage and subsequent colonization or infection of extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a matched case-control study in intensive care units. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 62:298-305.

10. Deris ZZ, Harun A, Omar M, Johari M R. The prevalence and risk factors of nosocomial *Acinetobacter* blod stream infections in tertiary teaching hospital in north-eastern Malaysia. Trop Biomed. 2009; 26:123-29.

11. Lee k, Lern YS, Young D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA Double-disk synergy test for differentianting metallo-ß-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2003; 41:4623-29.

12. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect. 2009; 73:355-63.

13. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibily testing; twenty-first Informational Supplement (M100-S21).USA; 2011.

14. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibily testing; twenty-second Informational Supplement (M100-S22). USA; 2012.

15. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:1681-88.

16. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* Species. Em Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Pratice of Infectious Diseases 6ª edição. New York: Churchill Levingstone. 2005; 2632-36.

17. Ferreira AE, Marchetti DP, Cunha GR, Oliveira LM, Fuentefria DB, Dall-Bello AG, Barth AL, Corção G. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. From hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil.Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44:725-30.

18. Pontes VMO, Menezes EA, Cunha FA, Ângelo MRF, Salviano MNC, Oliveira IRN. Perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos nas unidades de terapia intensiva e semi-intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. RBAC. 2006; 38:123-26.

19. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and economic impact f common multidrug-resitant gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:813-21.

20. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollack DA et al.NHSN annual update antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections annual sumary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Diasease Control and Prevention, 2006-2007.Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29:996-1011.

21. Marques PB, Vieira ABR, Farias MG, Silva ROF, Vieira JMS. Perfil de suscetibilidade à antibióticos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no centro de diagnóstico Unimed Belém – Pará. RBAC. 2007; 39:175-77.

22. Teixeira PLZ, Hertz FT, Cruz DB, Caraver F, Hallal RC, Moreira JS. Pneumonia associada a ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. J Bras Pneumol. 2004; 30:540-48.

23. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumanni*: epidemiology antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis. 2008; 46:1254-63.

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

25. Monteiro JG, Leyba CO, Jiménez-Jiménez AE, Almodóvar AEB, Garmrndia JLG, Wittell MB, Lara SLG, Osuna JM. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilador associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A comparision with imipenem suscetible VAP. Clin Infect Dis .2003; 36:1111-15.

26. Alves LNS, Oliveira CR, Silva LAP, Gervásio SMD, Alves SR, Sgavioli, GM. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microrganismos e perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em unidade de terapia intensiva. J Health Sci Inst. 2012; 30:44-7.

27. Figueiredo EAP, Ramos H, Maciel MAV, Vilar MCM, Loureiro NG, Pereira RG. *Pseudomonas aeruginosa*: freqüência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. Rev Bras Ter Intensiva. 2007; 19:421-27.

28. Almeida MGC, Chase SAN, Coelho, MZR, Damasceno CEC, Dolabela MF. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar e ambulatorial oriundas de laboratórios público e privado, em Belém, estado do Pará. RBAC. 2012; 44:44-9.

29. Zavascki AP, Goldani LZ Li, J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.J Antimicrob Chemother. 2007; 60:1206-15.

30. Brasil. Nota Técnica N° 1/2013 – Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. *Ag Nacional de Vigilância Sanitária*, 2013.

3 DISCUSSÃO GERAL

P. aeruginosa e Acinetobacter spp. representam os agentes etiológicos mais frequentes em IRAS (BERTONCHELI, 2008). Estes microrganismos causam uma série de infecções graves, podendo evoluir ao óbito quando acometem pacientes imunodeprimidos como os de UTIs (MACHADO, 2011). Informações sobre o perfil de sensibilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. contribuem significativamente para a minimização das taxas de resistênciabem comoevita o uso indiscriminado de antimicrobianos.

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural e antigo, nos dias atuais o aumento desta entre bactérias patogênicas tem sido o resultado da aquisição de genes a partir de reservatórios ambientais e animais (GALÁN et al., 2013). Muitos genes de resistência aos antibióticos de diversas classes como tetraciclinas, aminoglicosídos, macrolídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, vancomicina, e β-lactâmicos foram detectados em alguns locais do mundo em diferentes ambientes desde água, solo, animais selvagens até animais de estimação através de técnicas de biologia molecular, podendo estes genes ser transmitido direta ou indiretamente aos seres humanos (BAQUERO; MARTINEZ; CANTÓN, 2008; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009). Um exemplo disto é a identificação do gene que codifica a carbapenemase OXA-23 no gênero *Acinetobacter* na microbiota intestinal de bovinos na França (POIREL et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* deve-se ao fato deste microrganismo apresentar diversos mecanismos de resistência intrínsecos e extrínsecos (LIVERMORE, 2002), enquanto que no gênero *Acinetobacter* a resistência se apresenta por mecanismos intrínsecos e outros adquiridos através de plasmídeos e transposons (FOURNIER; RICHET, 2006). Entre os principais mecanismos de resistência que os BGN-NF podem apresentar, podemos referir a impermeabilidade aos antimicrobianos (perda de porina), a alteração do sítio de ação (modificação das proteínas ligadoras de penicilinas) e a produção de β-lactamases (enzimas capazes de hidrolisar o anel β-lactâmico) (BUSH, 2001; WALSH, 2005).

Em vista do fato da resistência em BGN-NF ser um problema atual, a escolha de antimicrobianos eficazes para o tratamento de infecções é um desafio árduo para a equipe médica, principalmente pela disseminação destas bactérias MDRs e ausência de novas opções terapêuticas (SADER; GALES, 2008). Nos hospitais brasileiros, segundo estudo desenvolvido por Gales e colaboradores (2012) a proporção do mecanismo de ESBL é

superior do que em países da Europa e Estados Unidos. Outro mecanismo de resistência que está se tornando um grave problema de saúde pública em todo o mundo é a resistência aos carbapenêmicos (SOULI; GALANI; GIAMARELLOU, 2008; HINGGINS et al., 2010). No Brasil, já existem estudos em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. relacionados a este assunto (GALES, 2003; FERREIRA, 2011).

A elevada resistência aos carbapenêmicos nos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. no HUSM permite afirmar que, esta classe de antimicrobianos não pode ser exclusivamente utilizada no tratamento de infecções por estes microrganismos e, como sugere a Nota Técnica 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o emprego da politerapia baseada no perfil de sensibilidade com utilização da polimixina B ou E em associação com aminoglicosídeos, carbapenêmicos e tigeciclina é uma alternativa favorável para o tratamento de infecções de microrganismos multirresistentes (BRASIL, 2013b).

Os resultados de perfil de sensibilidade apontados neste estudo evidenciam que os isolados de *P. aeruginosa* avaliados pelo método da difusão do disco apresentam-se bastante sensíveis à polimixina B, tobramicina, levofloxacino e ciprofloxacino, o que também é verificado quando observamos o perfil dos isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. No entanto, o gênero *Acinetobacter* destaca-se nesta pesquisa por apresentar elevada multirresistência aos antimicrobianoscomo amicacina, cefepime e cefotaxima. As polimixinas por possuírem um grande espectro de ação contra um número elevado bactérias de importância clínica como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Enteobacter* spp. e os BGN-NF como o *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, apesar de suas propriedades nefrotóxicas e neurotóxicas reaparecem como uma alternativa eficaz para o tratamento de cepas MDRs (ZAVASCKI et al., 2007).

O conhecimento do perfil de sensibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. no HUSM evidencia que estes microrganismos apresentam elevada resistência aos antimicrobianos. Esse tipo de resistência bacteriana não é exclusivamente um problema local (FIGUEIREDO et al., 2009; FRANCO et al., 2010). Uma medida adequada na tentativa de contê-la, seria traçar ações coletivas entre profissionais atuantes no sistema de saúde com vistas a implementar novas políticas e práticas que assegurem o uso criterioso de antimicrobianos no controle das infecções além de elaborar conjuntamente com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) *guidelines* que envolvam o diagnóstico e o tratamento das doenças infecciosas por estes microrganismos, produzindo assim, efeito direto

na saúde pública, minimizando taxas de morbidade, mortalidade e custos no sistema de atendimento.

4 CONCLUSÕES

- Os isolados de *P. aeruginosa* se mostraram mais sensíveis que os isolados de *Acinetobacter* spp. frente aos antimicrobianos testados;
- O pronto atendimento e o ambulatório foram as unidades em que *P. aeruginosa* foi mais frequentemente isolada e a UTI os *Acinetobacter* spp.;
- Considerando os espécimes clínicos, a maior prevalência de isolamento de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. foram as secreções respiratórias;
- O mecanismo de AmpC cromossômica, pesquisado através do teste fenotípico de indução de beta-lactamase do Grupo 1, somente foi detectado em *P. aeruginosa* (68,2%);
- Nenhuma das amostras apresentou beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) avaliado pelo teste do sinergismo ou da aproximação dos discos;
- Entre as *P. aeruginosa,* 57,1% apresentaram sensibilidade simultânea ao imipenem e meropenem, sendo que as cepas resistentes a estes carbapenêmicos foram 100,0% sensíveis à polimixina B e 61,5% à tobramicina,
- No gênero *Acinetobacter* somente 15,4% foram sensíveis ao imipenem e 17,9% ao meropenem, mas as amostras resistentes a esta classe apresentaram 100,0% de sensibilidade à polimixina B e 59,4% à tetraciclina,
- A UTI e o pronto atendimento foram as unidades hospitalares em que as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos foram mais isoladas e a UTI prevaleceu o maior isolamento de *Acinetobacter* spp.*;*
- A maior freqüência de isolamento de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos foi nas secreções respiratórias.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D. et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal Bacteriology,** v. 190, p. 8053–8064, 2008.

AMBLER, R. P. The structure of β-lactamase. **Philosopcal Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 289, n. 36, p. 321-331, 1980.

BAQUERO, F.; MARTINEZ,J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion.Biotechnology**, n. 19, p. 260–265, 2008.

BEIRAO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal Infect Diseases,** v. 15, n. 1, p. 69-73, 2011.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo-β-lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p.577-599, 2008.

BERTONCHELI, C. M.; **Identificação de Metalo-beta-Lactamases em Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores Isolados no Hospital Universitário de Santa Maria.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Santa Maria, 2008.

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. S49-S56, 2006.

BOO, T. W.; WALSH, F.; CROWLEY, B. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** p. 1101-1102, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota técnica N°1/2010.** Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes de 25/10/2010.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. 9 volumes, 2013a. 150 p.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota Técnica N° 1/2013**. Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. 17de abril de 2013b.

BUSH, K. ; JACOBY, G. A ; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β-Lactamases and Its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K. New β-lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of Beta-lactamases. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**.v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CARTER, M. W. et al. Detection of extended-spectrum β-lactamases in *Klebisiella* with the Oxoid Combination Disk Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4228-32, 2000.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β-lactamase gene, bla GIM-1, encoding a new subclass of metallo-β-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654-4661, 2004.

CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, n. 16; v. 11, 2010.

CERQUEIRA, G. M.; PELEG, A. Y. Insights into *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1055–1060, 2011.

COUDRON, P. E.; MOULAND, E. S.; THOMSON, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Eschericiha coli, Klebisiella pneumoniae, and Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1791-96, 2000.

DAVIS, K. A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1218-1224, 2005.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, n. 5, p. 939-951, 2007.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of β-lactamases Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

FERREIRA, A. E. et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 725-730, 2011.

FIGUEIREDO, D. Q. et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 177-84, 2009.

FOURNIER, P. E. ; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 42, p. 692-699, 2006.

FRANCO, M. R. G. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital. **CLINICS**, v. 65, n. 9, p. 825-829, 2010.

GALÁN, J. C. et al. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β-lactamases world. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Journol Antimicrobiol Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

GALES, A. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (Latin America, 2008–2010).**Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 73, p. 354-360, 2012.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli.**Clinical Infectious Diseases**, n. 41:848-54, 2005.

GILLHAM, M. I. et al. Variable antibiotic susceptibility in populations of *Pseudomonas aeruginosa* infecting patients with bronchiectasis.**Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 728–732, 2009.

HEAD, N. E.; YU, H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. **Infect and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 133-44. 2004.

HIGGINS, P. G. et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journol Antimicrobiol Chemotherapy**, v. 65, p. 233–238, 2010.

HOGARDT, M. et al. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1057–61, 2004.

HOUANG, E. T. S. et al. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 228-234, 2001.

JÁCOME, P. R. L. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 707-712, 2012.

JALIER, V. et al. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Infectious Diseases**, n. 10, v. 4, p. 867-78, 1988.

JEAN, S. S. et al. Antimicrobial susceptibilities among clinical isolates of extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria in a Taiwanese University Hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 69-76, 2002.

KIPNIS, E.; SAWA T.; WIENER-KRONISH J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 36,p. 78–91, 2006.

KONEMAN, et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido/**Washington C. Winn Jr. [*et al*.] ; revisão técnica Eiler Fritsch Toros ; tradução Eiler Fritsch Toros [et al.]. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

KURAHASHI, K. et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia**. Journal of Clinical Investigation,** v. 104, n. 6, p. 743-50, 1999.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of bla $_{VIM}$, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEE, K.; 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 Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LEE, H. W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology Infect**, v. 14,p. 49–54, 2008.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases,** v. 34, p. 634-40, 2002.

LIVERMORE, D.M. β-lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LOEHFELM, T. W.; LUKE, N. R.; CAMPAGNARI, A. A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 1036–1044, 2008.

MACHADO, G. M., et al. Occurrence and the susceptibility to antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. at a tertiary hospital in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 168-172, 2011.

MARTINS, N. et al. Severe infection in a lung transplant recipient caused by donor transmitted carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, n. 3, p. 316-20, 2012.

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

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Brazilian Journal of Pathology and *Laboratory* Medicine**, v. 47, n. 1, p. 25-31, 2011.

MOOSDEEN, F. The evolution of resistance to cephalosporins.**Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 487-493, 1997.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 960 p.

NEVES, P. R., et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**,v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NORDMAN, P.; MAMMERI, H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. **Future Microbiology**, v. 2, p. 297-307, 2007.

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

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Estended-Spectrum β-Lactamase: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-86, 2005.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacterbaumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PEREZ, L. R.; BARTH, A. L. Biofilm production using distinct media and antimicrobial susceptibility profile of Pseudomonas aeruginosa. **Brazilian Journal Infect Diseases**, v. 15, n. 4, p. 301-4, 2011.

PITOUT, J. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, p. 657-69, 2008.

POIREL, L. ; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.

POIREL, L. et al. Carbapenemase producing *Acinetobacter* spp. in cattle France. **Emerging Infectious Diseases**, n. 18, p. 523-25, 2012.

POOLE, K. Resistance to β-lactam antibiotics.**Cellular and Molecular Life Sciences**,v. 61, n. 17,p. 2200-23, 2004.

RICE, L. B. Challenges in identifying new antimicrobial agents effetctive for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, suppl. 2, p.S100-S105, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana:** interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.

SADER, H.; GALES, A. C. Treatment of severe infections in the era high rates of antimicrobial resistance. **The Brazilian Jounal Infectiuos Diseases**, v. 5 n. 4, p. 1028-33, 2008.

SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumonia* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 70, n. 2, p. 274-7, 2011.

SMITH, M. G. et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. **Genes & Development**, v. 21, p. 601–614, 2007.

SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug – resistant and pandrug - resistant Gram – negative bacilli in Europe. **Eurosurveillance**, v. 13, n. 47, p. 1-11, 2008.

TENOVER, F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, suppl. 3, p. S108-S115, 2001.

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**, v. 50, p. 673-679, 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e pesquisa. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses**: MDT. 8. ed.Santa Maria: Ed. UFSM, 2012.

WALSH, T. R. et al. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WALSH, T.R. The emergence and implications of metallo-β-lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology andInfection**, v. 11, suppl.6, p. 2-9, 2005.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy,** v. 35, n. 1, p. 147-151, 1991.

YONG, D. et al. A novel sub-group metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. In 47th Interscience Conferencein Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), n. C1-539.Chicago, USA, 2007.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, *bla* $_{\text{NDM-1}}$, and a novel erythromicyn esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAVASCKI, Alexandre P. **Fatores de risco para aquisição de Pseudomonas aeruginosa resistente a Imipenem em pacientes hospitalizados**. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado. em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

ZAVASKI, A. P. et al. Polymyxin B for the treatament of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, n. 60, p. 1206-15, 2007.

ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal Antimicrobial Agents,** v. 34, n. 3, p. 286-8, 2009.

ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? **International Journal Infectious Diseases,** v. 14, n. 6, p. 539-40, 2010.

ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. Antibiotic resistance genes in water environment.**Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 82, p. 397-414, 2009.