

**Sandra Terezinha Rodrigues Nora**

**Diversidade genética de *Pseudomonas aeruginosa*  
isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose  
cística**

**São Paulo  
2014**

**Sandra Terezinha Rodrigues Nora**

**Diversidade genética de *Pseudomonas aeruginosa*  
isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose  
cística**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Área de Concentração: Pesquisas laboratoriais em Saúde Pública (PLSP) para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Doroti de Oliveira Garcia

**São Paulo  
2014**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Nora, Sandra Terezinha Rodrigues

Diversidade genética de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística / Sandra Terezinha Rodrigues  
Nora - São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientadora: Doroti de Oliveira Garcia

1. Fibrose cística
2. *Pseudomonas aeruginosa*
3. Testes de sensibilidade microbiana
4. Resistência microbiana à medicamentos
5. Eletroforese em gel de campo pulsado
6. Variação genética

SES/CCD/CD-283/13

# DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Antonio (in Memoriam) e Thereza, a minha filha Giovana, a minha irmã Denize, e ao Bruno pelo carinho, amor e incentivo.*

*Aos meus amigos Marta, Manoel, Marcelo por todo apoio, carinho e acolhimento.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus anjos protetores e a Deus por iluminar minha jornada com sabedoria, harmonia e coragem para ultrapassar todos os obstáculos do caminho.

Agradeço à minha orientadora Doroti de Oliveira Garcia, por toda a experiência compartilhada, auxílio e atenção com que conduziu o meu trabalho e pela amizade.

Agradeço aos pacientes que com sua autorização tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira Silva Filho parceiro no projeto.

Agradeço ao pesquisador Dr. Carlos Henrique Camargo pelo auxílio na construção dos dendrogramas.

Agradeço as colegas de mestrado Gabriela e Maria Fernanda pelo auxílio com a realização e análise dos PCRs e sequenciamento de DNA.

Agradeço à Secretaria da Pós-Graduação, a Tirces e a Carol pela amizade e prestatividade.

Agradeço às chefias e colegas do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz pela ajuda, amizade e informações técnicas para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todos os que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Fibrose cística é uma doença genética grave, de herança autossômica recessiva e caracterizada por uma alteração nas secreções das glândulas exócrinas de todo o organismo, resultando principalmente em doença pulmonar obstrutiva crônica progressiva. Pacientes portadores de fibrose cística são frequentemente acometidos por infecções pulmonares causadas por microrganismos específicos. *Pseudomonas aeruginosa* é o microrganismo mais prevalente, e coloniza cerca de 70% dos pacientes adolescentes e adultos. Os danos ao pulmão aumentam quando *P. aeruginosa* adquire o fenótipo mucóide. Resistência bacteriana também tem aumentado, sendo relatada a emergência da resistência aos carbapenêmicos. Alguns centros de fibrose cística relatam disseminação de *P. aeruginosa* entre os pacientes e outros centros relatam grande variabilidade entre os isolados e não identificam transmissão entre os pacientes, o que pode indicar a aquisição ambiental ao invés de uma fonte comum. Este estudo buscou avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos frente a *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística atendidos no Ambulatório do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e analisar a variabilidade genética entre os diversos isolados bacterianos de vários pacientes. Um total de 580 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos de 98 pacientes em três períodos de coleta diferentes, destes, 129 isolados de 11 pacientes foram selecionados e analisados. Os isolados foram submetidos ao teste de disco-difusão frente a 14 antimicrobianos. Os isolados que apresentaram resistência ao imipenem foram submetidos à pesquisa fenotípica de metalo-beta-lactamase e pesquisa genotípica para carbapenemases *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>GES</sub>. O isolado 420-2 com perfil fenotípico suspeito de produção de ESBL foi submetido à pesquisa genotípica dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>. Os isolados que apresentaram resistência à amicacina foram submetidos a pesquisa fenotípica de metilases 16S rRNA e pesquisa

genotípica para *rmtD* e *rmtG*. O perfil de sensibilidade e o perfil de restrição apresentou variabilidade. Foram encontrados 35 perfis de restrição diferentes em 11 pacientes, sendo que somente um paciente apresentou um único perfil de restrição, os outros tinham ao menos dois perfis de restrição. Alguns isolados apresentaram 100% de sensibilidade, outros apresentaram resistência somente a um antimicrobiano e ainda houve aqueles que apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano, porém não houve isolados com 100% de resistência frente aos antimicrobianos testados. Foram evidenciados fenotipicamente isolados com suspeita de produção de MBL e isolados com suspeita de produção de metilases 16S rRNA. PCRs utilizando primers específicos para *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *rmtD* obtiveram resultados negativos. Sete isolados que apresentaram alto nível de resistência aos aminoglicosídeos foram confirmados por PCR e sequenciamento de DNA como produtores de RmtG, uma nova metilase 16S rRNA, recentemente descrita. PCRs para a detecção de ESBL foram negativos. Os perfis de restrição e os perfis de sensibilidade não apresentaram relação direta, uma vez que perfis de restrição diferentes apresentaram perfis de sensibilidade iguais, e perfis de restrição idênticos apresentaram perfis de sensibilidade diferentes. A partir dos resultados obtidos pela análise genotípica foi demonstrada a diversidade genética de *P. aeruginosa* e dois pacientes apresentaram o mesmo perfil de restrição de PFGE. Diversos pacientes permaneceram colonizados pelo mesmo clone ao longo do tempo.

## ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is a serious genetic disease, an autosomal recessive disorder, characterized by an alteration in the secretion of the exocrine gland of all organism, resulting mainly in obstructive chronic progressive lung disease. CF patients are frequently attacked by lung infections caused by specific microorganisms. *Pseudomonas aeruginosa* is the most prevalent microorganism, and colonizes approximately 70% of adolescents and adults CF patients. The damage to the lung increases when *P. aeruginosa* acquires mucoid phenotype. Antimicrobial resistance has also been increased and the emergence of resistance to carbapenems has been related. Some CF centers reported the dissemination of *P. aeruginosa* among CF patients and other centers demonstrated the large variability among the isolates not detecting transmission among the CF patients, which can indicate an environmental acquisition instead of a common source. The aims of this study were to evaluate the susceptibility to antimicrobial agents of *P. aeruginosa* isolates recovered from respiratory tract of CF outpatients attending the outpatient clinic of Instituto da Criança (University of São Paulo Medical School) and to analyse the genetic variability among *P. aeruginosa* isolates recovered from diverse CF patients. A total of 580 *P. aeruginosa* isolates were recovered from 98 CF patients during three different periods of collection, 129 of these isolates obtained from 11 CF patients were selected and analysed. *P. aeruginosa* isolates were submitted to the disk-diffusion method testing 14 antimicrobial agents. *P. aeruginosa* isolates which presented resistance to imipenem were submitted to the phenotypical test to detect the production of metallo-beta-lactamases, PCR for carbapenemase were carried-out by using specific primers to detect the *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub> genes. The Isolate 420-2 with phenotypic profile suspected of ESBL-producing was submitted to PCR using specific primers to detect *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes. *P. aeruginosa* isolates which presented resistance to amikacin were submitted to the



phenotypical test to detect the production of 16S rRNA methylases, and the isolates confirmed as positive were submitted to PCR, using specific primers to detect the *rmtD* and *rmtG* genes. The susceptibility and PFGE restriction profiles showed large variability. Thirty-five different PFGE profiles obtained from *P. aeruginosa* recovered from 11 CF patients were found, only one CF patient carried *P. aeruginosa* isolates with the same PFGE restriction profile along the time, and the others CF patients carried *P. aeruginosa* isolates with at least two different PFGE profiles. Some *P. aeruginosa* isolates presented 100% of susceptibility to antimicrobial agents, some presented resistance to only antimicrobial agent while other showed multiresistance, however, none of them showed 100% of resistance to all antimicrobial agents. Some *P. aeruginosa* isolates were phenotypically confirmed as suspicious of MBL producers and other as 16S rRNA methylases producers. PCRs using specific primers for *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>* and *rmtD* were negative. Seven isolates exhibiting high-level resistance to aminoglycosides was confirmed by PCR and DNA sequencing as producers *rmtG*, a new 16S rRNA methylase, recently described. PCRs for detection of ESBL were negative. PFGE restriction and susceptibility profiles do not presented an association, once that different PFGE restriction profiles presented identical susceptibility profiles and identical PFGE profiles presented different susceptibility profiles. Our results demonstrated the genetic diversity of *P. aeruginosa* and two patients had the same PFGE profile restriction. Diverse CF patients remained colonized by the same clone along the time.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsado
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CTC-IAL	Conselho Técnico Científico – Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL	Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz
ATCC	American Type Culture Collection
ESBL	Beta Lactamase de Espectro Estendido
TSA	Tryptic Soy Agar
NaCl	Cloreto de Sódio
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CDC	Centers For Disease Control and Prevention
TSB	Tryptic Soy Broth
RPM	Rotação por Minuto
TBE	Tris-EDTA-Ácido Bórico
MBL	Metalo-Beta-Lactamase
ABRAM	Associação Brasileira de Mucoviscidose
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
MH	Müller-Hinton
TE	Tris EDTA
IMP	Imipenem
MER	Meropenem
AK	Amicacina
GEN	Gentamicina
NET	Netilmicina
TOB	Tobramicina
CAZ	Ceftazidima

FEP	Cefepima
ATM	Aztreonam
TIM	Ticarclina/Ácido Clavulânico
PPZ	Piperacilina/Tazobactam
LEV	Levofloxacina
CIP	Ciprofloxacina
PB	Polimixina B
PCR	Reação Polimerase em Cadeia

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas Beta-lactamases segundo Ambler (1980) e Bush, Jacoby e Medeiros (1995). .....	23
Tabela 2: Perfil de Sensibilidade (Disco – difusão) de <i>P. aeruginosa</i> (n=129) isoladas de pacientes com fibrose cística frente a diversos antimicrobianos, em três períodos distintos: 2003-2004, 2006-2007 e 2009, São Paulo. ....	40
Tabela 3: Perfil de Resistência e Perfil de Restrição de PFGE de 31 isolados de <i>P. aeruginosa</i> de três períodos distintos frente a 14 antimicrobianos testados pelo método disco difusão, que apresentaram resistência aos carbapenêmicos e/ou aminoglicosídeos. ....	41
Tabela 4: Resultado da pesquisa fenotípica de produção de metalo-beta-lactamase de 18 isolados de <i>P. aeruginosa</i> e resultado de pesquisa genotípica. ....	43
Tabela 5: Resultado da pesquisa fenotípica para metilase 16S rRNA de 16 isolados de <i>P. aeruginosa</i> e resultado da pesquisa genotípica. ....	46
Tabela 6: Resultado de CIM e PCR para RmtG e PFGE para isolados com suspeita de produção de metilases 16S rRNA .....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão da fibrose cística por pais portadores do gene para fibrose cística. Fonte: <http://www.medicina.ufmg.br>..... 16

Figura 2: Acúmulo de muco hiperviscoso nas vias respiratórias inicia um processo de infecção bacteriana crônica que pode levar o paciente a óbito. Fonte: <http://opediatra.com.br>..... 17

Figura 3: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *bla<sub>SPM</sub>* e *bla<sub>IMP</sub>*. M – Marcador 50 pb, Linha 1 - 484(3), Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 – 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 – 746(2), Linha 12 – 769(1), Linha 13 – controle positivo IMP, Linha 14 – controle positivo SPM, Linha 15 – controle negativo, Linha 16 – branco..... 44

Figura 4: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *bla<sub>VIM</sub>*. M – Marcador 100 pb, Linha 1 - 484(3), Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 – 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 – 746(2), Linha 12 – 769(1), Linha 13 – controle positivo vim, Linha 14 – controle negativo. .... 44

Figura 5: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para os genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*. M- marcador 100pb Linha 1 - 608, Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 – 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 – 746(2), Linha 12 – 769(1), Linha 13 – 420(2), Linha 14 – 484 (2), linha 15 - controle positivo NDM, Linha 16 – controle positivo KPC, Linha 17 – controle negativo..... 45

Figura 6: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *bla<sub>GES</sub>*. M – marcador 100pb, , Linha 1 - 608, Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 – 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 – 746(2), Linha 12 – 769(1), Linha 13 – 420(2), Linha 14 – 484 (2), linha 15 - controle positivo GES, Linha 16 – controle negativo..... 45

Figura 7: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *rmtD*. M – Marcador 100 pb, Linha 1 controle positivo PA 0905, Linha 2 - 19, Linha 3 - 302

(2), Linha 4 - 487, Linha 5 - 538, Linha 6 - 653 (1), linha 7 - 653 (2) Linha 8 - 783 (2), linha 9 - 783 (3), Linha 10 Branco..... 47

Figura 8: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *rmtG*. M – Marcador 100 pb, Linha 1 - 302 (2), Linha 2 - 487, Linha 3 - 538, Linha 4 - 653 (1), linha 5 - 653 (2) Linha 6 - 783 (1), linha 7 - 783 (2), Linha 8 – 783 (3), Linha 9 – 19, Linha 10 controle positivo, Linha 11 controle negativo. .... 48

Figura 9: Perfis de isolados de *P. aeruginosa* obtidos do paciente 3 digeridos com enzimas de restrição Spe I obtidos através de PFGE. Linhas 1 a 12 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, 1 – 167(1), 2 – 167(2), 3 – 167(3), 4 - 302 (1), 5 – 302 (2), 6 – 470, 7 – 538, 8 – 653 (1), 9 – 653 (2), 10 – 783 (1), 11 – 783 (2), 12 – 783 (3) M – Marcador DNA de fago λ (48,5 kb)..... 50

Figura 10: Dendrograma indicando a diversidade genética (uma amostra para cada tipo e subtipo de perfis de restrição) entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório de 11 pacientes portadores a de fibrose cística digeridas com enzima de restrição Spe I e porcentagem de similaridade com uma tolerância Dice de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta. .... 51

Figura 11: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 1, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta. .... 52

Figura 12: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 2, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 53

Figura 13: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 3, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 54

Figura 14: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 4, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com

tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 55

Figura 15: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 5, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta. .... 56

Figura 16: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 6, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 58

Figura 17: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 7, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 58

Figura 18: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 8, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 59

Figura 19: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 9, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 61

Figura 20: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 10, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 62

Figura 21: Dendrograma indicando a diversidade genética entre as isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 11, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta..... 62

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 FIBROSE CÍSTICA .....	16
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
1.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	21
1.4. ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. CASUÍSTICA.....	29
3.1.1 MICRORGANISMOS.....	29
3.1.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS.....	30
<b>3.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO (Kirby - Bauer)</b> .....	<b>30</b>
3.2.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	30
3.2.2. CONTROLE DE QUALIDADE .....	30
3.2.3 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO .....	31
3.2.4. APLICAÇÃO DOS DISCOS CONTENDO ANTIMICROBIANOS .....	31
3.2.5 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO .....	32
3.2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE MICRO - DILUIÇÃO PARA POLIMIXINA B .....	32
<b>3.3. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-BETA-LACTAMASES</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4. CONFIRMAÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASE E METILASES 16S rRNA PELO MÉTODO EPSIOMÉTRICO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5. ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) PARA ANÁLISE GENOTÍPICA</b> .....	<b>34</b>
3.5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	34
3.5.2 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	35
<b>3.6. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA POR PCR</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7 SEQUENCIAMENTO DO gene <i>rmtG</i></b> .....	<b>37</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>



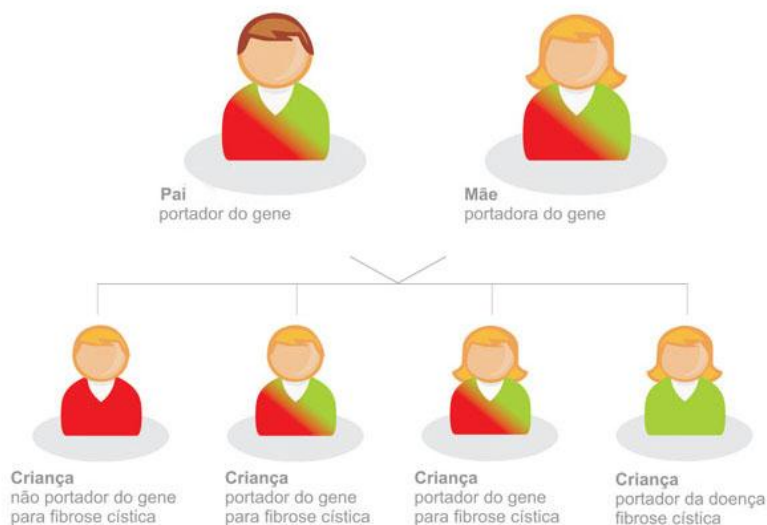
4.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE PARA <i>P. aeruginosa</i> .....	39
4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA POLIMIXINA B.....	42
4.3 PESQUISA DE CARBAPENEMASE E METILASE 16S rRNA.....	43
4.4 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	49
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>86</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 FIBROSE CÍSTICA

Fibrose cística é uma doença genética grave, de herança autossômica recessiva, e é considerada a doença letal mais frequente na raça branca (Tsui, 1990; Zielenski & Tsui, 1995) (Figura 1).

A fibrose cística representa uma das principais causas de doença pulmonar crônica na faixa etária pediátrica e afeta entre 1/2000 a 1/4500 crianças de origem caucasiana. No Canadá 1/3600 crianças nascidas vivas são portadoras de fibrose cística (Canadian Cystic Fibrosis Foundation, 2005). No Brasil, a incidência situa-se entre 1/10000 a 1/26000 no grupo das crianças nascidas vivas (Raskin et al., 1993). Segundo a Associação Brasileira de Assistência à Mucoviscidose (ABRAM, 2001) 1 em 32,2 mil paulistas são portadores da doença.

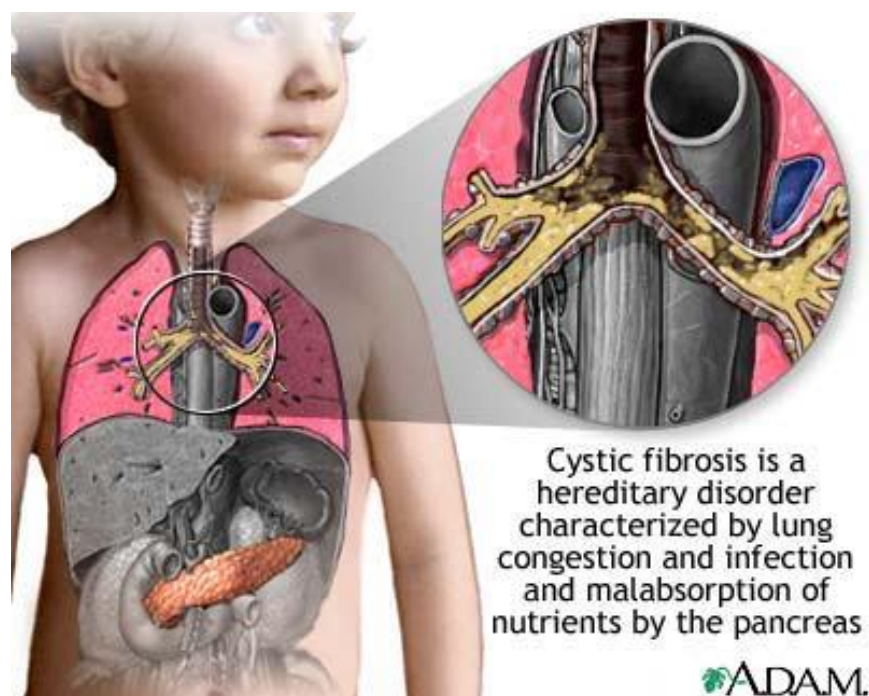


**Figura 1. Transmissão da fibrose cística por pais portadores do gene para fibrose cística.**  
Fonte: <http://www.medicina.ufmg.br>

O defeito funcional primário da Fibrose Cística é a regulação anormal do transporte de cloro através das células epiteliais das vias respiratórias, intestino, pâncreas exócrino e glândulas sudoríparas apócrinas (Davis, 1991).

O acúmulo intracelular de íons cloro e a consequente reabsorção excessiva de sódio resultam no aumento da reabsorção de água e no aumento da viscosidade do muco (Jiaug et al., 1993), que é a origem do nome “Mucoviscidose”.

A incapacidade de remoção do muco hiperviscoso inicia um processo de infecção bacteriana crônica (Koch & Hoiby, 1993). O acúmulo de muco hiperviscoso nas vias respiratórias inicia um processo de infecção bacteriana crônica que pode levar o paciente a óbito (Figura 2). A doença pulmonar crônica é caracterizada por um ciclo vicioso composto por inflamação e infecção, sendo essa a maior causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Hutchison et al., 2000).



**Figura 2:** Acúmulo de muco hiperviscoso nas vias respiratórias inicia um processo de infecção bacteriana crônica que pode levar o paciente a óbito. Fonte: <http://opediatra.com.br>

A doença é causada devido a mutações no gene *cftr* (“Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”) localizado no cromossoma 7, que é responsável pela síntese da proteína de membrana de mesmo nome, CFTR (Lyczak et al., 2002).

Apesar de não existir cura para a doença, a aderência dos pacientes à terapia multidisciplinar padrão (orientação nutricional, prática esportiva, utilização de enzimas pancreáticas e antibióticos, e avaliação clínica rotineira) tem sido um importante fator responsável pelo aumento da média de sobrevida que passou de 14 anos em 1969 para 30 anos em 1996 nos Estados Unidos (Ramsey et al., 1996). No Brasil a média de sobrevida dos pacientes com fibrose cística entre 1970 e 1994 era de 12,6 anos segundo Reis et al, 1998. Alvarez et al 2004 observaram em seu estudo uma média de sobrevida maior, 18,4 anos entre 1990 e 2000.

Nas últimas décadas, os mecanismos que correlacionam o defeito genético básico à susceptibilidade a infecções por bactérias específicas têm sido exaustivamente estudados, especialmente no que se refere à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Diversos estudos demonstraram maior aderência de *P. aeruginosa* a células do epitélio respiratório de pacientes portadores de fibrose cística (Woods et al, 1980, Saiman et al, 1992). *P. aeruginosa* é o patógeno de maior prevalência em pacientes portadores de fibrose cística, e coloniza cerca de 70% dos pacientes adultos (Wood et al, 1976, Govan & Deretic, 1996, Cystic Fibrosis Foundation, 2000). O seu aparecimento nas vias aéreas de crianças de baixa idade é um fator de mau prognóstico, especialmente naquelas abaixo de dois anos de idade (Hudson et al, 1993, Nixon et al, 2001), e estratégias de intervenção terapêutica precoce vêm sendo utilizadas no sentido de impedir ou pelo menos postergar a colonização crônica pela *P. aeruginosa* (Valerius et al, 1991, Vasquez et al, 1993, Frederiksen et al, 1997).

Durante o curso de infecções crônicas de fibrose cística, *P. aeruginosa* apresenta um fenótipo mucóide que é caracterizado por uma super produção do exopolissacarídeo alginato. Alguns relatos sugerem que *P. aeruginosa* mucóide são mais resistentes aos antimicrobianos do que as não mucóides (Anwar, et al, 1992). Sabe-se também que *P. aeruginosa* forma biofilme em superfícies abióticas, tais como lentes de contato e cateteres, e em tecidos do pulmão de portadores de fibrose cística (O'Toole & Kolter, 1998). Biofilmes são comunidades de bactérias aderidas a superfícies que estão circundadas por uma matriz de exopolissacarídeos e que estão envolvidos em muitos tipos de infecções crônicas (Hentzer et al, 2001). Alguns estudos mostram que a produção de alginato, um exopolissacarídeo, é aumentada quando *P. aeruginosa* se liga a uma superfície (Hentzer et al, 2001, Davies et al, 1998), e também que outras estruturas externas bacterianas, tais como, pili tipo IV e flagelos participam da formação e manutenção do biofilme (O'Toole et al, 1998). Bactérias que vivem em biofilmes podem ser 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que as que vivem livremente (Hentzer et al, 2001), o que é considerado um dos principais agravantes na infecção por *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística.

A sensibilidade aos carbapenêmicos ainda é alta em alguns centros (Garcia et al, 2004), mas alguns pesquisadores têm descrito a emergência de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística mesmo na ausência de terapia com carbapenêmicos, o que limita ainda mais o tratamento dessas infecções (Wolter et al, 2008). Vários mecanismos de resistência desenvolvidos por *P. aeruginosa* têm sido descritos, dentre eles, produção de metalo-beta-lactamases e 16S rRNA metilases (Doi et al, 2007a, Doi et al, 2007b).

Estudos sobre a aquisição de *P. aeruginosa* (Farrel et al, 1997; Kosorok et al, 1998) mostram que os fatores de risco para infecção pelo patógeno são diversos, e que um destes fatores é o atendimento em centros urbanos especializados, mas este conceito tem gerado grandes controvérsias na

literatura (Pedersen et al, 1986a, Silva Filho et al, 1999, Mahadeva et al, 1998, Spencer, 1999). A disseminação de isolados de *P. aeruginosa* entre pacientes com fibrose cística, entretanto, é um fenômeno bem conhecido e ocorre em várias situações, tais como sessões de fisioterapia, frequência a acampamentos de férias, contatos em salas de espera ou enfermarias hospitalares (Kelly et al, 1982, Pedersen et al, 1986b, Grothues et al, 1988, Speert et al, 1989, Smith et al, 1993, Cheng et al, 1996, Jones et al, 2001, Scott & Pitt, 2004). Alguns centros de fibrose cística relatam elevada variabilidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa* e não identificam casos de transmissão entre pacientes (Silva Filho et al, 2001, Spencker et al, 2000, Tubbs et al, 2001, Silbert et al, 2001; Greenberg et al, 2004), o que poderia indicar uma aquisição ambiental ao invés de uma fonte comum, tal como, o ambiente hospitalar.

Anualmente, diversos estudos têm sido realizados no Brasil e no exterior, sobre infecções do trato respiratório em pacientes portadores de fibrose cística e que revelam a evolução nos mecanismos de resistência bacteriana, na capacidade mutagênica bacteriana, na antibioticoterapia junto aos pacientes, metodologias de diagnóstico, etc. *P. aeruginosa* aparece em muitos estudos como uma das bactérias mais frequentes em infecções pulmonares em fibrocísticos.

No Brasil a elevada prevalência de *P. aeruginosa* tem sido relatada em diversos trabalhos. No Estado de São Paulo, Silva Filho et al (2004) encontraram 56% de prevalência de *P. aeruginosa* em seus estudos e Chernishev et al (2008) encontraram a prevalência de 72,5%. No Estado de Pernambuco, Magalhães et al (2004) encontraram 65,3% de prevalência de *P. aeruginosa* e destes 59,3% apresentavam o fenótipo mucóide. Em dois trabalhos realizados no Estado da Bahia, Santana et al (2003) observaram prevalência de 36,2%, enquanto que Paixão et al (2010) observaram prevalência de 21%, sendo que 34% apresentava o fenótipo não mucóide e 17% o fenótipo mucóide. No Estado do Paraná, a prevalência encontrada por

Brzezinski et al (2011) foi de 26,6% e Souza et al (2006) foi de 15,6% todas com o fenótipo mucóide e multiresistente.

## **1.2. *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, utiliza açúcar por meio da oxidação da glicose para a obtenção de energia, móvel, oxidase e catalase positivas. Pode produzir os seguintes pigmentos: fluoresceína, piocianina, piorubina e piomelanina. É um microrganismo oportunista, relevante pela potencial patogenicidade em humanos, principalmente em ambientes hospitalares, devido à resistência natural aos antibióticos e desinfetantes (Gillespie, 2006).

É a principal causa de infecção hospitalar do trato respiratório. Em pacientes que recebem assistência com ventilação mecânica, *P. aeruginosa* é o mais frequente agente etiológico causador de pneumonia hospitalar.

Em pacientes portadores de fibrose cística, *P. aeruginosa* apresenta também o fenótipo mucóide que é responsável por 70 a 80% das infecções crônicas. Produzem uma grande quantidade de alginato (polímero polissacarídeo) que dá a aparência mucóide típica para esse fenótipo. São microcolônias que crescem envolvidas pelo alginato e situam-se nas vias aéreas dos pacientes com FC que desenvolvem a infecção crônica.

Esta forma de crescimento inibe a fagocitose, aumentando a resistência aos antimicrobianos e provoca uma resposta imune significativa pela ação da elastase derivada de neutrófilo. A elastase em altos níveis provoca danos nos pulmões dos fibrocísticos e seu efeito deletério pode durar por um longo período e levar o paciente a óbito (Murray et al, 2006a).

## **1.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

No ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* pode apresentar resistência aos antimicrobianos utilizados, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (Silbert, 1999; Carmeli et al 1998; Doi et al, 2007c; Bassetti et al, 2008; Pappas et al, 2009).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos possuem mecanismos de ação que interagem com a parede celular bacteriana impedindo a sua síntese e causando a destruição da bactéria.

Frente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, *P. aeruginosa* desenvolveram quatro importantes mecanismos de resistência, tais como (i) permeabilidade da membrana externa reduzida pela perda de porina; (ii) bomba de efluxo ativa, a qual expulsa os antibióticos para fora da célula; (iii) evita a interação do antibiótico com a proteína ligadora de penicilina (PBP) pela aquisição de uma nova PBP, pela modificação da PBP existente mediante recombinação ou mutação pontual; (iiii) produção da enzima  $\beta$ -lactamase (Poirel et al, 2000; Rossi & Andreazzi, 2004; Murray et al, 2006b; Silva, 2009).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos, inativando sua ação. Através dessa ação enzimática as  $\beta$ -lactamases estão subclassificadas em penicilinases, cefalosporinases ou carbapenemases, dependendo da família de  $\beta$ -lactâmicos que tenha maior suscetibilidade de ser atacada pela enzima (Gales et al, 2004, Lincopan et al., 2005; Sader et al., 2001).

As enzimas  $\beta$ -lactamases estão classificadas de duas maneiras, pela classe molecular proposta por Ambler (1980) que utiliza letras para identificar cada grupo e pelo grupo funcional proposto por Bush et al (1995) que utiliza algarismos para identificar cada grupo. Ambos dividiram as beta-lactamases em quatro grupos distintos (Rossi & Andreazzi, 2004) (Tabela 1).

Dentro dessas classificações as beta-lactamases mais importantes para bacilos Gram-negativos são as de espectro ampliado (ESBL) e as carbapenemases.



As beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) são enzimas codificadas por genes localizados em plasmídios e hidrolisam a cadeia oximino-beta-lactâmica do antimicrobiano. Dessa forma, seu espectro de ação aumenta e atinge os beta-lactâmicos de amplo espectro, são inibidos por ácido clavulânico e inativam todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos (Rossi & Andreazzi, 2004). Pertencem à classe molecular A de Ambler (1980) e ao grupo funcional 2be de Bush-Jacoby-Medeiros (1995), têm sido pouco relatada para isolados de *P. aeruginosa*, sendo mais frequentemente identificadas em membros da família das *Enterobacteriaceae* (Medeiros, 1997; Celenza et al, 2006; Picão et al, 2009).

**Tabela 1. Classificação das enzimas Beta-lactamases segundo Ambler (1980) e Bush, Jacoby e Medeiros (1995).**

AMBLER <sup>1</sup>	BJM <sup>2</sup>	CARACTERÍSTICAS
C	1	Cefalosporinas não inibidas por ácido clavulânico
A	2a	Penicilinas inibidas por ácido clavulânico
	2b	B-lactamase de amplo espectro
	2be	ESBL inibidas por ácido clavulânico
	2c	Carbecilinas – inibidas por ácido clavulânico
D	2d	Oxacilinas (Oxa-48 em enterobactérias)
A	2e	Cefalosporinas inibidas por ácido calvulânico
	2f	Carbapenemas: não MBL (KPC)
B	3	MBL – não inibidas por ácido clavulânico (IMP, SPM, NDM)
ND	4	Penicilinas não inibidas por ácido clavulânico

<sup>1</sup>Molecular (Ambler, 1980)

<sup>2</sup>Funcional (Bush et al, 1995)

As metalo-beta-lactamases incluídas na classe molecular B de Ambler (1980) e grupo funcional 3 de Bush-Jacoby-Medeiros (1995) são metaloenzimas dependentes de zinco e possuem amplo espectro de atividades frente aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos) exceto ao monobactâmico (aztreonam), são resistentes à ação inibitória do ácido clavulânico, porém sofrem ação por agentes quelantes como EDTA, ácido mercapto propiônico (MPA) e ácido mercapto acético (MAA) permitindo assim a ação do antimicrobiano (Walsh et al.,2005; Murray, et al, 2006b) (Tabela 1). As metalo-beta-lactamases (IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, SIM, NDM) podem ser adquiridas através de plasmídios ou podem estar localizadas no cromossomo e são transmitidas da célula mãe para a célula filha (Rossi & Andreazzi, 2004; Livermore & Woodford, 2006).

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos produzidos a partir de algumas espécies de actinomicetos como *Streptomyces spp.* E *Micromonospora spp.*; são compostos por aminoaçúcares unidos por glicosídeos a um anel aminociclitol. São bactericidas como consequência de sua habilidade para unir-se irreversivelmente aos ribossomos.

Para exercer sua função atravessam a membrana externa, a parede celular e a membrana citoplasmática, onde inibem a síntese de proteína mediante sua ligação ao sítio aminoacil (sítio A) da porção 16S do RNA dentro da subunidade ribossômica 30S (Magnet & Blanchard, 2005 in Doi & Arakawa, 2007c; Murray et al, 2006b).

Para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* é indicado utilizar a combinação de aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos para minimizar falhas terapêuticas devido ao surgimento de resistência frente aos antimicrobianos, porém existem bactérias capazes de produzir enzimas que inibem a ação de ambos antibióticos, conferindo um fenótipo multidroga-resistente (Doi et al., 2007c; Lincopan et al., 2009).

A resistência aos aminoglicosídeos ocorre pela modificação química da estrutura do antibiótico, o que impede sua ligação a subunidades do ribossomo.

A modificação enzimática se realiza por processos de O-fosforilação por fosfotransferases (APH), O-adenilação, por nucleotidiltransferase (ANT) dependentes de ATP e N-acetilação por acetiltransferases (AAC) dependentes de acetil CoA (Hancock, 1998; Doi et al, 2007c). Esses mecanismos também estão presentes nos actinomicetos produtores de aminoglicosídeos conferindo resistência as aminoglicosídeos que produzem (Doi & Arakawa, 2007c, Wachino & Arakawa, 2012). Mais que uma enzima pode ser expressa ao mesmo tempo, o que confere resistência a mais de um aminoglicosídeo.

Alteração na permeabilidade celular, super expressão de bomba de efluxo, e substituição de nucleotídeos da molécula alvo são outros possíveis mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos (Magnet & Blanchard, 2005 in Doi & Arakawa, 2007c).

Na última década, uma nova enzima mediada por plasmídeo, metilase 16S rRNA, foi descrita como um novo mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos, a qual leva à resistência à maioria dos aminoglicosídeos utilizados na clínica médica, tais como, amicacina, tobramicina e gentamicina. Essa resistência é mediada pela metilação de nucleotídeos específica dentro do sítio A do 16S rRNA, que dificultam a ligação dos aminoglicosídeos na subunidade ribossomal 30S (Doi & Arakawa, 2007c).

A produção dessa enzima também foi detectada em actinomicetos produtores de aminoglicosídeos como uma forma de proteção do 16S rRNA dentro da subunidade 30S do ribossomo, pois evitam a inibição de sua própria síntese de proteínas, o que resulta em alto nível de resistência a vários antibióticos (Doi & Arakawa, 2007c, Wachino & Arakawa, 2012).

A primeira descrição em bactérias foi relatada em *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em 2003 e a sequência de aminoácidos possuíam até 35% de identidade com 16S rRNA metilases de vários actinomicetos produtores de aminoglicosídeos (Galimand et al, 2003; Yokoyama et al, 2003, Doi & Arakawa, 2007c). No Brasil foi descrita a enzima metilase 16S rRNA RmtD, encontrada em uma cepa de *P. aeruginosa* que também produzia a metalo-beta-lactamase

SPM-1, demonstrando ampla resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos, e posteriormente detectou-se a disseminação em diversos isolados de *P. aeruginosa* isoladas em diversos hospitais de São Paulo e também em cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Doi et al, 2007c; Doi et al., 2007a; Doi et al., 2007b; Yamane et al, 2007; Yamane et al, 2008).

RmtD tem 2 alelos, RmtD1 e RmtD2. RmtD1 foi localizada no Brasil em *P. aeruginosa* e em *Enterobacteriaceae* na Argentina e Chile (Fritsche et al, 2008). Metilase RmtD2 foi detectada em *Enterobacter* e *Citrobacter* spp na Argentina e também em isolados de *K. pneumoniae* co-produtores de KPC-2 no Brasil (Bueno et al, 2013). Co-produção de RmtG com KPC-2 e beta-lactamase de espectro estendido do grupo CTX-M foi recentemente descrita no Brasil (Bueno et al, 2013).

Dez grupos tem sido relatados desde então, ArmA and RmtA até RmtH, as quais conferem alto nível de resistência aos aminoglicosídeos 4,6-deoxiestreptamina disubstituído (DOS), incluindo gentamicina, tobramicina e amicacina, e tem disseminação global (Doi et al, 2007a, Doi & Arakawa, 2007c, Wachino & Arakawa, 2012; Bueno et al, 2013; O'Hara et al, 2013). NpmA confere alto nível de resistência tanto aos aminoglicosídeos 4,6-deoxiestreptamina disubstituído (DOS) como aos aminoglicosídeos 4,5-DOS disubstituído, tais como, neomicina e estreptomicina e foi encontrado somente no Japão (Wachino et al, 2007).

A disseminação de bacilos Gram-negativos produtores de metilases 16S rRNA ao redor do mundo é preocupante porque esses microrganismos apresentam alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e tem grande potencial de desenvolver multi-resistência, especialmente pela aquisição de genes que codificam várias beta-lactamases (Doi et al, 2007a, Doi & Arakawa, 2007c).

#### 1.4. ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

A técnica para análise de genoma bacteriano por macro-restrição considerada padrão ouro é a eletroforese de campo pulsado (PFGE). É utilizada para estudos epidemiológicos de bactérias patogênicas, estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções, comparação de populações bacterianas envolvendo microrganismos de diferentes países (Struelens et al, 2001, Magalhães et al, 2005).

A técnica de PFGE foi desenvolvida na década de 1990, como o melhor método para estudos epidemiológicos de bactérias patogênicas, a partir de uma modificação da técnica de eletroforese (campo elétrico unidirecional) inicialmente introduzida em 1984 (Struelens et al, 2001, Magalhães et al, 2005).

O PFGE possibilita a separação de bandas de diferentes amostras de DNA permitindo sua comparação, pois possui um campo elétrico homogêneo com eletrodos hexagonais, onde os pulsos elétricos de diferentes direções e durações favorecem a reorganização das moléculas de DNA de diferentes tamanhos. É a duração do tempo de pulso que permite a determinação do tamanho da faixa de fragmentos a serem separados (Struelens et al, 2001, Magalhães et al, 2005).

Este estudo propõe avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos frente a *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística atendidos no Ambulatório do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), e analisar a variabilidade genética entre os diversos isolados bacterianos isolados de diversos pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar o perfil de sensibilidade de *P. aeruginosa* frente a diversos antimicrobianos pelo método de disco-difusão.
- Detectar fenótipos e genótipos de mecanismos de resistência microbiana, tais como, carbapenemases e genes de resistência a aminoglicosídeos.
- Analisar a variabilidade genética entre os diferentes isolados de *P. aeruginosa* através da eletroforese de campo pulsado (PFGE).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. CASUÍSTICA**

#### **3.1.1 MICRORGANISMOS**

Foram utilizados isolados de *P. aeruginosa*, obtidos de amostras de escarro e secreção orofaríngea de pacientes com fibrose cística, atendidos no Ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança “Professor Pedro de Alcântara” do HC-FMUSP. Foram estudados isolados previamente identificados por métodos bioquímicos clássicos e estocadas a -70°C e liofilizadas no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Os 129 isolados foram obtidos de 11 pacientes, durante o período de junho de 2003 a junho de 2004, projeto de pesquisa “Epidemiologia de bacilos Gram negativos não fermentadores isolados do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística” (67 isolados), no período de setembro de 2006 a setembro de 2007, projeto de pesquisa “Avaliação das infecções virais em pacientes com fibrose cística” (49 isolados), e no período de maio 2009 até Dezembro de 2009, projeto de pesquisa “Estudo da eficácia de um programa de educação na higiene e desinfecção domiciliar dos nebulizadores de pacientes com fibrose cística” (13 isolados), com aprovação da CAPPesq HC/USP e CTC-IAL e CEPIAL. Os pacientes que obtiveram coletas no período de 2009 foram os que utilizavam nebulizadores em seu tratamento.

### **3.1.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS**

A partir de um banco com 580 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de amostras clínicas de secreção de orofaringe e escarro coletado de 98 pacientes portadores de fibrose cística foram utilizados os critérios abaixo relacionados para a seleção dos isolados a serem analisados neste trabalho.

Para o presente estudo foram excluídos os pacientes colonizados/infectados com 5 amostras clínicas ou menos; com amostra clínica somente em um dos períodos de coleta; apenas uma amostra clínica em período de coleta diferente e pacientes com dez ou mais amostras clínicas.

### **3.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO (Kirby - Bauer)**

#### **3.2.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Os seguintes discos de antimicrobianos (Oxoid) foram testados: aztreonam (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), ticarcilina/ác.clavulânico (75/10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), polimixina B (300 U), ampicacina (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), netilmicina (30 µg).

#### **3.2.2. CONTROLE DE QUALIDADE**

As seguintes cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas para controle de qualidade dos discos de antibióticos, do meio de cultura e da técnica:



- A) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, para *screening* de cepas produtoras de ESBL.
- B) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, para controle da concentração de timina e timidina no meio de cultura ágar Müller-Hinton.
- C) *Escherichia coli* ATCC 35218, para controle dos discos de antimicrobianos beta-lactâmicos e beta-lactâmicos conjugados a inibidores de beta-lactamases.
- D) *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para controle dos demais discos de antimicrobianos.

### **3.2.3 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO**

Os isolados foram semeados em Tryptic Soy Agar (TSA). As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, preparou-se o inóculo bacteriano em solução de NaCl 0,85%, através da suspensão direta de colônias isoladas. Uma turbidez semelhante ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi obtida com auxílio de um densitômetro (Densicheck plus, Biomerieux).

### **3.2.4. APLICAÇÃO DOS DISCOS CONTENDO ANTIMICROBIANOS**

Obtida a suspensão bacteriana, procedeu-se sua semeadura em placas de ágar Müller-Hinton. Hastes com pontas de algodão estéreis foram introduzidas na suspensão bacteriana, pressionadas contra a parede interna do tubo para retirada do excesso de líquido e semeadas em várias direções sobre a superfície do meio de cultura. Após a absorção do excesso de líquido pelo ágar, procedeu-se a aplicação dos discos contendo os antimicrobianos, respeitando-se o limite de, no máximo, 12 discos nas placas com 150 mm de

diâmetro e 5 discos na placa com diâmetro de 90 mm. As placas foram invertidas e incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 20-24 horas (CLSI, 2011).

### **3.2.5 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO**

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à leitura do teste. Com o auxílio de uma régua, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros e os microrganismos interpretados como sendo sensíveis intermediários ou resistentes às drogas testadas, de acordo com critérios estabelecidos pelo CLSI, 2011.

### **3.2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE MICRO - DILUIÇÃO PARA POLIMIXINA B**

A determinação da CIM pelo método de micro diluição foi realizada de acordo com as instruções contidas no CLSI, 2009. Resumidamente, foram realizadas diluições seriadas de polimixina B com intervalo de concentrações de 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$ .

O meio de cultura utilizado foi o Caldo Müller-Hinton cátion-ajustado (CMHCA). As colunas 1 e 2 da microplaca de 96 cavidades, com fundo em “U” foram utilizadas para o controle de esteridade e de crescimento.

A suspensão bacteriana em salina foi preparada em densitômetro (Biomérieux) até atingir a escala 0,5 de McFarland, a qual foi diluída na proporção 1:150 em CMHCA e distribuída nas colunas 2 a 13 da microplaca (50 $\mu\text{l}$ /cavidade).

Após a inoculação a microplaca foi incubada a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por um período de 20-24 hs. Decorrido o período de incubação, a microplaca foi colocada sobre um suporte com um espelho embaixo, próprio para a leitura do teste.

A CIM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento bacteriano. *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade do teste.

### **3.3. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO-BETA-LACTAMASES**

A pesquisa de metalo-beta-lactamases foi realizada com os isolados bacterianos resistentes ao imipenem. Após a semeadura do inóculo bacteriano, seguindo-se o mesmo procedimento padronizado para o método de disco-difusão, dois discos de imipenem e dois discos de ceftazidima foram depositados na superfície do meio. Em um de cada disco de imipenem e ceftazidima foram adicionados EDTA 0,5 M (5µL/disco) e ácido mercapto propiônico (3µL/disco), que são agentes sequestrantes de íons.

Um aumento do halo de inibição do crescimento bacteriano no disco da droga contendo o agente sequestrante de pelo menos 5 mm, comparado com o halo de inibição do disco contendo a droga sozinha, sugere, fenotipicamente, a presença de metalo-beta-lactamases (ARAKAWA, 2000).

### **3.4. CONFIRMAÇÃO DE METALO-BETA-LACTAMASE E METILASES 16S rRNA PELO MÉTODO EPSILOMÉTRICO**

A metodologia do teste epsilométrico (Etest – Biomerieux) foi utilizada somente para a confirmação da produção de metalo-beta-lactamase e confirmação da produção de metilase 16S rRNA para isolados que apresentaram resistência ao antimicrobiano amicacina.

Para metalo-beta-lactamase foi utilizada uma fita contendo um lado com imipenem e outro com imipenem acrescido de EDTA, e para a confirmação da produção de metilase 16S rRNA foi utilizada fita com antimicrobiano amicacina.

Placas de ágar MH foram preparadas de acordo com as instruções do

fabricante. O inóculo bacteriano foi obtido conforme já descrito anteriormente, para o teste de disco-difusão. Após a semeadura do inóculo em toda a superfície da placa, aguardou-se até que o excesso de líquido tivesse sido completamente absorvido. Uma fita plástica, com um gradiente de concentração variado, foi então colocada delicadamente sobre a superfície do ágar inoculado e a placa incubada a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 20-24 horas, seguindo as instruções do fabricante.

### **3.5. ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) PARA ANÁLISE GENOTÍPICA**

#### **3.5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS**

Foi utilizado o Protocolo do Programa Pulse Net, padronizado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Estados Unidos (<http://www.cdc.gov/pulsenet>), baseado na metodologia descrita por Gautom (1997).

Os isolados de *P. aeruginosa* foram repicados em TSB e incubados a  $30^\circ\text{C}$  por 18 horas. Posteriormente, foram semeados em placas de TSA e incubados a  $30^\circ\text{C}$  por 18-48 horas.

Após o crescimento bacteriano, foi feita uma suspensão em tampão de suspensão celular ajustando a turbidez a 15% T em colorímetro (VITEK).

Foram aliquotados 200  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana para um microtubo tipo eppendorf e acrescentados 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K (solução estoque 20 mg/mL), 5  $\mu\text{L}$  de lisozima (solução estoque 40mg/mL) (concentração final de lisozima e proteinase K 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e 200  $\mu\text{L}$  de agarose (pulsed field certified agarose - ultra pure DNA grade agarose, cat. 162-0137, Bio-Rad) 1,2% em

tampão Tris-EDTA (TE) a 45° – 50°C, misturando delicadamente com a ajuda de uma pipeta para que não se formassem bolhas.

O gel contendo a suspensão bacteriana foi então distribuído nos moldes para a formação dos blocos. Após a solidificação, os blocos foram colocados em um tubo tipo Falcom de 50 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular e 25 µL da solução estoque de proteinase K, incubados em agitador a 54°C a 120 rpm por 2 hs.

Após a lise, a solução foi desprezada e lavada com aproximadamente 12 mL de água ultra pura estéril pré-aquecida a 50°C. As amostras foram colocadas novamente no agitador a 50°C, 120 rpm por 15 minutos e lavadas novamente. Depois da segunda lavagem foi retirada a água e feita a lavagem com 10 a 15 mL de tampão TE estéril pré-aquecido a 50°C e reincubados em agitador a 50°C e 120 rpm por 15 minutos, e repetidas por mais três vezes. Após a última lavagem, os blocos foram suspensos em 10 mL de Tampão TE em temperatura ambiente e estocados a 4°C até a digestão.

### **3.5.2 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO**

Os blocos foram cortados, com a ajuda de um bisturi, em pedaços de dois milímetros de espessura e transferidos para microtubos tipo eppendorf contendo tampão da enzima. Os eppendorfs foram incubados a 37°C em banho-maria por 10 minutos. Após a incubação, a solução foi desprezada e os blocos foram suspensos em uma solução contendo 10U da enzima SpeI (New England Biolab) e incubados em banho-maria a 37°C/ 16-18h.

As amostras foram retiradas do banho-maria e a solução com a enzima foi desprezada acrescentando-se 100 µL de Tampão Tris-EDTA-Ácido Bórico (TBE) (0,5x) por 20 minutos, e então inseridas nos “pocinhos” do gel de agarose. DNA Lambda ladder foi utilizado como marcador.

A corrida foi realizada em equipamento CHEF DR II (BioRad) a 6 V/cm e temperatura de 14°C, nas seguintes condições:

Tempo inicial: 2,2 segundos

Tempo final: 54,2 segundos

Tempo de corrida total: 20 hs

Após a corrida, os geis foram corados com brometo de etídeo 0,5 mg/mL e observados no fotodocumentador Gel Doc EQ (System Quantity One version 4.5, Bio-Rad Laboratories, Inc. Milão, Itália). A similaridade entre as amostras foi determinada segundo os critérios de Tenover et al. (1995) e analisado utilizando o software Bionumérics, versão 5.0, 2007 (Applied Maths, Kortoig, Belgica).

### 3.6. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA POR PCR

Os isolados foram semeados em placas contendo TSA e incubados a 30°C por 18 horas. Para a extração de DNA de *P. aeruginosa* foi feita uma suspensão de 150µl de água ultra pura estéril com uma alçada do crescimento bacteriano, aquecida à 95°C em termobloco por 15 minutos, e centrifugada por 15 minutos a 12900 rpm a 4°C e 100µl do sobrenadante foram armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

Foram utilizados os primers SPM-F (5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3') e SPM-R (5'-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3'), IMP-F (5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3') e IMP-R (5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3') (Poirel et al., 2011), para a amplificação do gene para metalo-beta-lactamase de *P. aeruginosa*.

Para amplificação dos genes para metilase 16S rRNA foram utilizados os seguintes primers: primer RmtD-F (5'-CGGCACCGCGATTGGGAAGC-3') e RmtD-R (5'-CGGAAACGATGCGACGAT-3') (Doi et al, 2007c), e o primer RmtG-Fw (5'-AAATACAGCGATGTGTGTCC-3') e RmtG-Rv (3'-ACACGGCATCTGTTTCTTCC-5') (Bueno et al., 2013).

Foi utilizado termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) nas seguintes condições para SPM: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, e 30 ciclos subsequentes para a amplificação, 94°C por um minuto para desnaturação, 58°C por trinta segundos para anelamento, 72°C por um minuto para extensão, e 72°C por dez minutos para a extensão final.

As reações foram realizadas em volume de 25 µl, utilizando 0,5µl de cada primer (solução mãe 10µM), 2 µl de lisado bacteriano, 12,5µl de Mix 2 (Fermentas) e 8,5 µl de água Milli-Q estéril.

Para os isolados suspeitos de produção de metilase 16S rRNA, RmtD, foram utilizadas as seguintes condições: 96°C por cinco minutos para desnaturação inicial, trinta ciclos subsequentes de amplificação, 96°C por 30 segundos para desnaturação, 52,4°C por 30 segundos para anelamento, 72°C por um minuto para extensão, e 72°C por cinco minutos para extensão final. As reações foram feitas com uma mistura contendo 2,0µl de lisado bacteriano, 12,5 µl de Mix 2 (Fermentas), 0,5 µl de cada primer, 9,5 µl de água Milli-Q estéril com volume final de 25µl. O controle negativo foi feito utilizando todos os componentes da mistura menos o lisado bacteriano.

Os produtos de amplificação do PCR, acrescido do corante Blue Green (LGC Biotecnologia) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma), a 100v por 40 minutos e visualizado em luz UV. Cepa PA 0905 (Doi et al, 2007a) foi utilizada como controle positivo para SPM e RmtD, e *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle negativo.

Os PCRs a seguir foram realizados de acordo com os protocolos descritos pelos autores, GES (Poirel et al, 2000), CTX-M (Edelstein et al, 2003), TEM (Essack et al, 2001), VIM, NDM e KPC (Poirel et al, 2011), RmtG (Bueno et al, 2013).

### **3.7 SEQUENCIAMENTO DO gene *rmtG***

O sequenciamento do gene *rmtG* foi realizado pelas alunas de Mestrado Gabriela Rodrigues Francisco e Maria Fernanda Campagnari Bueno, sob a orientação da Dra Doroti de Oliveira Garcia.

Produtos amplificados do PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *rmtG* foram purificados com a enzima ExoSap (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. O produto purificado foi submetido à reação com o Big Dye Terminator e os oligonucleotídeos para *rmtG*, de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida purificado com acetato de sódio 3M e álcool 99% em centrífuga de placa Eppendorf e seqüenciados em seqüenciador Applied Biosystem 3130XL.

As seqüências nucleotídicas obtidas para cada fragmento foram montadas em “contigs” pelo software Lasergene, alinhadas no programa Clustal W, e comparadas com as seqüências contidas no Gene Bank.



## **4. RESULTADOS**

O presente estudo foi realizado com 129 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de 11 pacientes portadores de fibrose cística atendidos no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas de São Paulo, participantes dos três períodos de coletas, sendo 67 isolados no período de 2003 – 2004, 49 isolados no período de 2006 – 2007 e 13 isolados no ano de 2009. A idade dos pacientes variou entre 9 meses e 20 anos com média de 10,3 anos. O anexo 2 apresenta uma tabela com todos os resultados obtidos.

### **4.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE PARA *P. aeruginosa***

Os isolados de *P. aeruginosa* foram submetidos ao teste de disco difusão para verificação do perfil de sensibilidade conforme apresentado a seguir na Tabela 1, Tabela 2 e Anexo 3. Os isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e aminoglicosídeos foram submetidos à pesquisa de produção de metalo-beta-lactamase (Tabela 3) e metilase 16S rRNA (Tabela 4).

Tabela 2: Perfil de Sensibilidade (Disco – difusão) de *P. aeruginosa* (n=129) isoladas de pacientes com fibrose cística frente a diversos antimicrobianos, em três períodos distintos: 2003-2004, 2006-2007 e 2009, São Paulo.

ANTIMICROBIANO	2003-2004(n=67)			2006-2007(n=49)			2009(n=13)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
IMP	64 (95,5)	1 (1,5)	2 (3,0)	33 (67,3)	0	16 (32,7)	11 (84,6)	2 (15,4)	0 (0)
MER	67 (100,0)	0 (0)	0 (0)	37 (75,5)	3 (6,1)	9 (18,4)	13 (100)	0 (0)	0 (0)
AK	56 (83,6)	4 (6,0)	7 (10,4)	29 (59,2)	7 (14,3)	13 (26,5)	10 (76,9)	1 (7,7)	2 (15,4)
GEN	45 (67,2)	9 (13,4)	13 (19,4)	27 (55,1)	9 (18,4)	13 (26,5)	10 (76,9)	3 (23,1)	0 (0)
NET	60 (89,6)	1 (1,5)	6 (9,0)	34 (69,4)	10 (20,4)	5 (10,2)	13 (100)	0 (0)	0 (0)
TOB	63 (94,0)	2 (3,0)	2 (3,0)	40 (81,6)	1 (2,0)	8 (16,4)	13 (100)	0 (0)	0 (0)
CAZ	61 (91,0)	2 (3,0)	4 (6,0)	47 (96,0)	1 (2,0)	1 (2,0)	13 (100)	0 (0)	0 (0)
FEP	60 (89,6)	2 (3,0)	5 (7,5)	47 (96,0)	2 (4,0)	0	13 (100)	0 (0)	0 (0)
ATM	49 (73,1)	7 (10,4)	11 (16,4)	28 (57,1)	17 (34,7)	4 (8,2)	10 (76,9)	3 (23,1)	0 (0)
TIM	63 (94,0)	0 (0)	4 (6,0)	46 (93,9)	0	3 (6,1)	13 (100)	0 (0)	0 (0)
PPZ	62 (92,5)	0 (0)	5 (7,5)	45 (91,8)	0	4 (8,2)	13 (100)	0 (0)	0 (0)
CIP	54 (80,6)	1 (1,5)	12 (17,9)	31 (63,3)	3 (6,1)	15 (30,6)	11 (84,6)	1 (7,7)	1 (7,7)
LEV	51 (76,1)	4 (6,0)	12 (17,9)	23 (46,9)	5 (10,2)	21 (42,9)	11 (84,6)	1 (7,7)	1 (7,7)
PB	67 (100)	0 (0)	0 (0)	47 (95,9)	0	2 (4,1)	13 (100)	0 (0)	0 (0)

IMP: Imipenem, MER: Meropenem, AK: Amicacina, GEN: Gentamicina, NET: Netilmicina, TOB: Tobramicina, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: aztreonam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulânico, PPZ: Piperacilina/Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina e PB: Polimixina B.

Tabela 3: Perfil de Resistência e Perfil de Restrição de PFGE de 31 isolados de *P. aeruginosa* de três períodos distintos frente a 14 antimicrobianos testados pelo método disco difusão, que apresentaram resistência aos carbapenêmicos e/ou aminoglicosídeos.

AMOSTRAS	PACIENTE	PFGE	PERFIL DE RESISTÊNCIA																		
707(3), 746(1),253(3),789	4,4,5,11	G, F, H1, T1	Imp																		
485, 746(2)	4	G	Imp	Mem																	
769(1)	5	I1	Imp	AK																	
676	9	N	Imp	Atm																	
707(4)	4	G	Imp	Mem	Ppt																
484(2),618	6,9	J, N	Imp	Lev	Cip																
31(1), 99, 253(1)	5	I1	Gen	AK	Net																
507	4	G	Imp	Mem	Gen	Ppt															
707(1)	4	F	Imp	Mem	Lev	Ppt															
697	6	J	Imp	Mem	Lev	Pb															
608	9	N	Imp	Mem	Gen	Lev	Cip														
653(2)	3	D1	AK	Net	Gen	Tob	Cip														
614(1)	4	G	AK	Net	Gen	Ppt	Lev	Tic													
302(2), 470, 538, 653(1), 783(1),783(2), 783(3)	3	D, D, D, D, D2, D3, D2	AK	Net	Gen	Tob	Lev	Cip													
620(2)	6	J	Imp	Net	Gen	AK	Lev	Cip													
420(2)	2	C1	AK	Net	Gen	Atm	Caz	Cip	Fep												
487	9	N	Imp	Net	Gen	Ppz	Lev	AK	Cip	Tob	Caz	Tim	Mem								
19	9	N	Imp	Net	Gen	Ppz	Lev	AK	Cip	Tob	Caz	Tim	Atm	Fep							

IMP: Imipenem, MER: Meropenem, AK: Amicacina, GEN: Gentamicina, NET: Netilmicina, TOB: Tobramicina, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: aztreonam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulânico, PPZ: Piperacilina/Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina e PB: Polimixina B.

Dez isolados apresentaram o mesmo perfil de resistência às quinolonas, levofloxacina e ciprofloxacina (Anexo 3).

Sete isolados apresentaram o mesmo perfil de resistência aos aminoglicosídeos, amicacina, netilmicina, gentamicina, tobramicina e às quinolonas, levofloxacina e ciprofloxacina (Tabela 2).

Os isolados 487 e 19 foram os mais resistentes e apresentaram o mesmo perfil de resistência aos aminoglicosídeos, netilmicina, gentamicina, amicacina, tobramicina; às quinolonas levofloxacina e ciprofloxacina; às penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases piperacilina/tazobactam e ticarcilina/ácido clavulânico, diferindo apenas em relação ao meropenem, aztreonam e cefepime (Tabela 2).

Para as cefalosporinas ambas apresentaram resistência à ceftazidima (3ª geração), porém somente a cepa 19 apresentou resistência ao cefepime (4ª geração).

Para os carbapenêmicos ambas apresentaram resistência ao imipenem, mas somente a cepa 487 apresentou resistência ao meropenem. Para o monobactâmico Aztreonam somente a cepa 19 apresentou resistência (Tabela 2).

#### **4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA POLIMIXINA B**

O teste de micro-diluição foi realizado somente para dois isolados de *P. aeruginosa* (484-3, e 697), que apresentaram resistência (11mm de halo) pelo método de disco difusão, uma vez que é raro apresentar resistência a esse antimicrobiano. Os isolados apresentaram sensibilidade (CIM = 2µg/ml) ao antimicrobiano polimixina B.

### 4.3 PESQUISA DE CARBAPENEMASE E METILASE 16S rRNA

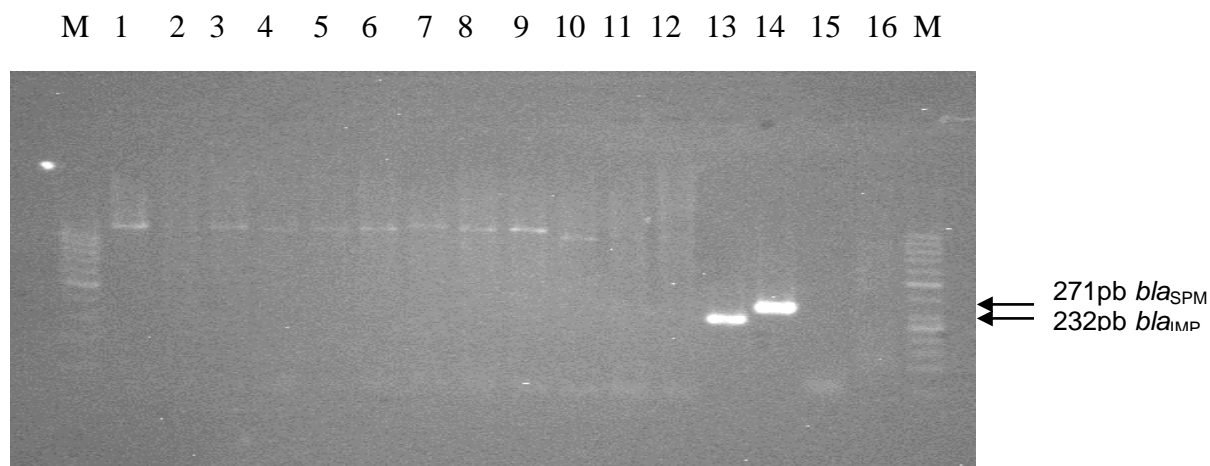
Dezoito isolados de *P. aeruginosa* apresentaram resistência ou sensibilidade diminuída ao antimicrobiano beta-lactâmico imipenem, pertencente à classe dos carbapenêmicos, pelo método de disco-difusão, para as quais se realizaram pesquisa de metalo-beta-lactamase pelo método de disco associação e método epsilométrico. Doze isolados foram confirmados como suspeitos de produtores de metalo-beta-lactamase (Tabela 3).

Tabela 4: Resultado da pesquisa fenotípica de produção de metalo-beta-lactamase de 18 isolados de *P. aeruginosa* e resultado de pesquisa genotípica.

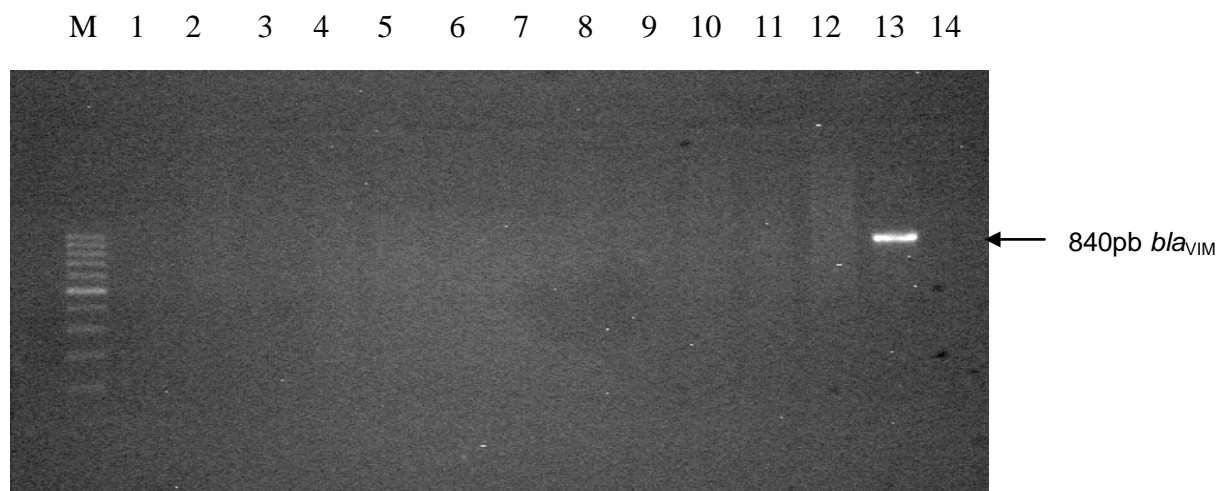
AMOSTRA	METALO BETA LACTAMASE						TESTE EPSILOMÉTRICO		SUSPEITA DE MBL	PCR - genes <i>bla</i> <sub>SPM</sub> * <i>bla</i> <sub>IMP</sub> * <i>bla</i> <sub>VIM</sub> * <i>bla</i> <sub>NDM</sub> * <i>bla</i> <sub>GES</sub> ** <i>bla</i> <sub>KPC</sub> **
	IMP	IMP+ EDTA	IMP+ MPA	CAZ	CAZ+ EDTA	CAZ+ MPA	IMP	IMP/EDTA		
19	14	19	26	0	22	29	< 4	< 1	-	-**
253(3)	18	23	25	18	29	30	< 4	< 1	-	-**
484(3)	22	25	17	21	21	22	6	<1	+	-***
485	13	20	21	27	28	28	8	1,5	-	-**
487	10	22	38	0	24	36	16	< 1	+	-***
507	10	14	22	22	24	22	6	1	-	-**
608	10	16	30	27	28	30	8	1,5	-	-**
618	0	17	27	24	27	28	8	< 1	-	-***
620(2)	12	25	31	22	29	29	6	< 1	+	-***
676	13	19	45	33	34	43	12	< 1	+	-***
697	10	18	20	24	25	24	16	3,0	+	-***
707(1)	14	21	27	26	28	30	8	< 1	+	-***
707(3)	11	17	24	25	28	30	6	< 1	+	-***
707(4)	12	13	14	18	21	16	16	3,0	+	-***
746(1)	19	19	35	29	29	27	12	< 1	+	-***
746(2)	15	23	37	37	37	42	6	< 1	+	-***
769(1)	11	19	30	28	29	28	8	< 1	+	-***
789	19	24	28	30	30	30	< 4	< 1	-	-**

IMP: Imipenem; EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetracético; MPA: Ácido Mercaptopropiônico; CAZ: Ceftazidima.

Os doze isolados de *P. aeruginosa* com resultado positivo para pesquisa fenotípica de metalo-beta-lactamase, foram submetidos a análise de PCR para *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>. Os resultados obtidos para *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> foram negativos para todos os isolados (Anexo 2) (Fig. 3,4 e 5).



**Figura 3:** Análise dos isolados de *P. aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>IMP</sub>. M – Marcador 50 pb, Linha 1 - 484(3), Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 – 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 – 746(2), Linha 12 – 769(1), Linha 13 – controle positivo IMP, Linha 14 – controle positivo SPM, Linha 15 – controle negativo, Linha 16 – branco.



**Figura 4:** Análise dos isolados de cística através da técnica de PCR Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linh Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), L 13 – controle positivo vim, Linha 14

Os dezoito isolados que apresentaram resistência aos carbapenêmicos também foram submetidos a análise genotípica para *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>GES</sub>. Os resultados obtidos foram negativos para ambas enzimas KPC e GES (Fig. 5 e Fig. 6).

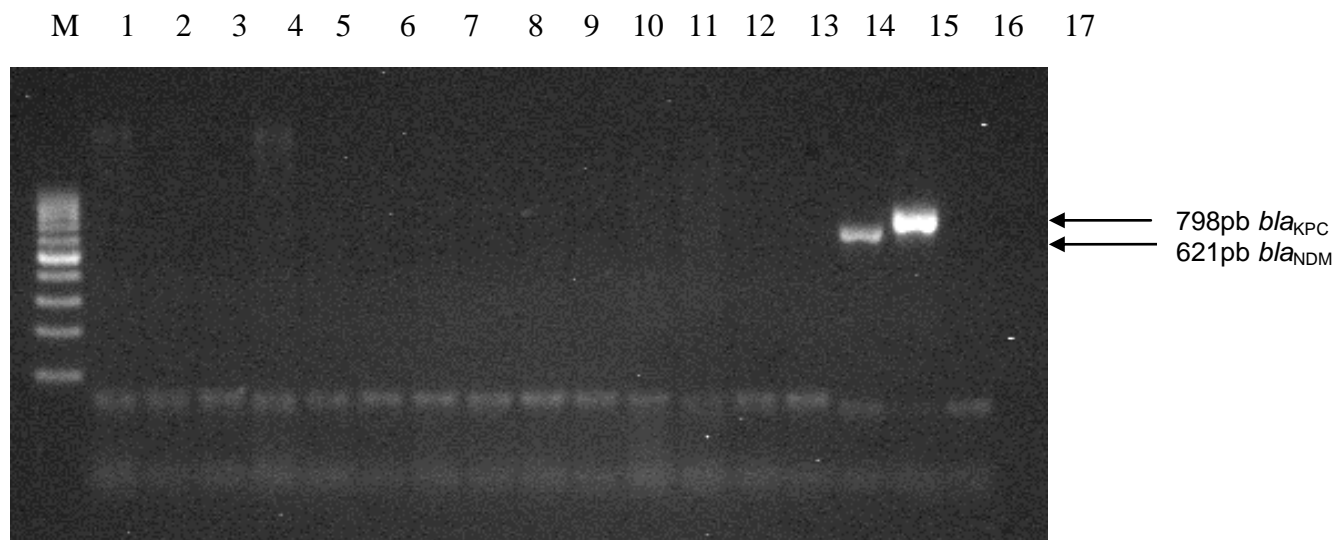


Figura 5: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para os genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>. M- marcador 100pb Linha 1 - 608, Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 - 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 - 746(2), Linha 12 - 769(1), Linha 13 - 420(2), Linha 14 - 484 (2), linha 15 - controle positivo NDM, Linha 16 - controle positivo KPC, Linha 17 - controle negativo.

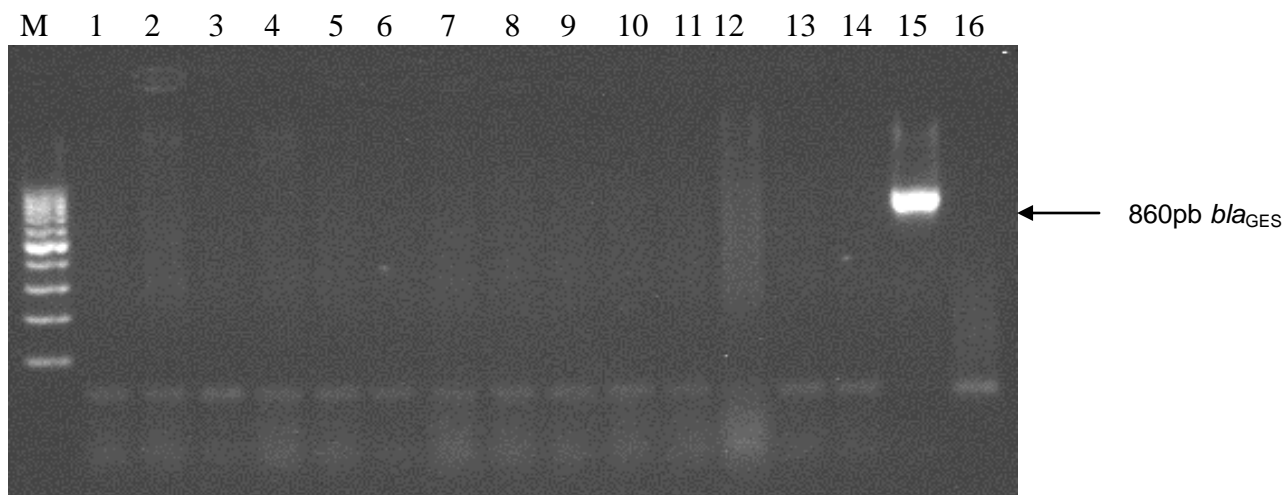


Figura 6: Análise dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *bla*<sub>GES</sub>. M - marcador 100pb, , Linha 1 - 608, Linha 2 - 487, Linha 3 - 618, Linha 4 - 620(2), Linha 5 - 676, Linha 6 - 697, linha 7 - 707(1) Linha 8 - 707(3), linha 9 - 707(4), Linha 10 - 746(1), Linha 11 - 746(2), Linha 12 - 769(1), Linha 13 - 420(2), Linha 14 - 484 (2), linha 15 - controle positivo GES, Linha 16 - controle negativo.

Dezesseis isolados resistentes aos aminoglicosídeos pelo método de disco-difusão foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima de amicacina pelo método epsilométrico.

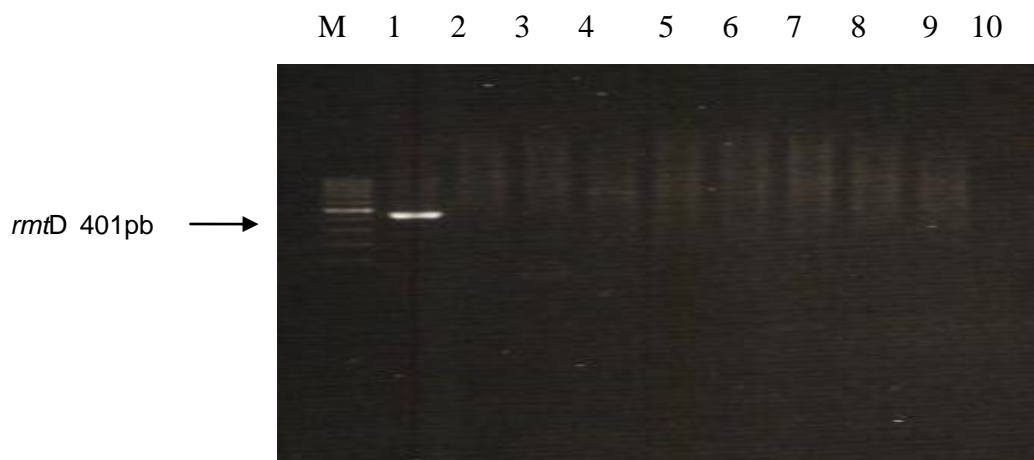
Nove isolados com CIM acima de 256µg/ml foram confirmados fenotipicamente como suspeitos de serem produtores de metilase 16S rRNA, os quais foram submetidos ao PCR para a detecção de genes *rmtD*. Os resultados obtidos para o gene *rmtD* para os nove isolados foram negativos (tabela 4) (Fig. 7).

Tabela 5: Resultado da pesquisa fenotípica para metilase 16S rRNA de 16 isolados de *P. aeruginosa* e resultado da pesquisa genotípica.

RESISTÊNCIA À AMICACINA				
Amostra	DD	Teste epsilométrico	Suspeita de metilase 16S rRNA	PCR - gene <i>rmtD</i>
19	6 R	> 256	+	-
31(1)	6 R	24	-	
99	6 R	24	-	
253(1)	6 R	32	-	
302(2)	6 R	> 256	+	-
420(2)	6 R	8	-	
470	6 R	12	-	
487	6 R	> 256	+	-
538	6 R	> 256	+	-
614(1)	10 R	24	-	
620(2)	6 R	32	-	
653(1)	6 R	> 256	+	-
653(2)	6 R	> 256	+	-
783(1)	6 R	> 256	+	-
783(2)	6 R	> 256	+	-
783(3)	6 R	> 256	+	-

DD: Disco – difusão





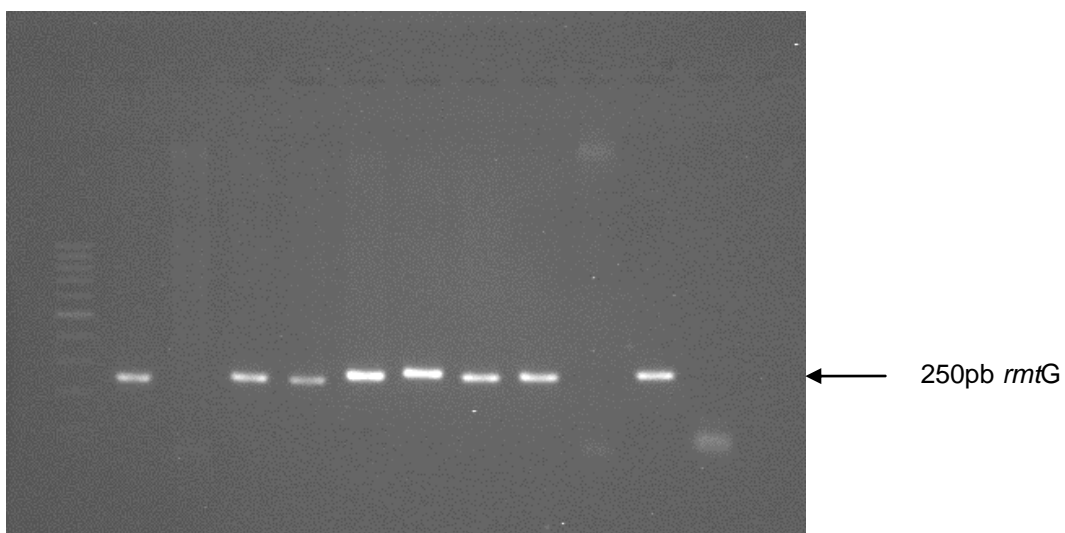
**Figura 7:** Análise dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *rmtD*. M – Marcador 100 pb, Linha 1 controle positivo PA 0905, Linha 2 - 19, Linha 3 - 302 (2), Linha 4 - 487, Linha 5 - 538, Linha 6 - 653 (1), linha 7 - 653 (2) Linha 8 - 783 (2), linha 9 - 783 (3), Linha 10 Branco.

Os isolados com resultado positivo para suspeita de 16S metilase rRNA foram submetidos à determinação da CIM para os antimicrobianos gentamicina e tobramicina para confirmação de elevada resistência a outros aminoglicosídeos, que é uma característica dos isolados produtores de metilases.

Os nove isolados de *P. aeruginosa* com resultado fenotípico sugestivo de metilase 16S rRNA foram submetidos a análise de PCR para o gene *rmtG* que foi descrito recentemente.

Sete isolados apresentaram resultado positivo para o gene *rmtG* e dois isolados apresentaram resultado negativo para o gene *rmtG* (Fig. 8 e Tab. 5). O sequenciamento dos produtos amplificados de DNA confirmaram a presença do gene *rmtG*.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



**Figura 8:** Análise dos isolados de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística através da técnica de PCR para o gene *rmtG*. M – Marcador 100 pb, Linha 1 - 302 (2), Linha 2 - 487, Linha 3 - 538, Linha 4 - 653 (1), linha 5 - 653 (2) Linha 6 - 783 (1), linha 7 - 783 (2), Linha 8 – 783 (3), Linha 9 – 19, Linha 10 controle positivo, Linha 11 controle negativo.

**Tabela 6:** Resultado de CIM e PCR para RmtG e PFGE para isolados com suspeita de produção de metilases 16S rRNA

ISOLADO NÚMERO	PACIENTE	IDADE	DATA DE COLETA	MICs (µg/ml)			PCR RmtG	Perfil PFGE
				AK	GEN	TOB		
302 (2)	3	13	16/02/2004	> 256	> 256	> 256	+	D
538	3	15	22/01/2007	> 256	> 256	> 256	+	D
653 (1)	3	16	07/05/2007	> 256	> 256	> 256	+	D
653 (2)	3	16	07/05/2007	> 256	> 256	> 256	+	D1
783 (1)	3	16	23/08/2007	> 256	> 256	> 256	+	D2
783 (2)	3	16	23/08/2007	> 256	> 256	> 256	+	D3
783 (3)	3	16	23/08/2007	> 256	> 256	> 256	+	D2
19	9	8	23/06/2003	> 256	>256	128	-	N
487	9	11	09/11/2006	> 256	24,0	8,0	-	N

GEN – gentamicina; TOB – tobramicina; AK – ampicacina

#### 4.4 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

O PFGE foi realizado para analisar os diferentes perfis genotípicos dos isolados de *P. aeruginosa* de amostras clínicas, verificar se houve persistência do isolado durante os três períodos de estudos, transmissão cruzada entre os pacientes e ainda a aquisição de *P. aeruginosa* com um novo perfil genotípico (Figura 9).

A partir da análise dos géis no software Bionumerics, foram obtidos 35 perfis de restrição em 129 isolados de *P. aeruginosa* de 11 pacientes em três períodos diferentes de coleta (Fig. 10). A porcentagem de similaridade foi obtida com base no coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 1,5%. Isolados do paciente 6 obtiveram um único perfil de restrição (J) representando 100% de similaridade no dendrograma.

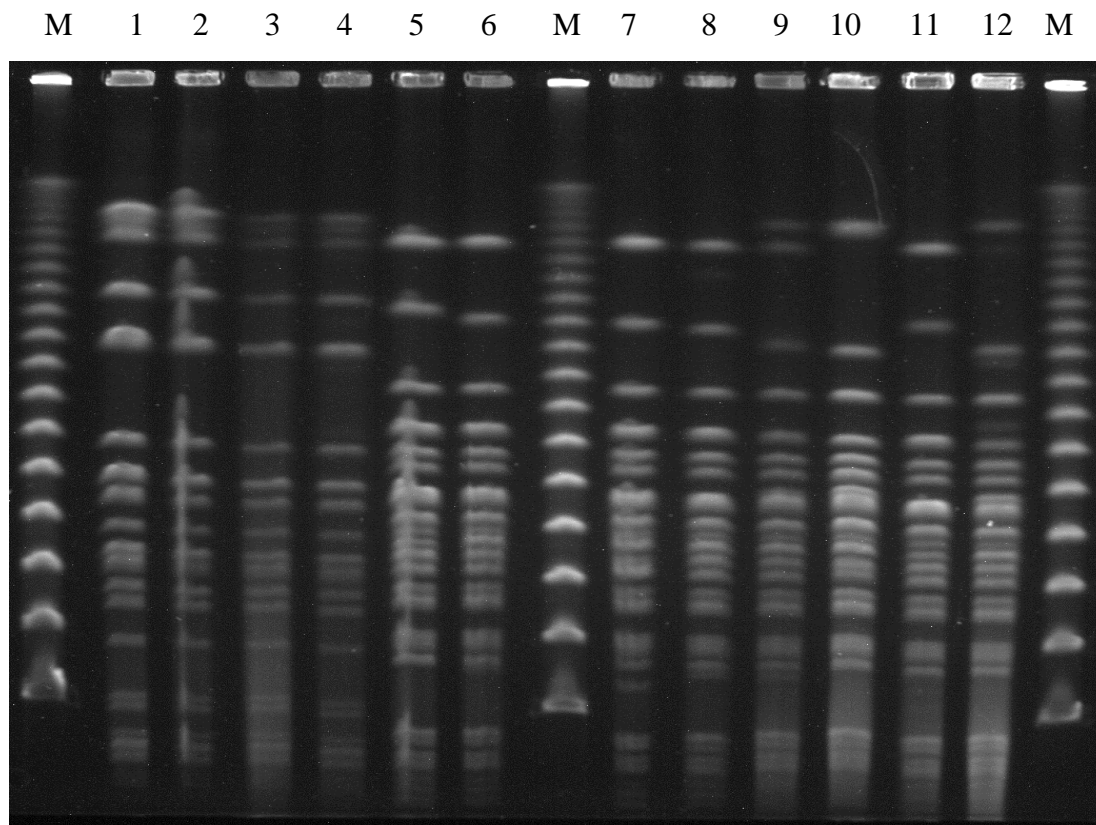
No dendrograma que apresenta todos os perfis de restrição detectados dos 129 isolados, pode ser observado pacientes que apresentam perfis de restrição com mais de 90% de similaridade entre si (pacientes 3, 5, 8 e 11).

Um isolado do paciente 8 apresentou 100% de similaridade ao perfil de restrição L detectado no paciente 7.

Os isolados do paciente 11 com perfis de restrição U e U1 apresentaram 80% de similaridade em relação ao paciente 2 com perfil de restrição C, C1 e C2.

Os pacientes 3, 4 com os respectivos perfis de restrição E, G apresentaram mais de 80% de similaridade entre si. O mesmo ocorreu com os pacientes 6 (J) e 4 (H), pacientes 8 (M, M1, M2, M3) e 9 (O) e paciente 11 perfis de restrição S e T.

Todos os isolados apresentaram mais de 60% de similaridade entre si.

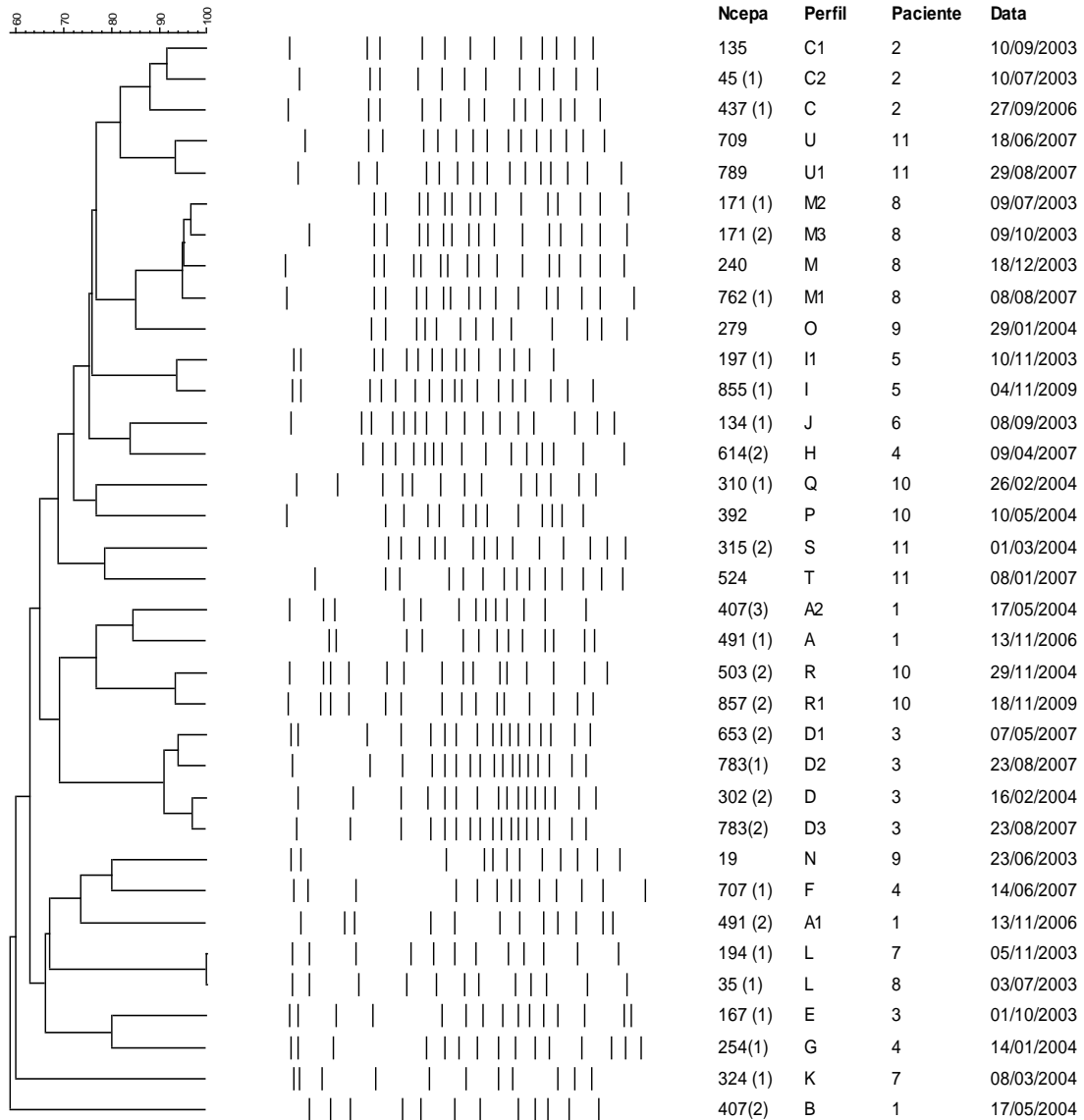


**Figura 9:** Perfis de isolados de *P. aeruginosa* obtidos do paciente 3 digeridos com enzimas de restrição Spe I obtidos através de PFGE. Linhas 1 a 12 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, 1 – 167(1), 2 – 167(2), 3 – 167(3), 4 - 302 (1), 5 – 302 (2), 6 – 470, 7 – 538, 8 – 653 (1), 9 – 653 (2), 10 – 783 (1), 11 – 783 (2), 12 – 783 (3) M – Marcador DNA de fago  $\lambda$  (48,5 kb).

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

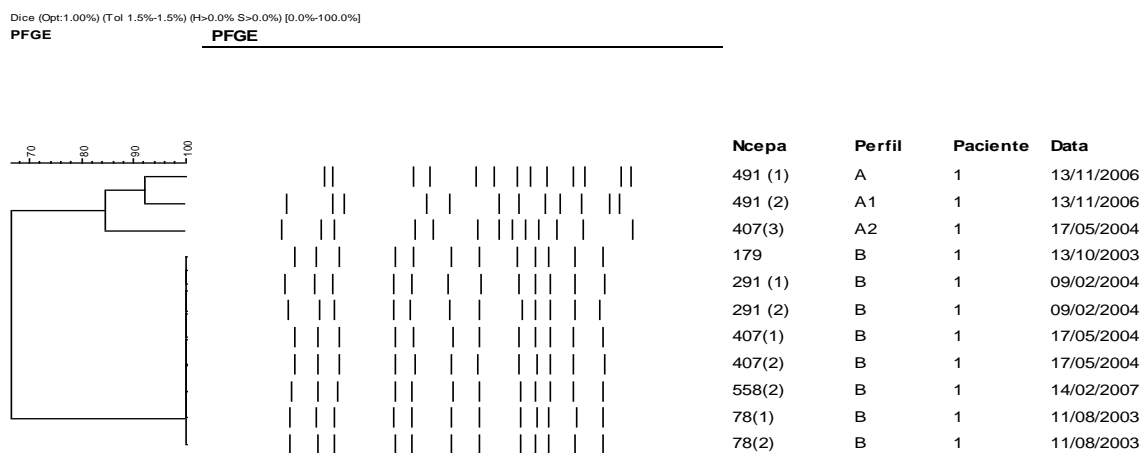
PFGE

PFGE



**Figura 10:** Dendrograma indicando a diversidade genética (uma amostra para cada tipo e subtipo de perfis de restrição) entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório de 11 pacientes portadores de fibrose cística digeridas com enzima de restrição Spe I e porcentagem de similaridade com uma tolerância Dice de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Em 2003 os isolados de *P. aeruginosa* do paciente 1 apresentaram o perfil de restrição B (179, 291-1e 2, 407 – 1e 2, 78 – 1 e 2) que foi persistente até o ano de 2007 (558 – 2) e apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, exceto o isolado 78-2 que apresentou resistência à gentamicina (Anexo 3). Em 2004 adquiriu um novo isolado com o perfil de restrição A2 (407-3) e em 2006 os perfis de restrição A e A1 (491-1 e 2) (Fig. 11) todos com similaridade em torno de 85-90% entre si. A similaridade entre o perfil B e os perfis A, A1 e A2 foi de 70%. O isolado 407-3 apresentou resistência à gentamicina e os isolados 491-1 e 2 apresentaram resistência aos antimicrobianos ticarcilina/ác. clavulânico e aztreonam (Anexo 3).



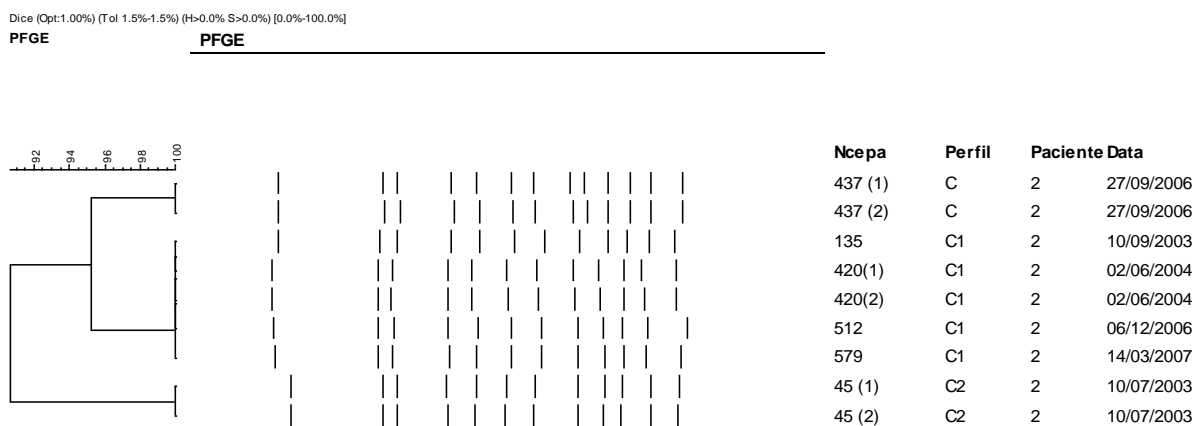
**Figura 11:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 1, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 2 apresentaram os perfis de restrição C2 (45 – 1 e 2), C1 (135, 420-1 e 2, 512, 579) e C (437-1 e 2) que foram detectados a partir de 2003 e persistiram até o ano de 2007 (Fig. 12) e apresentaram similaridade de 90% entre si.

Somente três isolados apresentaram resistência a alguns antimicrobianos. O isolado 437-2 (C) apresentou resistência somente a

levofloxacina, o isolado 135 (C1) apresentou resistência a ciprofloxacina e levofloxacina e o isolado 420-2 (C1) apresentou resistência a amicacina, gentamicina, netilmicina, ceftazidima, cefepime, aztreonam e levofloxacina (Tabela 2).

O isolado 420-2 foi submetido a pesquisa fenotípica para metilase 16S rRNA pelo método epsilométrico o qual obteve resultado negativo (Tabela 4). O isolado 420-2 também foi submetido a pesquisas genotípicas para beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) GES1, CTX-M e TEM, as quais resultaram negativas.

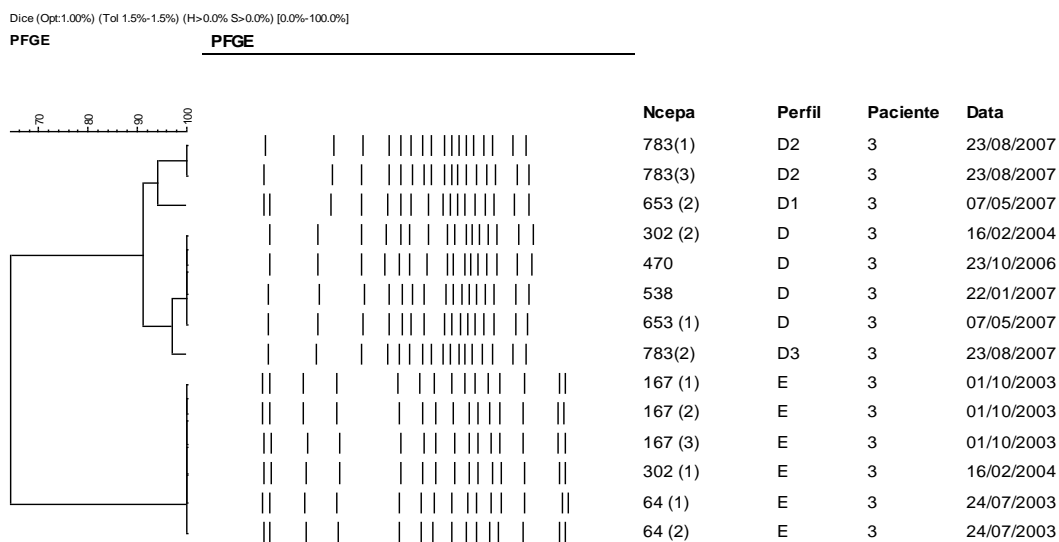


**Figura 12:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 2, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 3 apresentaram os perfis de restrição D, D1, D2, D3, com 90% de similaridade entre si e o perfil de restrição E com 70% de similaridade. O perfil de restrição E (64-1 e 2, 167-1, 2 e 3) foi detectado em julho e outubro de 2003, e em fevereiro de 2004 (302-1) pela última vez. O perfil de restrição D (302-2, 470, 538, 653-1) foi detectado em fevereiro de 2004, outubro de 2006 e janeiro e maio de 2007. O perfil de restrição D1 (653-2) foi detectado em maio de 2007 e em agosto foram detectados os perfis de restrição D2 (783-1 e 3) e D3 (783-2) (Fig. 13).

O perfil de restrição E contém apenas dois isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos cefepime (64-1) e gentamicina (167-1) (Anexo 3).

Os perfis de restrição D, D1, D2 e D3 apresentaram o mesmo perfil de resistência frente aos antimicrobianos aminoglicosídeos e quinolonas testados (tabela 2). Todos os isolados do perfil de restrição D foram submetidos a pesquisa fenotípica para metilase 16S rRNA pelo método epsilométrico e somente o isolado 470 apresentou resultado negativo. Os isolados que apresentaram resultado positivo foram submetidos a análise de PCR para *rmtD* e obtiveram o resultado negativo, também foram submetidos a análise de PCR para a metilase recém descrita RmtG e todos os isolados apresentaram resultado positivo, os quais foram confirmados por sequenciamento de DNA (Tabelas 4 e 5).



**Figura 13:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 3, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

O paciente 4 teve isolados com os perfis de restrição F, G e H, com similaridade acima de 60%. O perfil de restrição F (707 – 1 e 746 – 1) e H (614

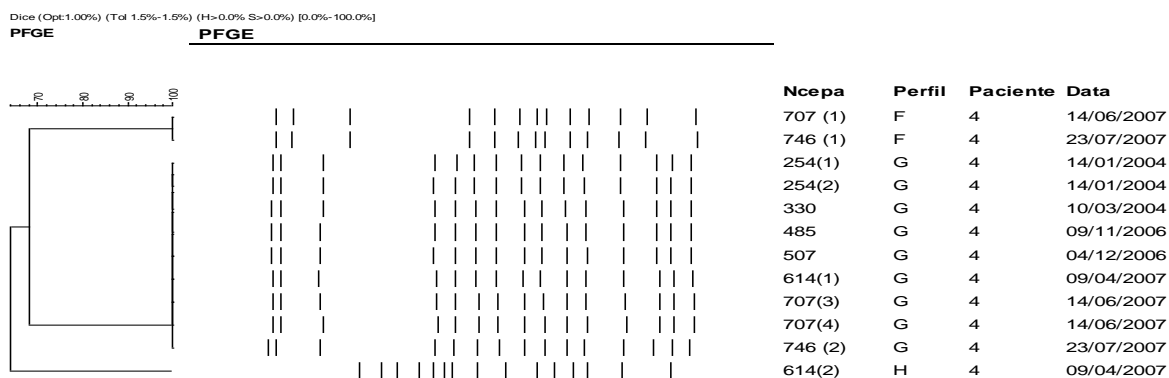


– 2) foram detectados somente em 2007. O perfil de restrição G (254 - 1 e 2, 330, 485, 507, 614 -1, 707 – 3 e 4 e 746-2) foi detectado em 2004 e persistiu até 2007. (Fig. 14).

Os perfis de resistência foram variáveis para os perfis de restrição observados nos isolados deste paciente. Os isolados 254-1 e 2 apresentaram resistência aos antimicrobianos cefepime e ticarcilina/ác. clavulânico, respectivamente, e ambos foram resistentes à piperacilina/tazobactam (Anexo 3).

Os isolados 485, 507, 707 -1, 3 e 4 e 746-1 e 2 apresentaram resistência aos carbapenêmicos e foram submetidos a pesquisa fenotípica para metalo-beta-lactamase apresentando resultado negativo apenas os isolados 485 e 507 (Tabela 2 e 3). Os isolados com resultado positivo foram submetidos a análise de PCR para a detecção de *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>GES</sub> e o resultado foi negativo para todos os isolados (Fig. 3, 4, 5 e 6).

Os isolados 507, 707-1 e 4 também apresentaram resistência a piperacilina/tazobactam, e o isolado 507 ainda apresentou resistência a gentamicina e o isolado 707-1 à levofloxacina. O isolado 614-1 apresentou resistência aos antimicrobianos amicacina, gentamicina e netilmicina, aztreonam, piperacilina/tazobactam e levofloxacina, ao ser submetido a pesquisa fenotípica para metilases 16S rRNA pelo método epsilométrico obteve resultado negativo (Tabela 2 e 4).



**Figura 14:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 4, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 5 apresentaram dois perfis de restrição I e I1 com mais de 90% de similaridade. O perfil de restrição I (855-1 e 2) foi detectado somente em 2009. O perfil de restrição I1 (197-1 e 2, 253-1, 2 e 3, 31-1 e 2, 769-1, 2 e 3, 847-1 e 2 e 99) foi detectado a partir de 2003 e persistiu até 2009 (Fig. 15).

Os isolados 31-1, 99 e 253-1 apresentaram resistência aos aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e netilmicina, foram submetidos a pesquisa fenotípica de metilase 16S rRNA pelo método epsilométrico e obtiveram resultado negativo (tabela 2 e 4).

Os isolados 253-3 e 769-1 apresentaram resistência ao antimicrobiano imipenem e foram submetidos a pesquisa fenotípica para metalo-beta-lactamase, e somente o isolado 769-1 obteve resultado positivo e foi submetido a pesquisa genotípica para os genes *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>GES</sub>* com resultado negativo (Fig. 3, 4, 5 e 6) (Tabela 2 e 3).

O isolado 769-1 também apresentou resistência à amicacina. Os isolados 31-2 e 197-2 apresentaram resistência somente a gentamicina. Os isolados 847-1 e 855-1 com perfil de restrição (H1 e H) apresentaram resistência somente a amicacina (Anexo 3).

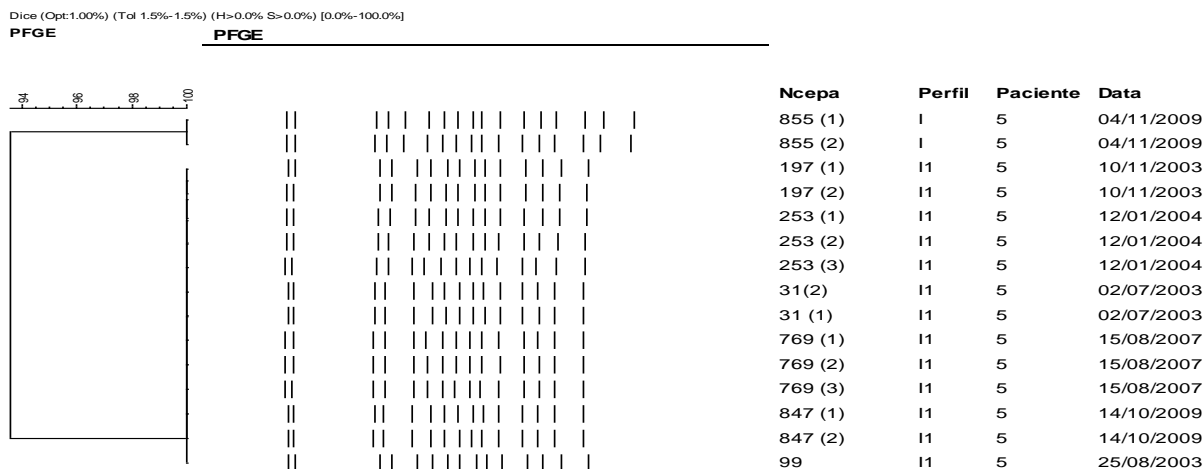


Figura 15: Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 5, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 6 apresentaram um único perfil de restrição (J) na primeira coleta em 2003 e permaneceu o mesmo até 2007. Não foi detectado nenhum outro perfil de restrição durante os três períodos de coleta (Fig. 16), porém o perfil de sensibilidade apresentou algumas variações.

Os isolados 308-2 e 787 apresentaram resistência somente a levofloxacina. Os isolados 38-1 e 3, 134-1, 308-1, 484-1 o mesmo perfil de resistência frente os antimicrobianos ciprofloxacina e levofloxacina (Anexo 3).

Os isolados 484-2 e 697 apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos imipenem, ciprofloxacina e levofloxacina, porém o isolado 697 também apresentou resistência ao meropenem (Tabela 2).

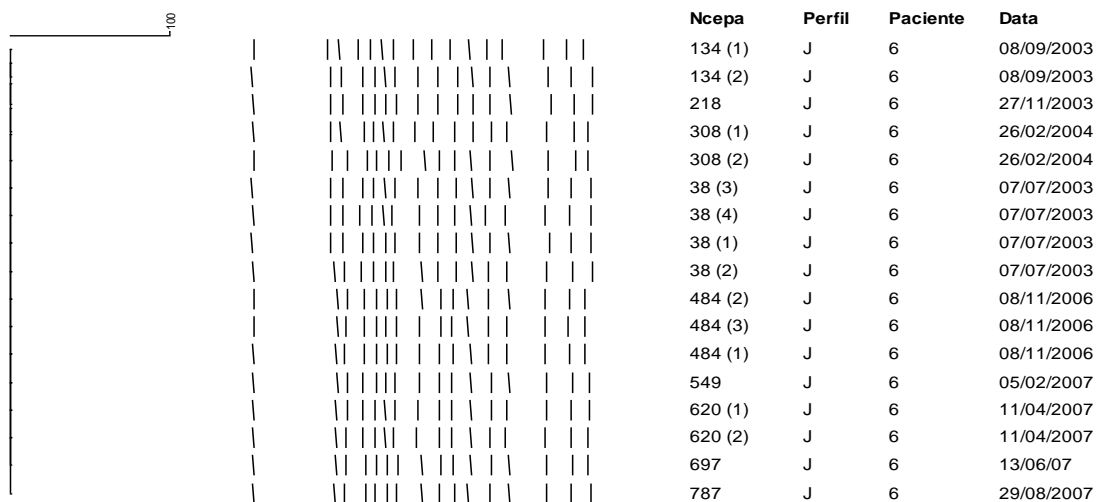
O isolado 484-3 apresentou resistência aos antimicrobianos aztreonam, ciprofloxacina, levofloxacina e polimixina B, que ao ser analisada pelo método de microdiluição para polimixina B apresentou sensibilidade a droga (Anexo 3).

O isolado 620-1 apresentou resistência aos antimicrobianos meropenem, aztreonam, ciprofloxacina e levofloxacina (Anexo 3).

O isolado 620-2 apresentou resistência aos antimicrobianos imipenem, amicacina, gentamicina, netilmicina, ciprofloxacina e levofloxacina (Tabela 2). Os isolados 620-2, 484-2 e 697 foram submetidos a pesquisa fenotípica para metalo-beta-lactamase onde foi obtido resultado positivo para os três isolados que foram submetidos a pesquisa genotípica para *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>GES</sub> com resultado negativo (Fig. 3, 4, 5 e 6) (Tabela 3). O isolado 620-2 também foi submetido a pesquisa fenotípica para metilase 16S rRNA com resultado negativo (tabela 4).

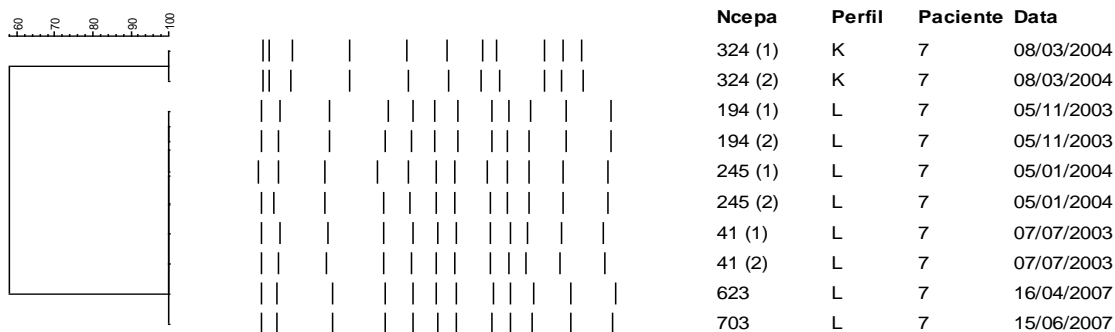
Para os isolados do paciente 7 o perfil de restrição L (194-1 e 2, 245-1 e 2, 41-1 e 2, 623, 703) persistiu de 2003 à 2007, sendo que em 2004 adquiriu o perfil de restrição K (324-1 e 2) que não mais foi detectado nos trabalhos subsequentes (Fig. 17), a similaridade entre os dois perfis de restrição foi de 60%. Somente os isolados 194-2 e 245-1 com perfil de restrição L, apresentaram resistência ao antimicrobiano azteonam (Anexo 3).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
**PFGE** **PFGE**



**Figura 16:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 6, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta

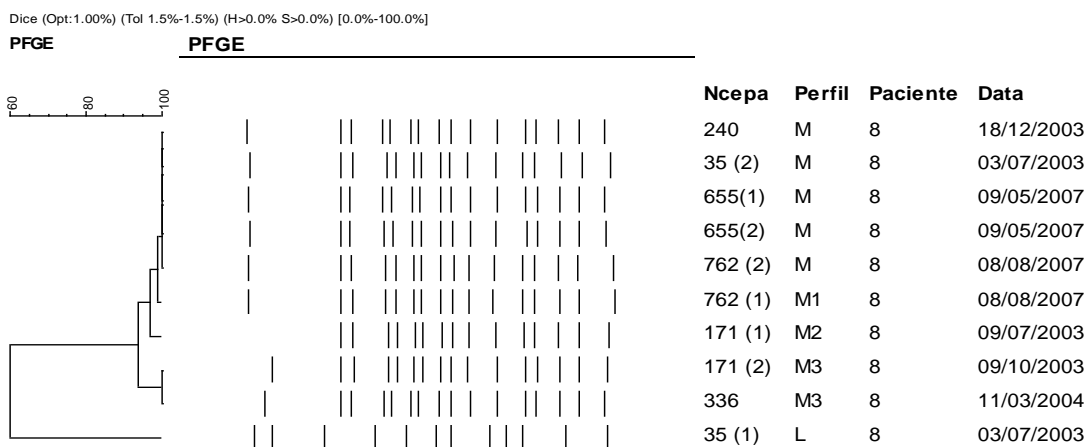
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
**PFGE** **PFGE**



**Figura 17:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 7, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 8 apresentaram o perfil de restrição M (240, 35-2, 655 1 e 2, 762-2) em 2003 e 2007, o perfil de restrição M1 (762-1) foi detectado somente em 2007, os perfis de restrição M2 (171-1) e M3 (171-2, 336) foram detectados somente em 2003 e apresentaram mais de 90% de similaridade entre si (Fig. 18). O perfil de restrição L (35 – 1) foi detectado apenas na coleta de 2003 e é o mesmo perfil de restrição detectado para o paciente 7 (Fig. 17), pois apresentam 100% de similaridade.

O perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos testados foi variável. O isolado 35-1 apresentou resistência somente a amicacina. Os isolados 171-1 e 240 apresentaram resistência aos antimicrobianos aztreonam e levofloxacina respectivamente. Os isolados 35-2, 655-1e 655-2 apresentaram resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e levofloxacina, meropenem e levofloxacina, amicacina e gentamicina respectivamente (Anexo 3).



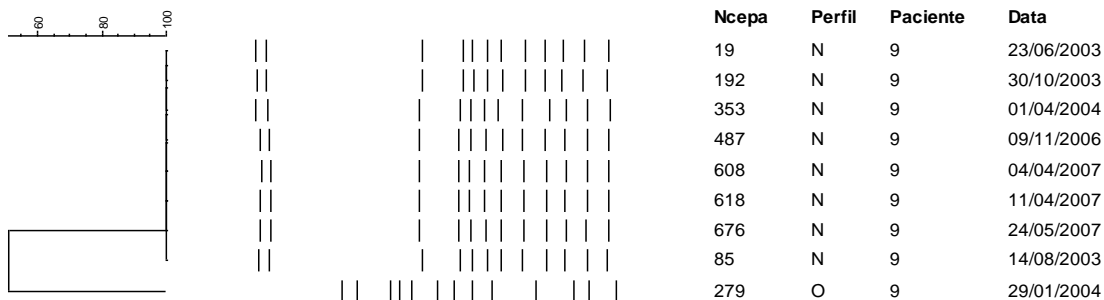
**Figura 18:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 8, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 9 apresentaram os seguintes perfis de restrição M e N, com similaridade de aproximadamente 60%. Perfil de restrição N (19, 192, 487, 608, 618, 676, 85) foi detectado em 2003 e o perfil de restrição O (279) em 2004. O perfil de restrição N persistiu até 2007 e o perfil de restrição O foi detectado somente em 2004 (Fig. 19).

Somente os isolados com perfil de restrição N apresentaram resistência aos antimicrobianos. Os isolados 19 e 487 apresentaram sensibilidade somente a dois antimicrobianos meropenem e polimixina B e piperacilina/tazobactam e polimixina B respectivamente, sendo resistente a todos os outros antimicrobianos testados (Tabela 2). Ambos isolados foram submetidos a pesquisa fenotípica para as suspeitas de produção de metalo-beta-lactamase, com resultado positivo somente para o isolado 487 e metilase 16S rRNA, com resultado positivo para ambos isolados. Ao serem submetidas a pesquisa genotípica por PCR para os genes *rmtD* e *rmtG* e apresentaram resultado negativo para ambos isolados (Tabela 3 e 4) (Fig. 7 e 8). O isolado 487 também foi submetido a pesquisa genotípica para os genes *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>GES</sub>* obtiveram resultado negativo (Fig. 3, 4, 5 e 6).

O isolado 85 apresentou resistência somente a ciprofloxacina. Os isolados 192 e 353 apresentaram resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e levofloxacina e o isolado 192 ainda foi resistente a gentamicina (Anexo 3). Os isolados 608 e 618 apresentaram resistência aos antimicrobianos imipenem, ciprofloxacina e levofloxacina, o isolado 608 também apresentou resistência a meropenem e gentamicina (Tabela 2). O isolado 676 apresentou resistência aos antimicrobianos imipenem e aztreonam (Tabela 2).

Os isolados 608, 618 e 676 foram submetidos a pesquisa fenotípica para metalo-beta-lactamase com resultado positivo para os isolados 618 e 676 que ao serem submetidos a pesquisa genotípica para os genes *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>GES</sub>* apresentaram resultado negativo (Tabela 3) (Fig. 3, 4, 5 e 6).

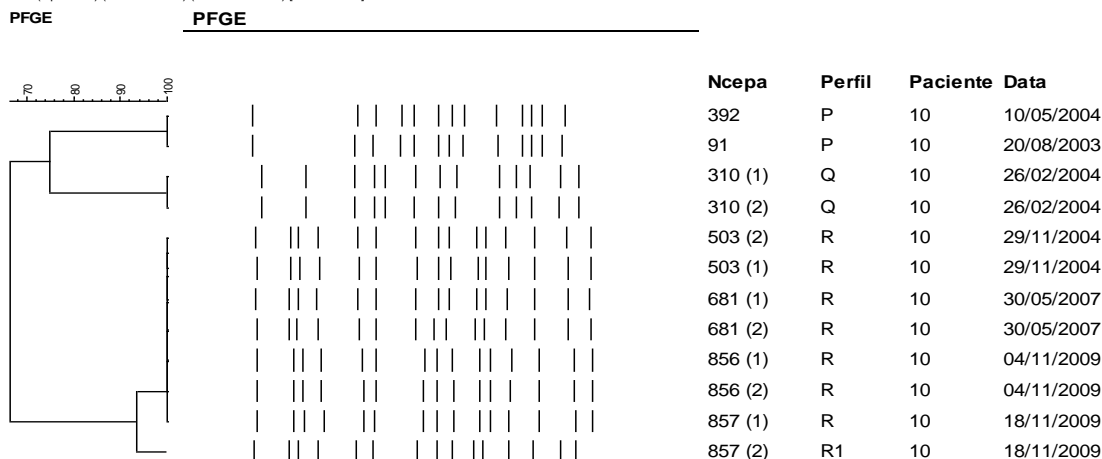


**Figura 19:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 9, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Os isolados do paciente 10 apresentaram os perfis de restrição P, Q, R e R1, e similaridade com cerca de 70%. O perfil de restrição P (392 e 91) foi detectado em 2003, não sendo detectado após 2004. Em 2004 foram detectados dois novos perfis de restrição Q (310-1 e 2) e R (503-1 e 2, 681-1 e 2, 856-1 e 2, 857-1), sendo que o perfil de restrição Q não mais foi detectado e o perfil de restrição R persistiu até 2009 (Fig.20). O perfil R1 (857-2) foi detectado somente em 2009.

Somente os isolados 310-1 e 2 com perfil de restrição Q e o isolado 392 com perfil de restrição P apresentaram resistência a alguns antimicrobianos. O isolado 392 apresentou resistência aos antimicrobianos ceftazidima e aztreonam, o isolado 310-1 apresentou resistência à ticarcilina/ác. Clavulânico e piperacilina/tazobactam e o isolado 310-2 apresentou resistência aos mesmos antimicrobianos que os isolados 392 e 310-1 (Anexo 3).

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

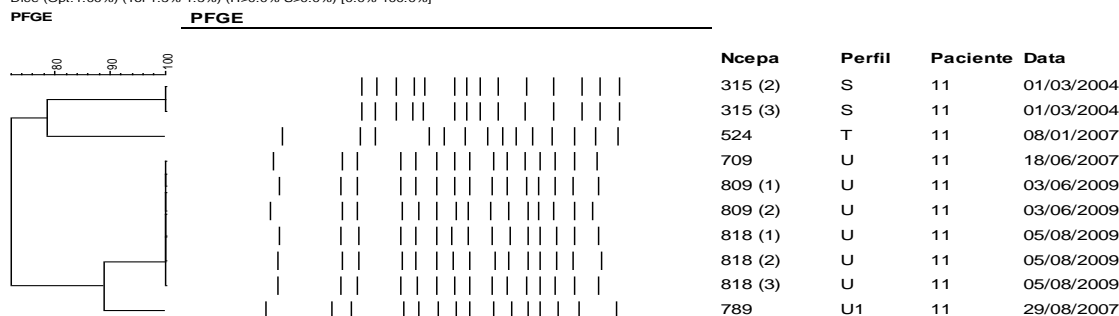


**Figura 20:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre os isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 10, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.

Nos isolados do paciente 11 o perfil de restrição S (315 – 2 e 3) foi detectado apenas em 2004 não sendo detectado nos outros períodos de coleta. O perfil de restrição T (524) foi detectado em 2007 e depois não foi mais detectado. Já o perfil de restrição U (709, 809 – 1 e 2, 818 – 1, 2 e 3) foi detectado em 2007 e persistiu até 2009 e o perfil de restrição U1 (789) foi detectado somente em 2007 (Fig. 21).

Somente o isolado 789 com perfil de restrição T1 apresentou resistência a um único antimicrobiano, imipenem, sendo submetido a pesquisa fenotípica de metalo-beta-lactamase e obteve resultado negativo (Tabela 2 e 3).

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



**Figura 21:** Dendrograma indicando a diversidade genética entre as isolados de *P. aeruginosa*, obtidos do trato respiratório do paciente 11, digeridas com enzima de restrição Spe I com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número de amostra, perfil de PFGE, paciente e data de coleta.



## DISCUSSÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria importante nas infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística e cada vez mais ela é responsável pela morbidade e mortalidade desses pacientes, devido a sua capacidade de desenvolver o fenótipo mucóide e mecanismos de resistência que inibem a ação dos antimicrobianos atualmente utilizados, tornando impossível erradicá-la (Spencer et al, 2003).

As análises realizadas neste estudo, para avaliar a sensibilidade de *P. aeruginosa* demonstraram que o perfil de sensibilidade se modifica ao longo do tempo. Os isolados de *P. aeruginosa* do primeiro período (2003/2004) e do terceiro período (2009) apresentaram atividade antimicrobiana bastante eficiente, sendo que poucos antimicrobianos tiveram sua atividade inibida. Isso pode ser justificado pelo fato de que a maioria dos pacientes participantes são menores de dez anos e apresentam cepas adquiridas do meio ambiente, as quais são mais suscetíveis aos antimicrobianos. Os pacientes participantes do segundo período (2006-2007) são os mesmos do primeiro, porém, agora, já passaram dos 10 anos. Por ser uma colonização de longa duração as cepas desses pacientes já adquiriram o fenótipo mucóide e/ou mecanismos de resistência que inibem a ação dos antimicrobianos dificultando o tratamento dos pacientes com fibrose cística. Isto explica o motivo pelo qual os antimicrobianos atualmente utilizados apresentaram menor atividade frente aos isolados de *P. aeruginosa*.

Ao analisar os dados do perfil de sensibilidade, individualmente observamos que em relação ao grupo dos carbapenêmicos, Silbert et al, 2001 detectaram 93,8% de sensibilidade para o imipenem, Nazik et al, 2007 detectaram 82% de sensibilidade, valores que condizem com os achados neste estudo no primeiro período 95,5% de sensibilidade e terceiro período com 84,6% de sensibilidade respectivamente. Logan et al, 2012 detectaram sensibilidade (70%) para o imipenem abaixo do valores encontrados por outros

autores, mas que estão de acordo com os valores achados no segundo período (67,3%) deste trabalho. Para o meropenem Silbert et al, 2001 e Vosahlikova et al, 2007 detectaram sensibilidade de 96,9% e 95,6% respectivamente, valores que corroboram com os encontrados neste estudo no primeiro e terceiro período que foram de 100% de sensibilidade. Nazik et al, 2007 detectaram sensibilidade de 84% para meropenem, valor próximo ao detectado neste estudo no segundo período 75,5% de sensibilidade. Logan et al, 2012 ao contrário detectaram uma baixa sensibilidade 47,5%. A significativa diminuição da atividade antimicrobiana dos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) demonstrada nesta discussão, indica que *P. aeruginosa* tem desenvolvido mecanismos de resistência cada vez mais eficientes. Isto ocorre devido a ampla utilização desse grupo de antimicrobiano no tratamento das infecções de pacientes com fibrose cística ao longo do tempo.

Dentro do grupo dos aminoglicosídeos, foi detectada alta sensibilidade para amicacina por Vosahlikova et al, 2007 (95,6%), Nazik et al, 2007 e Logan et al, 2012 detectaram respectivamente 80% e 75% de sensibilidade e condizem com os resultados obtidos neste estudo no primeiro e terceiro períodos (83,6% e 76,9%). Contrário a esses resultados o segundo período deste estudo obteve um valor mais baixo de sensibilidade para amicacina 59,2%. Logan et al, 2012 e Vosahlikova et al, 2007 detectaram alta sensibilidade para gentamicina 87,5 e 86,9%, Nazik et al, 2007 apresentaram resultados de sensibilidade (73%) que estão mais próximos dos detectados neste estudo nos primeiro e terceiro períodos (67,2% e 76,9%). No segundo período a sensibilidade foi um pouco menor 55%. Para netilmicina Vosahlikova et al, 2007 e Nazik et al, 2007 detectaram 88,4% e 80% de sensibilidade, e corroboram com os resultados obtidos neste estudo nos primeiro e terceiro períodos (89,6% e 100%). Silbert et al, 2001 detectaram 50% de sensibilidade para isolados mucóides e 56% de sensibilidade para isolados não mucóides, ambos resultados condizem com os detectados no segundo período, 69,4% de sensibilidade para netilmicina.

Tobramicina é um antimicrobiano que apresentou boa atividade. Os resultados de sensibilidade nos três períodos foram 94%, 81,6% e 100% de sensibilidade, respectivamente, e os valores condizem com os detectados por Vosahlikova et al, 2007 (97,1%) e Nazik et al, 2007 (82%). Somente Logan et al, 2012 detectaram baixa sensibilidade, apenas 32%. Podemos observar que o grupo dos aminoglicosídeos também faz parte dos antimicrobianos de escolha nos tratamentos por antibioticoterapia por apresentar boa atividade antimicrobiana frente à *P. aeruginosa*. Este estudo demonstrou que, com o uso prolongado dos aminoglicosídeos ocorreu uma seleção entre bactérias sensíveis e aquelas que desenvolveram fenótipo mucóide e/ou adquiriram resistência a este grupo de antimicrobianos. Somente tobramicina apresentou uma diminuição significativa em sua atividade antimicrobiana ao longo da última década, o que pode ser observado pelo resultado apresentado por Logan et al (2012) em relação a Silbert et al (2001).

As cefalosporinas, ceftazima e cefepime também apresentaram excelente atividade antimicrobiana nos testes *in vitro*. Neste estudo foram detectados nos três períodos sensibilidade de 91%, 96% e 100% para ceftazidima em concordância com os valores detectados por Vosahlikova et al, 2007 (94,2%) e Silbert et al, 2001 (81,4%). Logan et al, 2012 obtiveram um resultado menor de sensibilidade (55%) para ceftazidima. Para cefepime a sensibilidade detectada neste estudo nos três períodos foram de 89,6%, 96% e 100% respectivamente em concordância com os valores encontrados por Vosahlikova et al, 2007 (95,6%) e Silbert et al, 2001 para isolados não mucóides com 83% de sensibilidade. Ao contrário desses resultados Silbert et al, 2001 detectaram atividade antimicrobiana de cefepime de apenas 42% para isolados com fenótipo mucóide. Embora os resultados discutidos neste estudo demonstrem que as cefalosporinas são antimicrobianos com boa atividade para o tratamento de pacientes com fibrose cística, Logan et al (2012) detectaram baixa atividade para ceftazidima e Silbert et al (2001) detectaram baixa atividade para cefepime em isolados com fenótipo mucóide. Os resultados de

ambos autores sugerem que o uso prolongado deste grupo de antimicrobiano pode diminuir sua atividade frente aos mecanismos de resistência adquiridas ao longo do tempo.

Em relação ao monobactam aztreonam, Silbert et al (2001), detectaram 84% de sensibilidade em isolados não mucóides que condizem com este estudo no primeiro período, 73,1% de sensibilidade, e terceiro período, 76,9% de sensibilidade. Os isolados do segundo período tiveram 58% de sensibilidade em concordância com Logan et al, 2012 que detectaram 55% de sensibilidade e Nazik et al, 2007 que detectaram 53% de sensibilidade. No início da década de 2000 o monobactâmico aztreonam tinha excelente atividade antimicrobiana como detectado por Silbert et al (2001), porém após aproximadamente 6 anos depois sua atividade caiu pela metade (Nazik et al, 2007) e mantém assim até hoje (Logan et al, 2012).

O antimicrobiano ticarcilina-ácido clavulânico obteve ótima atividade nos três períodos analisados neste estudo. *P. aeruginosa* apresentou 94% de sensibilidade nos primeiro e segundo períodos e 100% de sensibilidade no terceiro período, esses valores condizem com Silbert et al, 2001 que detectaram 83,5% de sensibilidade.

Para o antimicrobiano piperacilina-tazobactam os resultados foram semelhantes aos de ticarcilina-ácido clavulânico e encontram-se de acordo com a literatura. No primeiro período houve 92,5% de sensibilidade, no segundo período 92% de sensibilidade e no terceiro período 100% de sensibilidade. Silbert et al, 2001 detectaram 85,6% de sensibilidade, Nazik et al, 2007 86% de sensibilidade e Logan et al, 2012 detectaram 100% de sensibilidade, demonstrando assim a conformidade dos resultados obtidos neste estudo.

Para ciprofloxacina o primeiro período detectou 80,6% de sensibilidade e o terceiro 84,6% de sensibilidade e corroboram com Vosahlikova et al, 2007 que detectaram 84% de sensibilidade e Silbert et al, 2001 que detectaram 84% de sensibilidade para isolados não mucóide. O segundo período detectou 64% de sensibilidade que condiz com Nazik et al, 2007 com 61% de sensibilidade e

Silbert et al, 2001 que detectaram 50% de sensibilidade para isolados mucóides. Logan et al, 2012 detectaram 40% de sensibilidade, valor menor que o detectado neste estudo. Ciprofloxacina é um antimicrobiano comumente utilizado nas infecções bacterianas, porém bactérias como *P. aeruginosa* tem adquirido meios de impedir a atividade deste antimicrobiano que diminuiu muito na última década como pode ser observado comparando os resultados obtidos por Silbert et al (2001) e Logan et al (2012).

Em relação ao antimicrobiano levofloxacina, *Pseudomonas aeruginosa* apresentou 76,1% de sensibilidade no primeiro período, 84,6% de sensibilidade no terceiro período e 48% de sensibilidade no segundo período.

Para polimixina B a atividade antimicrobiana foi elevada atingindo 100% de eficácia nos primeiro e terceiro períodos e 94% no segundo período. No segundo período dois isolados que apresentaram resistência a polimixina B pelo método de disco-difusão foram submetidos à confirmação pela determinação da concentração inibitória mínima, e constatou-se a eficácia de 100% do antimicrobiano, pois a resistência de *P. aeruginosa* a esse antimicrobiano é rara.

A queda na eficácia desses antimicrobianos, se deve ao fato de *P. aeruginosa* colonizar as vias aéreas dos pacientes portadores de fibrose cística e desenvolver o fenótipo mucóide, o que torna sua erradicação muito difícil (Spencer et al, 2003).

No presente estudo todos os isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), foram submetidos a pesquisa fenotípica para a suspeita de produção de metalo-beta-lactamases.

Todos os PCRs foram negativos para os genes testados. Esses mesmos isolados também foram submetidos ao PCR para a detecção dos genes *bla<sub>GES</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>* os quais foram negativos. Esses resultados sugerem a possibilidade de *P. aeruginosa* estar produzindo enzimas ainda não descritas ou outro mecanismo de resistência já conhecidos, como por exemplo, a perda de porina ou super expressão da bomba de efluxo.

Os isolados que apresentaram resistência aos aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, netilmicina e tobramicina) foram submetidos a pesquisa fenotípica para suspeita de produção de metilases 16S rRNA (alto nível de resistência aos aminoglicosídeos). De acordo com Doi & Arakawa (2007c) cepas produtoras de metilases 16S rRNA, ArmA, RmtA, RmtB, RmtC e RmtD, apresentam alto nível de resistência aos aminoglicosídeos ( $\geq 256\mu\text{g/ml}$ ), o que as difere das produtoras de transferases, as quais podem apresentar resistência a todos os aminoglicosídeos, desde que sejam produzidas mais de uma enzima ao mesmo tempo, mas em nível mais baixo que as metilases. Atualmente estão descritas as seguintes metilases ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG e RmtH (Doi & Arakawa, 2007c; Wachino & Arakawa, 2012; Bueno et al, 2013).

Aqueles isolados com resultado fenotípico positivo foram submetidos a análise genotípica para metilase 16S rRNA (gene *rmtD*) e não houve a amplificação do gene em nenhum dos isolados.

Doi et al, 2007a descreveram a co-produção de SPM e RmtD em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada de um hospital do Estado de São Paulo. Baseado nisso no nosso estudo foi detectado um isolado (487) que apresentou suspeita de co-produção das enzimas metalo-beta-lactamases e metilases 16S rRNA, mas com resultado negativo para ambas.

Recentemente, Bueno et al, 2013 descreveram nova metilase 16S rRNA, RmtG produzida por *Klebsiella pneumoniae* isoladas em amostras clínicas de hospitais do Estado de São Paulo. Os isolados de *P. aeruginosa*, deste estudo, com resultado fenotípico positivo para suspeita de produção de metilase 16S rRNA e negativos para *rmtD*, foram submetidos a análise genotípica para *rmtG*.

Foram detectados resultados positivos para sete isolados de um mesmo paciente os quais foram confirmados por sequenciamento de DNA. Este é o primeiro relato de *P. aeruginosa* produtora de metilase 16S rRNA (gene *rmtG*), responsável pelo alto nível de resistência a todos os antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos. Esses resultados indicam que RmtG foi produzida por *P.*

*aeruginosa*, já em 2004 no Brasil, seis anos antes de ser identificado o primeiro isolado de *K. pneumoniae* produtora de RmtG. Portanto, é possível que RmtG tenha sua origem em *P. aeruginosa* e, posteriormente, foi transferida para *K. pneumoniae*, isso é difícil de determinar devido a falta de histórico de isolados bacterianos. Esta é a primeira descrição da produção de 16S-RMTase em paciente com fibrose cística. Enquanto a resistência antimicrobiana em pacientes com fibrose cística associada tende a ser adaptável, esses resultados mostram que a resistência adquirida pode desempenhar um papel significativo na multirresistência dos isolados provenientes desses pacientes.

O isolado 420-2 que apresentou resultado negativo para pesquisa fenotípica para produção de metilases 16S rRNA e que também apresentou resistência as cefalosporinas e ao monobactam, foi submetido à análise genotípica para a detecção de ESBL (genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>) com resultado negativo. Esses resultados indicam que os mecanismos de resistência podem ser a modificação enzimática por O-fosforilação, O-adenilação ou nucleotidiltransferase, ou ainda outros mecanismos como bomba de efluxo. Há ainda a possibilidade de *P. aeruginosa* estar produzindo enzimas ainda não descritas.

Em estudos realizados por Waters et al, 2012 e Kidd et al, 2011, onde comparam metodologias de tipagem genética, atribuem à técnica de PFGE mais de 90% de eficácia na diferenciação de isolados bacterianos, concordando com estudos anteriores. Em razão disso a técnica de tipagem molecular PFGE foi escolhida para a identificação dos isolados de *P. aeruginosa* do presente estudo.

Foram obtidos 35 perfis de restrição diferentes com similaridade de 70% entre os 129 isolados de *P. aeruginosa*, de 11 pacientes. Valores semelhantes foram encontrados em estudos realizados em diferentes países. Na Irlanda Logan et al, 2012 obtiveram 57 perfis de restrição diferentes com similaridade acima de 70%, de 313 isolados de *P. aeruginosa* de 68 pacientes. No Canadá, Waters et al, 2012, analisaram 48 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de 48

pacientes, dos quais obtiveram 31 perfis de restrição, sendo que a maioria apresentou similaridade de 80%. Os estudos realizados por Silbert et al, 2001, no Brasil detectaram 56 perfis de restrição em 97 isolados de *P. aeruginosa* de 43 pacientes. Na Turquia Nazik et al, 2007, em seus estudos, detectaram 21 perfis de restrição em 49 isolados de *P. aeruginosa* de 16 pacientes, porém Silbert et al, 2001 e Nazik et al, 2007 não relatam a similaridade entre os perfis encontrados. Ao contrário destes achados, uma similaridade por volta de 40% foi detectada em 24 isolados de *P. aeruginosa* de 21 pacientes na Inglaterra por Forthergill et al, 2010. Silbert et al (2001), Nazik (2007) e Logan et al (2012) observaram em seus estudos a persistência de um mesmo clone por um longo período de tempo. Estes dados corroboram com os resultados encontrados neste estudo, onde alguns pacientes exibiram isolados coletados em datas diferentes e que continham o mesmo perfil de restrição, indicando a persistência do clone. Os perfis de restrição apresentados pelos pacientes 5 (I1) e 6 ( J ) ao longo dos períodos de coleta demonstram de maneira clara a persistência de um mesmo clone durante um longo período de tempo.

O presente estudo também detectou em alguns pacientes a aquisição de um novo clone durante os períodos de coleta, o que pode ser observado nos resultados apresentados pelos pacientes 1 e 4. Esse mesmo fenômeno pode ser observado nos estudos realizados por Nazik et al (2007), Vosahlikova et al (2007) e Silbert et al (2001). Em concordância com Silbert et al (2001), podemos observar em alguns pacientes a predominância de um clone em um período e em outro período um outro clone, como foram detectados no paciente 10.

Ao analisar a relação existente entre o perfil de restrição e o perfil de resistência dos isolados de *P. aeruginosa*, foi possível constatar que alguns isolados apresentavam perfis de restrição diferentes e perfis de resistência iguais, como observado na tabela 2 para os pacientes 4, 5 e 11 ou perfis de restrição idênticos (pacientes 6 e 9) e perfis de resistência diferentes, o que sugere que os perfis de restrição não estão intimamente relacionados com os



perfis de sensibilidade. Em conformidade com Foweraker et al, 2005, Nazik et al, 2007 e Logan et al, 2012, que também encontraram em seus estudos perfis de restrição diferentes que apresentavam perfis de sensibilidade iguais ou ainda perfis de restrição idênticos com variação no perfil de sensibilidade.

Este estudo ainda apresentou um resultado diferente do encontrado na literatura demonstrado pelos dados obtidos dos isolados do paciente 3, onde o perfil de restrição D1 apresentou perfil de sensibilidade diferente dos perfis restrição D, D2 e D3, porém, todos apresentaram a produção da enzima RmtG. A diferença entre os perfis de restrição detectadas nos isolados do paciente 3 (D, D1, D2 e D3) também foram detectadas nos isolados dos pacientes 1, 2, 5, 8, 10 e 11. Segundo Struelens et al, 2001 essas pequenas diferenças podem ocorrer durante o curso da infecção, e se deve as mutações ou re-arranjos genéticos maiores (inserção ou deleção de elementos genéticos móveis, plasmídeos, etc), variando conforme a plasticidade da espécie bacteriana. O ambiente e o número de replicações ao longo do tempo também são fatores que influenciam essas mudanças.

Dois pacientes do presente estudo apresentaram um mesmo perfil de restrição com perfil de resistência diferentes, indicando transmissão cruzada, em concordância com Nazik et al, 2007, que detectou pacientes apresentando isolados com mesmo perfil de restrição e perfil de resistência diferentes, e também Silbert et al 2001 onde os resultados obtidos sugerem a transmissão cruzada entre os pacientes.

Ao comparar o presente estudo com outros trabalhos já realizados é possível perceber que *P. aeruginosa* é uma bactéria bastante mutável em suas características genotípicas assim como é bastante mutável seu perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos, indicando a necessidade de constante acompanhamento do tratamento dos pacientes portadores de fibrose cística buscando sempre novos meios de combater as infecções causadas por essa bactéria.

## CONCLUSÕES

- O resultados obtidos da análise genotípica demonstraram a diversidade genética de *P. aeruginosa* e a persistência de um mesmo clone ao longo do tempo. Também indicaram que houve transmissão cruzada ou aquisição de fonte comum em apenas dois pacientes.
- *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria que possui perfil de sensibilidade mutável, o qual não está relacionado intimamente com seu perfil genético.
- As análises fenotípicas e genotípicas para enzimas metalo-beta-lactamases revelaram que *P. aeruginosa* podem apresentar resultados falso positivo, pois podem expressarem mais de um mecanismo de resistência ao mesmo tempo.
- As análises fenotípicas e genotípicas para a enzima metilases 16S rRNA detectaram uma nova enzima, RmtG, que foi descrita recentemente em *Klebsiella pneumoniae* isoladas no Estado de São Paulo. É a primeira vez que a enzima metilase 16S rRNA é detectada e descrita em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de paciente com fibrose cística.
- A importância de se conhecer o perfil genotípico e o perfil de sensibilidade de *P. aeruginosa*, permite que o tratamento por antibioticoterapia seja adequado a nova realidade de bactérias que desenvolvem mecanismos de resistência capazes de inibir a ação dos antibióticos atualmente utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM – Associação Brasileira de Assistência a Mucoviscidose –  
<http://www.abram.org.br>

Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais em 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade doença. *J Pediatr.* 2004, 80 (5): 371-379.

Ambler, RP. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 1980, 289:321-331.

Anwar H, Strap JL, Chen K, Costerton JW. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(6):1208-1214.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Shiburokawa H, Yagi T, Fujiwara H et al. Convenient Test for Screening Metallo-b-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):40-43.

Bassetti, PM, Righi E, Viscoli C. *Pseudomonas aeruginosa* seious infections: mono orcombination antimicrobial therapy? *Curr Med Chem.* 15:517-22; 2008.

Brzezinski LXC, Riedi CA, Kussek P, Souza HHM, Rosário N. Nebulizadores: Fonte de contaminação bacteriana em pacientes com fibrose cística? *J Bras Pneumol.* 2011;37(3): 341-347.

Bueno MFC, Francisco GR, O'Hara JA, Garcia DO, Doi Y. Co-production of 16S Ribossomal RNA Methyltransferase RmtD and RmtG with KPC-2 and CTX-M-group ESBL in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 2013; 57(5):2397-2400.

Bush, K, Jacoby, GA, Medeiros, AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39:1211-1233.

Carmeli, Y, Eichelberger, K, Soja, D, Dakos, J, Venkataraman, L, Degirolami, P, Samore, M. Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 595-597, 1998.

CCFF – Canadian Cystic Fibrosis Foundation – <http://www.cysticfibrosis.ca>.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention – <http://www.cdc.gov/pulsenet>

Celenza, G, Pellegrini, C, Caccamo, M, Segatore, B, Amicosante, G, Perilli, M. Spread of *bla*CTX-M-type and *bla*PER-2 b-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 57:975-978, 2006.

Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N et al. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 1996; 348(9028):639-642.

Chernishev, ACA. Diversidade genética e fatores de virulência de *Stenotrophomonas maltophilia*, complexo *Burkholderia cepacia* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* isolados do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística. [dissertação]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Eight edition, M07- A08. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twent-First Informational Supplement, M100- S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2011.

Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 1999 annual data report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation . 2000.

Davis PB. Cystic fibrosis from bench to bedside. N Engl J Med. 1991; 325: 757. In: Robbins S, Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia Estrutural e Funcional, Philadelphia. 2000; p. 428-432.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 1998; 280(5361):295-298.

Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob.Agents Chemother.* 51 (3):852-856, 2007a.

Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob.Agents Chemother.* 51 (9):3388-3390, 2007b.

Doi Y, Arakawa, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 45:88-94, 2007c.

Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(12):3724-32.

Essack SY, Hall LM, Pillay DG, McFadyen ML, Livermore DM. Complexity and diversity of *klebsiella pneumonia* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45(1):88-95.

Farrell PM, Shen G, Splaingard M, Colby CE, Laxova A, Kosorok MR et al. Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1997; 100(5):E2.

Fothergill JL, White J, Foweraker JE, Walshaw MJ, Ledson MJ, Mahenthiralingam E, Winstanley Craig. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* genomic instability on the application of typing methods for chronic cystic fibrosis infections. J. Clin. Microbiol. 2010, 48(6): 2053-2059.

Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. J Antimicrob Chemother. 2005, 55:921-927.

Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1997; 23(5):330-335.

Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America and Latin America. Antimicrob. Agents Chemother. 52:1843-1845, 2008.

Gales, AC, Torres, PL, Vilarinho, DS, Melo, RS, Silva, CF, Cereda, RF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. Braz J Infect Dis. Aug;8(4):267-71, 2004.

Galimand, M, Courvalin, P, Lambert, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob Agents Chemother. 47:2565-2571, 2003.

Garcia AD, Ibarra A, Rodrigues FC, Casal, M. Sensibilidad a antimicrobianos de los aislamientos bacterianos de pacientes con fibrosis quística. Rev Esp Quimioterap. 2004; 17(4):332-335.

Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol. 1997, 35: 2977-2980.

Gillespie S.H., Diagnóstico de Microbiología. 2006. Ed. Premier. Bacilos Gram negativos; p 99-110.

Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60(3):539-574.

Greenberg, D; Yagupsky P. Peled N, Goldbart A, Porat N, Tal A. Lack of evidence of transmission of *Pseudomonas aeruginosa* among cystic fibrosis patients attending health camps at the Dead Sea, Israel. *Isr.Med.Assoc.J.* 6 (9):531-534, 2004.

Grothues D, Koopmann U, von Der HH, Tummler B. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol* 1988; 26(10):1973-1977.

Hancock, RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*, v.27, n.1, p.93-99,1998.

Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001; 183(18):5395-5401.

Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr* 1993; 122(6):854-860.

Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JR. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; Jan 27 (1):73-7.

Jiaug C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Mc Cray Jr PB, Miller SS. Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science.* 1993; 262: 424.

Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN et al. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. Lancet 2001; 358(9281):557-558.

Kelly NM, FitzGerald MX, Tempany E, O'Boyle C, Falkiner FR, Keane CT. Does pseudomonas cross-infection occur between cystic-fibrosis patients. Lancet 1982; 2(8300):688-690.

Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA, Rainey PB, Bell SC. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol, 2011; 49(1): 263-268.

Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. Lancet. 1993; 341: 1065. In: Robbins S, Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia Estrutural e Funcional, Philadelphia, 2000; p. 428-32.

Kosorok MR, Jalaluddin M, Farrell PM, Shen G, Colby CE, Laxova A et al. Comprehensive analysis of risk factors for acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1998; 26(2):81-88.

Lincopan, N.; Mcculloch, J A, Reinert, C, Cassettari, V C; Gales, A C; Mamizuka, E M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *klebsiella pneumoniae* from a patient in Brasil. J Clin Microbiol. Jan; 43(1): 516-519, 2005.

Lincopan, N, Neves, P, Mamizuka E, Levy, CE. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- $\beta$ -lactamase and 16S rRNA methylase in pediatric patients with underlying hematological malignancy. In J Infect Dis 2009 (in press)

Livermore, DM & Woodford, N. The beta-lactamase Threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol.2006 14:413-420.

Logan C, Habington A, Lennon G, Grogan J, Byrne M, O'Leary J, O'Sullivan N. Genetic relatedness of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among a paediatric



cystic fibrosis patient cohort in Ireland. *Journal of Medical Microbiology*. 2012, 61: 64-70.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 194-22.

Mahadeva R, Webb K, Westerbeek RC, Carroll NR, Dodd ME, Bilton D et al. Clinical outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis: cross sectional study. *BMJ* 1998; 316(7147):1771-1775.

Magalhães M, Britto MCA, Bezerra PGM, Veras A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórios de fibrocísticos do Recife. *J Bras Patol Med Lab* 2004, 40(4):223-227.

Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Eletroforese em Campo Pulsante em Bacteriologia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 64(2):155-161, 2005.

Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycosides action and resistance. *Chem. Rev*. 105:477-498, 2005. In: Doi Y, Arakawa, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis*. 45:88-94, 2007.

Medeiros, AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. Jan, 24 Suppl:S19-45, 1997.

<http://www.medicina.ufmg.br>

Murray PR; Rosenthal, KS, Pfaüer, MA. *Microbiología Médica*. 5ª Ed. Editora Elsevier; 2006a. Sección IV: Bacteriología – 19 Mecanismos de la patogenia bacteriana; p 193 – 202.

Murray PR; Rosenthal, KS, Pfaüer, MA. *Microbiología Médica*. 5ª Ed. Editora Elsevier; 2006b. Sección IV: Bacteriología – 20 Antibióticos; p 203 - 212.

Nazik H, Öngen B, Erturan Z, Şalcioglu M. Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. J. Infect. Dis. 2007, 60: 82-86.

Nixon PA, Orenstein DM, Kelsey SF. Habitual physical activity in children and adolescents with cystic fibrosis. Med Sci Sports Exerc 2001; 33(1):30-35.

O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. Novel 16S Ribosomal RNA Methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* Associated with War-related trauma. Antimicrob. Agents Chemother. 2013 Mar 11.

<http://opediatra.com.br>

O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 1998; 30(2):295-304.

Paixão VA, Barros TF, Mota CMC, Moreira TF, Santana MA, Reis JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. Braz J Infect Dis. 2010;14(4): 406-409.

Pappas, G, Saplaoura, K, Falagas, ME. Current treatment of pseudomonal infections in the elderly. Drugs Aging 26:363-379, 2009.

Pedersen SS, Jensen T, Pressler T, Hoiby N, Rosendal K. Does centralized treatment of cystic fibrosis increase the risk of *Pseudomonas aeruginosa* infection? Acta Paediatr Scand 1986a; 75(5):840-845.

Pedersen SS, Koch C, Hoiby N, Rosendal K. An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. J Antimicrob Chemother 1986b; 17(4):505-516.

Picão, RC. Estudo das beta-lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas*

*aeruginosa* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 2009.

Picão, RC, Poirel, L, Gales, AC, Nordman, P. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 53:2225-2226, 2009.

Poirel, L.;Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; Nordmann, P. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother., Mar., p.622-632, 2000.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn. Microbiol. Infect Dis. 2011; 70 (1):119-23.

Raskin S, Phillips JA 3rd, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. Am J Med Genet.1993;46(6):665-9.

Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med. 1996; 335: 179-88.

Reis FSJ, Camargos PAM, Rocha SF. Survival Analysis for cystic fibrosis in Minas Gerais State, Brazil. J Trop Pediatr. 1998; 44: 329-331.

Rossi F & Andreazzi DB. Resistência bacteriana aplicada a microbiologia diagnóstica. Ed. Atheneu. 2004, 182p.

Sader, H S; Gales, A C; Pfaller, M A; Mendes, R E; Zoccoli, C; Barth, A, Jones, R N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from the years of the SENTRY Antimicrobial surveillance ProGram. Braz J Infect Dis. 2001; 5(4): 200-214.

Saiman L, Cacalano G, Gruenert D, Prince A. Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect Immun* 1992; 60(7): 2808-2814.

Santana MA, Matos E, Fontoura MS, Franco R, Barreto D, Lemos ACM. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infections diseases*. 2003; 7(1): 69-72.

Scott FW and Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J.Med.Microbiol.* 2004, 53 (Pt 7):609-615.

Silbert S. Avaliação do perfil de sensibilidade e antimicrobianos e tipagem molecular de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes portadores de fibrose cística [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1999.

Silbert S, Barth AL, and Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. *J.Clin.Microbiol.* 39 (11):3976-3981, 2001.

Silva, MTN. Prevalência de beta-lactamases de amplo espectro e metilases rRNA 16 S em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes recuperados em diferentes hospitais de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2009.

Silva Filho LV, Levi JE, Bento CN, Rodrigues JC, da Silva Ramos SR. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. *J Med Microbiol* 2001; 50(3):261-267.

Silva Filho LVF, da Silva Ramos SR. Pediatric CF care and *Pseudomonas aeruginosa* colonisation. *Br.Med.J.* 1999.

Silva Filho LVF, Tateno AF, Velloso LF, Levi JE, Fernandes S, Bento CNO, Rodrigues JC, Ramos SRTS. Identification of *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* Complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatric Pneumology*; 2004, 37: 537-547.

Smith DL, Smith EG, Gumery LB, Stableforth DE, Dalla Costa LM, Pitt TL. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and the use of strain genotyping. J Infect 1993; 26(3):325-331.

Souza HAPHM, Nogueira KS, Matos AP, Vieira RP, Riedi CA, Rosário NA, Telles FQ, Costa LMD. Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening, with emphasis on *Staphylococcus aureus*. Jornal de pediatria. 2006;82(5): 377-382.

Speert DP, Davidson AG, Wong LT, Paranchych W. Communicability of *Pseudomonas* infections in patients with cystic fibrosis. J Pediatr 1989; 114(6):1068-1069.

Spencer D. Clinical outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis. Cross infection with *Pseudomonas aeruginosa* is unusual. BMJ 1999; 318(7175):58.

Spencker FB, Haupt S, Claros MC, Walter S, Lietz T, Schille R et al. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect 2000; 6(11):600-607.

Spencker FB, Staber L, Lietz T, Schille R, Rodloff AC. Development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from patients with cystic fibrosis at different times. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 370-379.

Struelens MJ, Ryck R, Deplano A. Analysis of Microbial Genomic Macrorestriction Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing. In: Dijkshoorn L, Towner KJ, Struelens M. New Approaches For The Generation And Analysis Of Microbial Typing Data. The Netherlands: Elsevier, 2001. P. 159-173.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Perseing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995, 33: 2233-2239.

Tubbs D, Lenney W, Alcock P, Campbell CA, Gray J, Pantin C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: cross-infection and the need for segregation. *Respir Med* 2001; 95(2):147-152.

Tsui LC. Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. *Human Genet.* 1990; 85 (4): 391-92.

Valerius NH, Koch C, Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 1991; 338(8769):725-726.

Vazquez C, Municio M, Corera M, Gaztelurrutia L, Sojo A, Vitoria JC. Early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 1993; 82(3):308-309.

Vosahlikova S, Drevinek P, Cinek O, Pohunek P, Maixnerova M, Urbaskova P, Reidjen TJK, Dijkshoorn L, Nemec A. High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic. *Research in Microbiology*, 2007; 158:324-329.

Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibara N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m<sup>1</sup>A1408 methyltransferase NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4401-4409, 2007.

Wachino J, Arakawa Y. Exogenomally acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside – resistance pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug. Resist. Updat.* 15(3): 133-148, 2012.

Walsh, TR, Toleman MA, Poirel L & Nordemann P. Metallo-Beta-Lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol.* 2005, 18:306-325.

Waters V, Zlosnik JEA, Yau YCW, Speert DP, Aaron SD, Guttman DS. Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012.

Wolter DJ, Acquazzino D, Goering RV, Sammut P, Khalaf N, Hanson ND. Emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a patient with cystic fibrosis in the absence of carbapenem therapy. Clin Infect Dis. 2008; 46(12):137-141.

Wood RE, Boat TF, Doershuk CF. Cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1976; 113(6):833-878.

Woods DE, Bass JA, Johanson WG, Jr., Straus DC. Role of adherence in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. Infect Immun 1980; 30(3):694-699.

Yamane, K, Wachin, J, Suzuki, S, Shibata, N, Kato, H, Shibayama, Kkimura, K, Kai, K, Ishi Kawa, S, Ozawa, Y, Konda, T, Arakawa, Y. 16S rRNA Methylase-producing, Gram-negative Pathogens, Japan. Emerging Infectious Diseases. 13:642-646, 2007.

Yamane, K, Rossi F, Barberino MG, Adams-Haduch JM, Doi Y, Paterson DL. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumonia* in Brasil. J Antimicrob Chemother. Mar; 61(3):746-7, 2008.

Yokoyama K, Doi Y, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet. 362:1888-1893, 2003.

Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu Rev Genet 1995; 29:777-807.

**ANEXO**



ANEXO 1 – DOCUMENTOS DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ E PELA COORDENADORIA DE COONTROLE DE DOENÇAS



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL  
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2879 e-mail: cepial@ial.sp.gov.br



São Paulo, 20 de outubro de 2010

Protocolo: 078/2010

Projeto de Pesquisa: "Diversidade genética de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística"

Pesquisador Responsável: Dorôti Oliveira Garcia

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL











ANEXO 2. Resultados dos testes de disco-difusão, epsilométrico, PCR e PFGE obtidos de 129 isolados de *P. aeruginosa*

Paciente	Idade	Amostra	Data da coleta	IMP	MEM	AK	CN	NET	TOB	CAZ	FEP	ATM	TIM	TZP	CIP	LEV	PB	CIM PB (µg/ml)	Fenótipo p/ MBL	Fenótipo p/ metilase 16S rRNA	PCR MBL SPM/IMP/VIM/NDM	PCR GES	PCR CTX-M/ TEM	PCR Kpc	PCR RmtD	PCR RmtG	Perfil PFGE	
11	0,9	315(2)	01.03.04	16 S	28 S	30 S	20 S	22 S	26 S	28 S	30 S	29 S	22 S	26 S	35 S	25 S	16 S											S
11	0,9	315(3)	01.03.04	15 I	23 S	25 S	17 S	20 S	22 S	25 S	27 S	24 S	20 S	22 S	31 S	22 S	15 S											S
11	3	524	08.01.07	29 S	25 S	18 S	13 I	14 I	19 S	21 S	20 S	20 I	18 S	24 S	32 S	25 S	14 S											T
11	4	709	18.06.07	32 S	29 S	19 S	15 S	16 S	19 S	25 S	25 S	21 I	21 S	25 S	29 S	26 S	15 S											U
11	4	789	29.08.07	13 R	15 I	22 S	16 S	18 S	21 S	24 S	25 S	22 S	20 S	26 S	30 S	25 S	15 S		-									U1
11	6	809(1)	03.06.09	34 S	26 S	24 S	20 S	21 S	20 S	21 S	18 S	26 S	26 S	26 S	19 I	16 I	16 S											U
11	6	809(2)	03.06.09	31 S	31 S	19 S	14 I	15 S	19 S	24 S	19 S	20 I	21 S	25 S	28 S	22 S	15 S											U
11	6	818(1)	05.08.09	33 S	28 S	19 S	16 S	16 S	20 S	31 S	22 S	25 S	24 S	25 S	24 S	20 S	15 S											U
11	6	818(2)	05.08.09	30 S	29 S	24 S	24 S	22 S	20 S	24 S	22 S	27 S	31 S	25 S	21 S	20 S	15 S											U
11	6	818(3)	05.08.09	32 S	33 S	20 S	17 S	18 S	22 S	27 S	25 S	19 I	20 S	23 S	28 S	23 S	15 S											U

R: Resistente; S: sensível; I: Intermediário, NR: Não Realizado.

ANEXO 3: Perfil de Resistência e Perfil de Restrição de PFGE de 129 isolados de *P. aeruginosa* de três períodos distintos frente a 14 antimicrobianos testados pelo método disco difusão.

AMOSTRAS	PACIENTE	PFGE	PERFIL DE RESISTÊNCIA	
707(3), 746(1), 253(3), 789	4, 4, 5, 11	G, F, I1, U1	Imp	
847(1), 855(1), 35(1)	5, 5, 8	I1, I, L	AK	
64(1)	3	IE	Fep	
491(2), 194(2), 245(1), 171(1)	1, 7, 7, 8	A1, L, L, M2	Atm	
491(1)	1	A	Tic	
85	9	N	Cip	
437(2), 769(3), 308(2), 787, 240	2, 5, 6, 6, 8	C, I1, J, J, M	Lev	
31(2), 78(2), 407(3), 197(2), 167(1)	5, 1, 1, 5, 3	I1, B, A2, I1, E	Gen	
485, 746(2)	4	G, G	Imp	Mem
769(1)	5	I1	Imp	AK
676	9	N	Imp	Atm
655(1)	8	M	Lev	AK
655(2)	8	M	Gen	AK
197(1)	5	I1	Gen	Fep
392	10	P	Caz	Atm
254(1)	4	G	Ppt	Fep
254(2), 310(1)	4, 10	G, Q	Ppt	Tic



## ANEXO 3 CONTINUAÇÃO

AMOSTRAS	PACIENTE	PFGE	PERFIL DE RESISTÊNCIA																	
135, 38(1), 38(3), 134(1), 308(1), 484(1), 35(2), 192, 353, 847(2)	2, 6, 6, 6, 6, 6, 8, 9, 9, 5	C1, J, J, J, J, J, M, N, N, I1	Lev	Cip																
707(4)	4	G	Imp	Mem	Ppt															
484(2),618	6,9	J, N	Imp	Lev	Cip															
31(1), 99, 253(1)	5	I1, I1, I1	Gen	AK	Net															
507	4	G	Imp	Mem	Gen	Ppt														
707(1)	4	F	Imp	Mem	Lev	Ppt														
697	6	J	Imp	Mem	Lev	Pb														
620(1)	6	J	Cip	Mem	Lev	Atm														
484(3)	6	J	Pb	Cip	Lev	Atm														
310(2)	10	Q	Caz	Tic	Ppt	Atm														
608	9	N	Imp	Mem	Gen	Lev	Cip													
653(2)	3	D1	AK	Net	Gen	Tob	Cip													
614(1)	4	G	AK	Net	Gen	Ppt	Lev	Tic												
302(2), 470, 538, 653(1), 783(1),783(2), 783(3)	3	D, D, D, D, D2, D3, D2	AK	Net	Gen	Tob	Lev	Cip												
620(2)	6	J	Imp	Net	Gen	AK	Lev	Cip												
420(2)	2	C1	AK	Net	Gen	Atm	Caz	Cip	Fep											
487	9	N	Imp	Net	Gen	Ppt	Lev	AK	Cip	Tob	Caz	Tic	Mem							
19	9	N	Imp	Net	Gen	Ppt	Lev	AK	Cip	Tob	Caz	Tic	Atm	Fep						

IMP: Imipenem, MER: Meropenem, AK: Amicacina, GEN: Gentamicina, NET: Netilmicina, TOB: Tobramicina, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: aztreonam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulânico, PPZ: Piperacilina/Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina e PB: Polimixina B.

