

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO
LABORATÓRIO DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL EM TÉCNICAS LABORATORIAIS
DE SAÚDE

Ingrid de Arruda Lucena dos Santos

RESISTÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* ASSOCIADA AO CONTEXTO DE
INFECÇÃO HOSPITALAR

Rio de Janeiro

2013

Ingrid de Arruda Lucena dos Santos

RESISTÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* ASSOCIADA AO CONTEXTO DE
INFECÇÃO HOSPITALAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
como requisito parcial para aprovação no
curso técnico de nível médio em saúde com
habilitação em Análises Clínicas.

Orientador: Joseli Maria da Rocha Nogueira

Co-orientador: Flávia Coelho Ribeiro
Mendonça

Rio de Janeiro

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Ingrid de Arruda Lucena dos Santos

RESISTÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* ASSOCIADA AO CONTEXTO DE
INFECÇÃO HOSPITALAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
como requisito parcial para aprovação no
curso técnico de nível médio em saúde com
habilitação em Análises Clínicas.

Aprovado em: 06/12/2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira – ENSP /FIOCRUZ

Dra. Flávia Coelho Ribeiro Mendonça – EPSJV/FIOCRUZ

Dra. Fernanda Nunes Santos – ENSP/FIOCRUZ

Dedico este trabalho
aos meus pais, Luiz Alberto e Patrícia;
ao meu irmão, Victor Hugo.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço pela permissão de ter estudado na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, que fornece incomensuráveis oportunidades de aprendizado. Agradeço por ter feito parte de uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz, onde germinam a inovação e a materialização do conhecimento.

Agradeço à minha família, pelo apoio e incentivo incansáveis; pelos exemplos de força de vontade e dedicação; pelos sábios conselhos e pelo fornecimento de um ambiente em que sempre posso encontrar amor e conforto. Agradeço aos meus pais pela riquíssima participação na formação do meu caráter, e ao meu irmão, que muito admiro, por ser um grande amigo.

Agradeço às doutoras Joseli Nogueira e Flávia Mendonça, primeiramente, por aceitarem meu pedido de orientação, e pela paciência, disponibilidade e sugestões que sempre tornaram o trabalho mais claro e preciso.

Agradeço aos meus amigos, principalmente, àqueles da Escola Politécnica, com os quais convivi a maior parte desse período, pelo suporte e pelas grandes lições, que influenciaram meu crescimento pessoal.

Agradeço pela estada, durante esses três anos, em uma escola que me proporcionou amplas reflexões sobre ciência, saúde e sociedade. Agradeço a todos os professores da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio por me ensinarem mais do que conteúdos formais, por me mostrarem a paixão e a crença no trabalho que exercem e por alimentarem meu desejo de saber mais.

Agradeço ao projeto pedagógico dessa Escola e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que, ao fornecerem, respectivamente, a proposta e o incentivo à realização do presente trabalho, tornaram viável a concretização de uma singela contribuição à saúde pública.

Por fim, agradeço a todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a construção deste trabalho.

*“Nem tudo que se enfrenta
pode ser modificado,
mas nada pode ser modificado
até que seja enfrentado.”*
(Albert Einstein)

RESUMO

Aborda o desenvolvimento da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos, bem como sua relevância em infecções hospitalares. Com esse fim, realiza uma revisão bibliográfica de artigos científicos, dissertações, teses, publicações de órgãos de saúde e obras da literatura específica acerca do tema. Relata a preocupação atual com a ocorrência de infecções hospitalares por micro-organismos resistentes e justifica a importância de *P. aeruginosa* nesse contexto. Apresenta algumas características de *P. aeruginosa*, quanto a patogênese e epidemiologia. Compreende o processo de desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos. Descreve os mecanismos de resistência intrínseca e adquirida de *P. aeruginosa* e seu perfil antimicrobiano. Apresenta as principais fontes de infecção por esse micro-organismo no ambiente hospitalar, como produtos, instrumentos e equipamentos médicos. Fornece orientações para a identificação laboratorial de isolados de *P. aeruginosa*. Conclui que minimizar os riscos da aquisição de infecções hospitalares por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes depende tanto das práticas de controle de infecções no ambiente hospitalar quanto do uso criterioso dos antimicrobianos.

Palavras-Chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência. Infecção Hospitalar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1	Quadro dos mecanismos de resistência e seus efeitos em <i>P. aeruginosa</i>	41
Ilustração 2	Fluxograma das etapas da identificação laboratorial de <i>P. aeruginosa</i> segundo a ANVISA (2013b, 2004).....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coloração de Gram de <i>P. aeruginosa</i> com células dispostas de forma individual e em pares.....	22
Figura 2	Estrutura da parede celular de um micro-organismo Gram-negativo.....	23
Figura 3	Diversidade dos sítios de infecção por <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 4	Estrutura e mecanismos patogênicos de <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 5	Coloração de Gram de <i>P. aeruginosa</i> rodeada de material capsular mucoide em um paciente fibrocístico.....	27
Figura 6	Fases da patogênese da infecção por <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 7	Mecanismos de transposição.....	32
Figura 8	Representação de um plasmídio de resistência (plasmídio R).....	33
Figura 9	Captura e expressão gênica por integrons.....	34
Figura 10	Alvos bacterianos de alguns antibióticos.....	36
Figura 11	Cefalosporinas de primeira e segunda gerações.....	37
Figura 12	Inibidores de β -lactamases.....	38
Figura 13	Fórmulas estruturais das tetraciclinas.....	38
Figura 14	Fórmula estrutural do cloranfenicol.....	38
Figura 15	Cefalosporinas de terceira e quarta gerações.....	40
Figura 16	Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos.....	42
Figura 17	Estrutura das penicilinas e produtos de sua hidrólise enzimática.....	43
Figura 18	Mecanismo de hidrólise dos β -lactâmicos por ESBLs.....	44
Figura 19	Local de ação das enzimas β -lactamases.....	44

Figura 20	Fórmulas estruturais de penicilinas com ação sobre <i>P. aeruginosa</i>	46
Figura 21	Fórmula estrutural do aztreonam.....	47
Figura 22	Fórmula estrutural do imipenem.....	48
Figura 23	Fórmula estrutural da estreptomicina.....	54
Figura 24	Estrutura de um sistema de efluxo tipo RND em <i>P. aeruginosa</i>	59
Figura 25	Fórmula estrutural do trimetoprim.....	60
Figura 26	Sistema de repressão do operon <i>mexAB-oprM</i> em <i>P. aeruginosa</i>	60
Figura 27	Núcleo cefêmico.....	61
Figura 28	Exemplos de diferentes mecanismos de resistência associados a porinas.....	63
Figura 29	Fórmulas estruturais de quinolonas e fluoroquinolonas.....	66
Figura 30	Mecanismo de ação dos aminoglicosídeos.....	68
Figura 31	Aminoglicosídeos e enzimas modificadoras.....	69
Figura 32	Fórmula estrutural da espectinomicina.....	70
Figura 33	Estrutura das polimixinas.....	71
Figura 34	Cultura de <i>P. aeruginosa</i> em ágar Mueller-Hinton.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Betalactamases descritas em <i>P. aeruginosa</i>	48
Tabela 2	Medidas de Prevenção das Infecções Nosocomiais.....	81

LISTA DE SIGLAS

ABC	ATP-Binding Cassettes (cassetes de ligação a ATP)
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida)
AIM	Australian Imipenemase (imipenemase australiana)
AmpC	Cefalosporinase cromossômica da classe C
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARI	<i>Acinetobacter</i> Resistant to Imipenem (<i>Acinetobacter</i> resistente ao imipenem)
ATP	Adenosina Trifosfato
BEL	Belgium Extended β -lactamase (β -lactamase estendida da Bélgica)
CARB	Carbenicilinase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTX-M	Cefotaximase
DMT	Drug Metabolite Transporter (transportador de metabólitos de drogas)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
ESBLs	β -lactamases de espectro ampliado
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (ácido etilendiamino tetra-acético)
FIM	Florence Imipenemase (Imipenemase de Florença)
GES	Guiana Extended Spectrum (espectro estendido da Guiana)
GIM	German Imipenemase (imipenemase alemã)
IBC	Integron-Borne β -lactamase (β -lactamase carregada por integron)

IMP	Imipenemase
ITU	Infecção do Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion (expulsão multidroga e de compostos tóxicos)
MFS	Major Facilitator Superfamily (superfamília facilitadora principal)
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA	Oxacilinase
PBPs	Penicillin-Binding Proteins (proteínas de ligação à penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PER	<i>Pseudomonas</i> Extended Resistance (resistência estendida de <i>Pseudomonas</i>)
PSE	<i>Pseudomonas</i> Specific Enzyme (enzima específica de <i>Pseudomonas</i>)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)
RmtA	Ribosomal methyltransferase A (metiltransferase ribossomal A)
RNA	Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
RND	Resistance-Nodulation-Division (divisão de resistência a nodulação)
SHV	Sulphydryl Variable (variável sulfidril)
SIM	Seoul Imipenemase (imipenemase de Seul)
SMR	Small Multidrug Resistance (resistência pequena a múltiplas drogas)

SPM	São Paulo Metallo- β -lactamase
TEM	Temoniera
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEB	Vietnamese Extended-spectrum β -lactamase (β -lactamase vietnamita de espectro estendido)
VIM	Verona Imipenemase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 JUSTIFICATIVA.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.2.1 Objetivo geral.....	20
1.2.2 Objetivos específicos.....	21
1.3 METODOLOGIA.....	21
2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>P. aeruginosa</i>.....	22
2.1 EPIDEMIOLOGIA DE <i>P. aeruginosa</i>	24
2.2 PATOGÊNESE DE <i>P. aeruginosa</i>	26
2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	29
3 PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM <i>P. aeruginosa</i>.....	36
3.1 ENZIMAS β -LACTAMASES.....	41
3.1.1 Classe A das β -lactamases.....	46
3.1.2 Cefalosporinas (AmpC).....	51
3.1.3 Classe D das β -lactamases.....	53
3.1.4 Metallo- β -lactamases.....	54
3.2 BOMBAS DE EFLUXO.....	57
3.3 PERDA DE PORINAS.....	62
3.4 OUTROS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	65
3.4.1 Resistência a fluoroquinolonas.....	65

3.4.2 Resistência a aminoglicosídeos.....	67
3.4.3 Resistência a polimixinas.....	70
4 INFECÇÃO HOSPITALAR POR <i>P. aeruginosa</i>.....	72
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i>	78
5 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Há relatos de infecções hospitalares desde o surgimento dos hospitais, no século XIX (MACIEL; CÂNDIDO, 2010). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2001, p. 7), uma infecção hospitalar é "qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares". No Brasil, o controle das infecções relacionadas à assistência à saúde foi oficializado em 1983, através da Portaria 196 do Ministério da Saúde, que tornou obrigatórias as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar em todos os hospitais do país (SANTOS, 2006). Embora muito se tenha avançado no que diz respeito às práticas de controle de infecções hospitalares, elas continuam ocorrendo e, o que é mais preocupante, com micro-organismos resistentes a antibióticos (LACERDA; EGRY, 1997). A falha na adoção de medidas básicas de controle de infecção hospitalar por parte dos profissionais de saúde, como a lavagem das mãos, é um dos fatores que colabora para que, ainda no século XXI, a infecção hospitalar provoque altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (SANTOS, 2004). Além do impacto clínico, estima-se que o custo do tratamento desses pacientes seja três vezes maior do que o daqueles sem as infecções (MOURA, 2007).

As infecções hospitalares podem ser transmitidas de um profissional de saúde colonizado a um paciente suscetível através de um contato físico direto, como durante um banho ou o cuidado com um paciente, ou de um objeto colonizado, como agulhas ou luvas, a um paciente suscetível (CHERRY et al., 2012). Em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), os pacientes estão sujeitos a um risco de 5 a 10 vezes maior de contrair uma infecção do que os das demais unidades hospitalares (MOURA, 2007) e, quanto maior o período de internação, maiores são as chances de contaminação dos pacientes (ANDRADE; ANGERAMI, 1999).

As práticas deficientes de controle de infecções ocasionam uma maior difusão de cepas bacterianas resistentes nas instituições de saúde (OMS, 2001). Hospitais, especialmente, os que possuem UTI, albergam grande quantidade de bactérias resistentes, pois o tratamento dos pacientes com antibióticos aumenta a pressão do meio capaz de selecionar indivíduos aptos à sobrevivência nessa exposição, isto é, bactérias que adquiriram mecanismos de resistência (SANTOS, 2004). Assim, devido ao intenso e inadequado uso de drogas, muitas

delas com amplos espectros de ação, é cada vez maior o número de agentes patogênicos resistentes a diversas drogas (MACIEL; CÂNDIDO, 2010).

Práticas inadequadas de profissionais de saúde (incluindo a precária higienização das mãos), a quantidade de pacientes por enfermagem e a transferência desses entre hospitais são fatores que facilitam a propagação de bactérias multirresistentes em ambientes hospitalares (TORTAS, 2009). Essas cepas resistentes podem ser transmitidas entre a equipe hospitalar e os pacientes em ambas as direções (OMS, 2001). Em UTIs, a transmissão cruzada (entre um paciente e outro) de bactérias multirresistentes é amplificada, devido ao trabalho excessivo e à menor adesão à higienização das mãos (ANVISA, 2007).

Aproximadamente um terço ou metade de todas as infecções hospitalares são preveníveis (AZAMBUJA; PIRES; VAZ, 2004). Em 1992, o Ministério da Saúde estabeleceu que o controle da infecção hospitalar “envolve medidas de vigilância sanitária, tomadas ao nível de cada hospital” (SANTOS, 2006). Contudo, a lavagem das mãos, defendida por Semmelweis no século XIX (FONTANA, 2006), não foi adotada de forma criteriosa e sistemática, conforme se observa na rotina da prática hospitalar (LACERDA; EGRY, 1997). Estima-se que a adesão dos profissionais de saúde à higienização das mãos não seja maior que 60%. Portanto, é possível afirmar que, atualmente, como no tempo de Semmelweis, as mãos são o principal meio de transmissão dos micro-organismos no ambiente hospitalar (ANVISA, 2004b). Sem a descontaminação adequada, o nível de contaminação bacteriana aumenta com o tempo, possibilitando sua transferência a outros pacientes e/ou maior contaminação do ambiente (CHERRY et al., 2012). Embora essa situação possa se dever à ausência de instalações adequadas para a lavagem das mãos, principalmente, em regiões em que os recursos são escassos, a higienização das mãos é inadequada, geralmente, porque não se reconhece sua importância para o controle das infecções, as instituições sanitárias têm carência de pessoal ou os profissionais de saúde são esquecidos. A troca de luvas antes e depois do contato com cada paciente também é frequentemente não realizada (OMS, 2001). A efetiva higienização das mãos associada ao uso de produtos químicos antissépticos, como sabão e álcool 70%, pode reduzir a distribuição de micro-organismos resistentes aos antibióticos (CHERRY et al., 2012).

Livermore (2002) aponta que, em alguns casos, as melhores formas de impedir a disseminação da resistência são o controle de infecção e a eliminação do uso desnecessário de antibióticos de amplo espectro. No ambiente hospitalar, outras estratégias de controle da

resistência bacteriana são a vigilância epidemiológica, o controle do ambiente inanimado, o uso de barreiras (luvas, aventais, máscaras, etc), o rastreamento de pacientes e profissionais colonizados, o isolamento e estudo epidemiológico de pacientes infectados e/ou colonizados e a terapia de descolonização (OLIVEIRA; ALBUQUERQUE; ROCHA, 1998).

Em um contexto mais amplo, uma proposta para prevenir o processo de resistência aos antibióticos é o controle do uso por humanos, exigindo não só prescrições precisas, mas impedindo o fornecimento de antibióticos sem prescrição médica. Além disso, é importante controlar o uso terapêutico e profilático na criação de animais e agricultura (DAVIES; DAVIES, 2010).

Embora a emergência da resistência antimicrobiana em animais de estimação seja muito menos estudada, tem sido mostrado recentemente que ela também deve ser objeto de atenção. A resistência criada pelo uso de antibióticos nesses animais pode, inclusive, ser transferida aos humanos, que estão em íntimo contato com eles. Infecções nosocomiais em cães hospitalizados, por exemplo, têm sido reconhecidas cada vez mais como provocadas por isolados multirresistentes, o que pode refletir o uso intenso de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente, nos animais em UTIs. Mais do que o aumento da resistência em infecções animais, há cada vez mais evidências da transferência de micro-organismos resistentes entre animais de estimação e seus criadores, o que inclui a vigilância do uso de antibióticos na criação doméstica como importante medida para a prevenção do desenvolvimento da resistência (LLOYD, 2007).

Dentre os patógenos resistentes a antimicrobianos que provocam infecções associadas à assistência médica, situam-se *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus* resistente à vancomicina, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. produtoras de β -lactamases de amplo espectro e também membros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a fluoroquinolonas ou carbapenêmicos (HIDRON et al., 2008). Segundo Lister, Wolter e Hanson (2009), *P. aeruginosa* apresenta as maiores taxas de resistência a fluoroquinolonas.

Os bastonetes Gram-negativos são a principal ameaça em UTIs brasileiras, devido às elevadas taxas de resistência aos antibióticos atualmente disponíveis. Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores de glicose são agentes etiológicos de quase todas as infecções adquiridas na UTI, particularmente, as do trato respiratório. Nesse grupo, encontram-se *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, que colonizam coleções de água relacionadas ao

equipamento de ventilação mecânica (ANVISA, 2007). Vários outros reservatórios de *P. aeruginosa* já foram identificados no ambiente hospitalar, tais quais endoscópios, colírios, laringoscópios, soluções de limpeza, medicamentos, corantes, desinfetantes, pias, tubos e duchas de irrigação, panos de chão e vegetais (NOUÉR, 2005).

P. aeruginosa, uma das bactérias de maior relevância clínica e epidemiológica (BRASIL, 2005) e a mais comum bactéria Gram-negativa encontrada em infecções nosocomiais, é um patógeno oportunista humano cada vez mais prevalente (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998). As primeiras observações clínicas sobre essa espécie estavam relacionadas à assistência à saúde. Em 1850, Sédillot associou a secreção verde-azulada das feridas operatórias a um pior prognóstico no pós-operatório (NOUÉR, 2005) e, em 1882, *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez, por Carle Gessard, que a denominou *Bacillus pyocyaneus* (FERRAREZE et al., 2007). A coloração observada em quadros clínicos infecciosos e em cultura de *P. aeruginosa* deve-se à produção de pigmentos hidrossolúveis, como a piocianina, de cor azul, a pioverdina (fluorescente), que confere a cor verde brilhante característica da espécie, e, em menor frequência, a piorrubina (avermelhada) e a piomelanina, de cor marrom ou preta (FERREIRA; LALA, 2010). Enquanto a piocianina é encontrada em mais da metade dos isolados clínicos (FUENTEFRÍA, 2009), os dois últimos pigmentos são produzidos por menos de 2% dos mesmos (MARTINS, 2005).

A hospitalização aumenta a ocorrência de infecções, no caso de pacientes imunodeprimidos, que representam a maioria das infecções causadas por *P. aeruginosa*. Essas infecções ocorrem, especialmente, na pele de queimados, no trato respiratório de pacientes submetidos à ventilação mecânica, no trato gastrointestinal daqueles que receberam quimioterapia e em qualquer sítio dos que foram tratados com antibióticos (NOUÉR, 2005).

1.1 JUSTIFICATIVA

P. aeruginosa é um importante patógeno nosocomial, especialmente para pacientes neutropênicos — isto é, aqueles que apresentam número absoluto de neutrófilos, células do sistema fagocítico, abaixo da contagem considerada normal no sangue periférico (RIBEIRO et al., 2011) — e imunocomprometidos (OLIVEIRA, 2010). Segundo Oliveira (2011, p. 193), esse agente “é a maior causa de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos”.

Em termos de infecção hospitalar, esta bactéria é um dos principais agentes etiológicos em hospitais brasileiros (NEVES et al., 2011): é a primeira causa de pneumonia (FUENTEFRÍA, 2009), segunda de infecções de ferida operatória e do trato urinário e sexta de bacteremias (NOUÉR, 2005).

Outrossim, é o micro-organismo mais frequentemente isolado em infecções em pacientes queimados (COUTO, 2004). De acordo com Black (2002, p.495), “As infecções de queimaduras que normalmente são infecções hospitalares são responsáveis por 80% das mortes em pacientes queimados”, sendo *P. aeruginosa* a principal causa das infecções de queimaduras que ameaçam a vida. *P. aeruginosa* constitui a principal causa de infecções hospitalares entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose. As fontes de maior contaminação pela mesma são aparelhos de respiração, sistemas de hemodiálise, pias e artefatos de limpeza (FERREIRA; LALA, 2010).

Com relação a infecções pela bactéria adquiridas na comunidade, nos últimos anos, pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) têm sido identificados como integrantes do grupo de pacientes de risco (MARTINS, 2005). Já em pacientes com fibrose cística, a infecção crônica por *P. aeruginosa* contribui para o aumento da morbidade e mortalidade (ver Capítulo 4) (NOUÉR, 2005), e, nesses indivíduos, o desenvolvimento da resistência é associado ao longo tratamento com antibióticos, sendo de grande preocupação para os mesmos (DAVIES; DAVIES, 2010).

P. aeruginosa apresenta resistência simultânea a um grande número de antimicrobianos disponíveis, o que representa um alto custo no tratamento dos pacientes infectados (ANVISA, 2007) e aumento da duração da hospitalização e da mortalidade (SPINDLER, 2009). De acordo com a ANVISA (2010), o micro-organismo em questão é considerado pela comunidade científica internacional um patógeno multirresistente. Caso haja associação de diferentes mecanismos de resistência, *P. aeruginosa* pode determinar um fenótipo de resistência a quase todas (ou mesmo todas) as drogas disponíveis (FUENTEFRÍA, 2009). Além dos elevados gastos, tanto para o sistema público de saúde, quanto para o paciente, a resistência bacteriana acarreta a esse uma doença não solucionada, que pode conduzir a óbito (WANNMACHER, 2004).

A ausência de novos antibióticos eficazes contra *P. aeruginosa* multirresistente num futuro próximo justifica a vigilância e o controle das cepas de cada hospital. O conhecimento dos mecanismos de resistência é crucial para que se possa prevenir seu surgimento (TORTAS,

2009). A disseminação de genes para enzimas β -lactamases pode desempenhar um importante papel na propagação da resistência a antibióticos e limitar escolhas futuras de regimes de antibióticos para o tratamento de infecções com risco de vida devido a *P. aeruginosa* produtora de ESBLs (β -lactamases de espectro ampliado) (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003). Além disso, para combater as bactérias Gram-negativas eficientemente, é necessário compreender as bases moleculares dos mecanismos de efluxo envolvidos na limitada concentração intracelular ou periplasmática de muitos antibióticos (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012).

Novos compostos semissintéticos gerados por modificações químicas nas estruturas dos antibióticos têm estendido a vida útil de diversas classes, mas essa abordagem faz pouco mais do que comprar tempo, pois os genes de resistência evoluem em resposta a novas pressões seletivas, e os mecanismos de resistência existem para todas as classes de antibióticos. Aliás, em alguns casos, a modificação química dos antimicrobianos conduziu a uma maior toxicidade (DAVIES; DAVIES, 2010).

Desta forma, a limitação crescente das alternativas terapêuticas frente ao perfil de resistência apresentado por *P. aeruginosa*, o qual é agravado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos e pela insuficiência de esforços para conter ou evitar a contaminação nos hospitais, justifica a motivação para a realização do trabalho, em um momento no qual se torna urgente estruturar parte dos conhecimentos existentes até então, a fim de propiciar uma base teórica para planejamentos que visem a retardar o desenvolvimento da resistência do patógeno associada à infecção hospitalar.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Revisar a bibliografia específica acerca do fenômeno da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos agentes antimicrobianos e sua relevância em infecções hospitalares.

1.2.2 Objetivos específicos

- Descrever os mecanismos de resistências intrínseca e adquirida da bactéria em questão;
- Apresentar as principais fontes de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* no ambiente hospitalar.

1.3 METODOLOGIA

A metodologia do presente trabalho consiste em uma revisão bibliográfica acerca da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* associada ao contexto de infecção hospitalar. Deste modo, serão realizadas pesquisas de publicações científicas em bases de dados, como a Scielo (*Scientific Electronic Library Online*), a BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e a PubMed. Além disso, será realizada a leitura de dissertações e teses, obras da literatura específica e manuais e outras publicações do Ministério da Saúde, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, entre outros.

2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo do gênero *Pseudomonas*, integrante da família *Pseudomonadaceae*, especificamente, do grupo fluorescente (TRABULSI, 2008). *Pseudes* significa “falso”, *monas*, “uma unidade”, e *aeruginosa*, “repleto de óxido de cobre” ou “verde”, em referência ao pigmento sintetizado por essa espécie (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). Trata-se de um bastonete reto — embora possa se apresentar levemente encurvado — que mede de 1 a 5 μm de comprimento e 0,5 a 1 μm de largura (ZAVASCKI, 2003) (ver Figura 1). É Gram-negativo, e sua motilidade ocorre, na maioria das cepas, por um simples flagelo polar, apesar de algumas possuírem dois ou três flagelos (BARON, 1996).

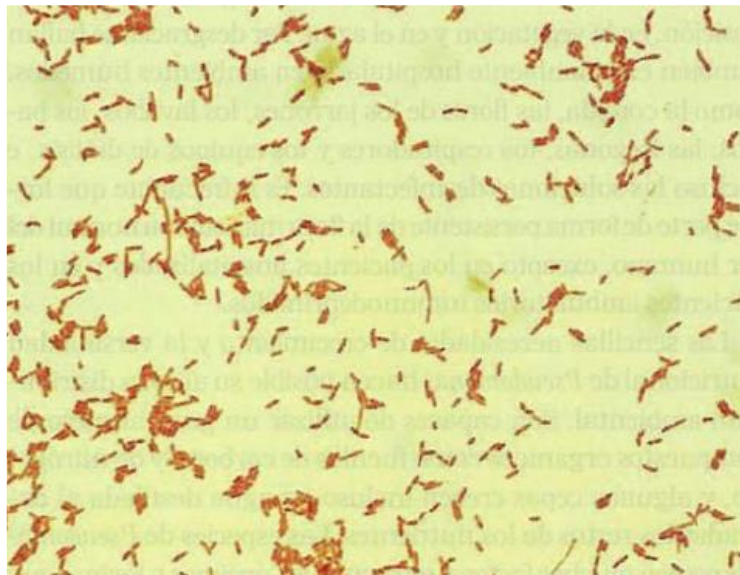


Figura 1 – Coloração de Gram de *P. aeruginosa* com células dispostas de forma individual e em pares.

Fonte: Murray; Parental; Pfaller, 2006, p. 358.

O fato de ser Gram-negativa (apresenta cor avermelhada quando seu esfregaço corado pelo método de Gram é visualizado ao microscópio) significa que possui a camada de peptidoglicano (parede celular) menos espessa que a das bactérias Gram-positivas e ancorada a uma membrana externa, através de lipoproteínas que atravessam o espaço periplasmático. Essa membrana externa é constituída por uma camada interna de fosfolipídeos e uma externa de lipopolissacarídeos e proteínas (ver Figura 2). Este patógeno é não esporulado, visto que

esporos são formados por algumas espécies Gram-positivas, em condições de carência de água ou nutrientes no meio em que se encontram, sendo mais comum em bactérias encontradas no solo (TRABULSI, 2008).

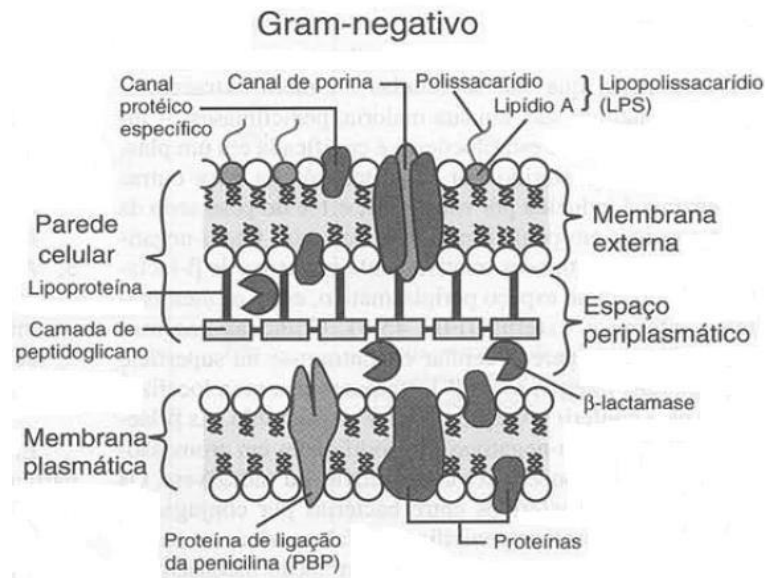


Figura 2 — Estrutura da parede celular de um micro-organismo Gram-negativo

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 893.

O gênero *Pseudomonas* é considerado um dos gêneros bacterianos mais variáveis e ubíquos, cujas espécies podem ser encontradas no solo, sedimentos e água de rios e lagos, plantas, fungos e amostras clínicas (CLÍMACO, 2011). As bactérias desse gênero podem permanecer viáveis em ambientes aquáticos por longos períodos (SPINDLER, 2009) e, por isso, são consideradas hidrofílicas (FUENTEFRÍA, 2009). Essas espécies bacterianas também são capazes de crescer em uma variedade de ambientes inesperados, tais quais a sola interna de sapatos, resíduos de sabão, alguns tipos de pomada e água mineral engarrafada (SPINDLER, 2009).

Além da predileção por umidade, *P. aeruginosa* tolera grandes variações de temperatura e apresenta mínimas exigências nutricionais (FERRAREZE et al., 2007). *P. aeruginosa* é quimiorganotrófica, isto é, obtém elétrons a partir da oxidação de compostos orgânicos. Sua obtenção de energia a partir de carboidratos requer um metabolismo oxidativo, dependente de oxigênio molecular, o que a inclui no conjunto de bactérias não-fermentadoras. Embora seja classificada fisiologicamente como uma bactéria aeróbia, é capaz de crescer em

condições anaerobióticas quando há presença de nitrato para ser utilizado como aceptor final de elétrons, o qual é reduzido a nitrito na fosforilação oxidativa. Pode, ainda, recorrer a fontes alternativas de carbono, como o acetato (TRABULSI, 2008), ocupando importante posição ecológica no ciclo do carbono (FUENTEFRIA, 2009). Spindler (2009) cita que a pioverdina e os compostos a ela similares agem como sideróforos, em condições de crescimento onde o ferro é um fator limitante. Sideróforos são definidos como quelantes ligantes específicos de Fe^{3+} , excretados sob condições de deficiência de ferro, que desempenham a função de sequestrá-lo e transportá-lo (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). A temperatura ótima de crescimento dessa bactéria é de 37° C, conseguindo crescer em ambientes com temperaturas até os 42° C (TORTAS, 2009).

2.1 EPIDEMIOLOGIA DE *P. aeruginosa*

P. aeruginosa raramente faz parte da microbiota normal do ser humano. Taxas de colonização representativas para sítios específicos em humanos são: 0 a 2% na pele, 0 a 3,3% na mucosa nasal, 0 a 6,6% na garganta e 2,6 a 24% em amostras fecais (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009), o que reflete sua predileção por umidade (NOUÉR, 2005). Contudo, durante a hospitalização, as taxas de colonização podem ultrapassar 50%, especialmente entre pacientes que sofreram trauma ou rompimento das barreiras cutâneas ou mucosas por ventilação mecânica, traqueostomia, cateteres, cirurgia ou queimaduras severas (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Essa bactéria pode provocar desde infecções localizadas, em regiões de processos cirúrgicos ou queimaduras (ver Figura 3), até septicemias graves (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009) e pode representar um grande risco de óbito (DAVIES; DAVIES, 2010). De acordo com Fuentefria (2009), em pacientes fibrocísticos, *P. aeruginosa* apresenta predileção pelas vias aéreas. As bacteremias e septicemias costumam ocorrer em pacientes neoplásicos, renais crônicos, diabéticos e com distúrbios cardiopulmonares (FERREIRA; LALA, 2010). Apesar de raramente infectar indivíduos imunocompetentes, constitui uma das maiores ameaças a indivíduos imunodeprimidos, sendo caracterizada como um patógeno oportunista. A ampla expressão de fatores de virulência, aliada às resistências intrínseca e adquirida a antimicrobianos, dificulta a erradicação da infecção e, no ambiente hospitalar, este quadro é ainda mais grave, o que o faz um patógeno de grande importância clínica (TRABULSI, 2008).

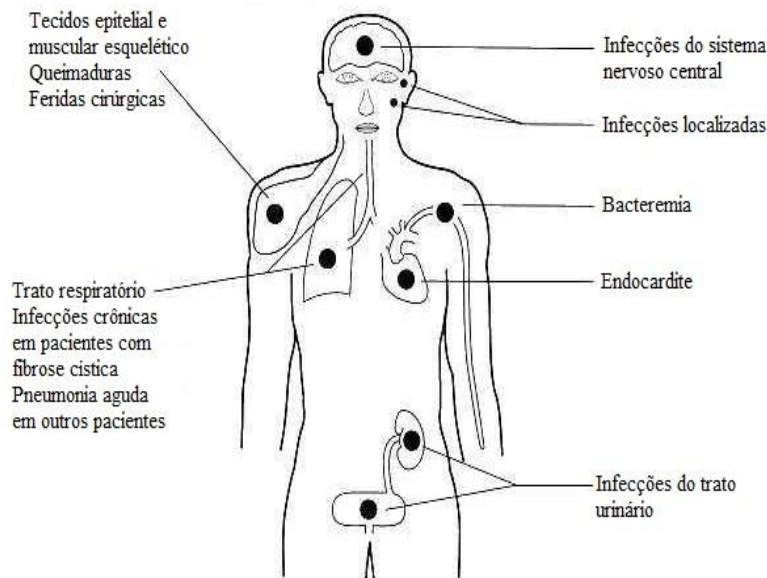


Figura 3 — Diversidade dos sítios de infecção por *P. aeruginosa*.

Fonte: Traduzido de Baron, 1996.

Entretanto, há relatos na literatura de infecções pela bactéria adquiridas na comunidade, geralmente em indivíduos imunocompetentes (NOUÉR, 2005). De acordo com Nouér (2005), esses casos são de bacteremia e endocardite de válvulas nativas, relacionadas ao uso de drogas ilícitas por contaminação da água diluente; infecção superficial do ouvido, por conta da prática de esportes aquáticos; pneumonia comunitária, associada a doença pulmonar crônica ou insuficiência cardíaca congestiva e com maior frequência em pacientes com AIDS; infecção ocular, provocada pelo uso de lentes de contato que foram preservadas com solução contaminada; ectima gangrenoso — lesão ulcerativa que geralmente ocorre quando há bacteremia por *P. aeruginosa* (HENRY, 1999) —, devido à imunossupressão por neoplasias; osteomielite, relacionada a ferimentos puntiformes após utilização de calçados em mau estado de conservação por crianças; condrites, ocasionadas pelo uso de brincos na cartilagem superior da orelha; infecções cutâneas, otites externas, infecções do trato urinário e pneumonias, associadas ao uso de piscinas, banheiras de hidromassagem, escorregadores aquáticos e, até mesmo, a parto realizado dentro de água e ao uso de esponjas para banho. Já foram relatados surtos de foliculite (inflamação dos folículos pilosos) relacionados ao uso de banheiras e piscinas de hidromassagem contaminadas com *P. aeruginosa* (ANVISA, 2013a). Sua presença em líquidos pode não ser detectada, uma vez que não ocorre turvação visual em concentrações menores que 100.000 células/mililitro (MARTINS, 2005).

Algumas infecções adquiridas na comunidade podem evoluir para quadros graves. Há casos de otite externa (enfermidades da pele do conduto auditivo externo) maligna por *P. aeruginosa* que pode acometer a base do cérebro, envolvendo as raízes de nervos cranianos e as meninges. Quanto mais severas as lesões no sistema nervoso, maiores as taxas de morbimortalidade dessa infecção (NOUJAIM et al., 1985).

2.2 PATOGÊNESE DE *P. aeruginosa*

Fatores relacionados à virulência, isto é, ao grau da capacidade do micro-organismo de provocar uma infecção (patogenicidade), auxiliam o desenvolvimento do processo infeccioso, pela atuação nas etapas de adesão ou invasão das células do hospedeiro. Esses fatores de virulência podem ser estruturais ou extracelulares (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009) (ver Figura 4). Desta forma, genes de virulência, que podem se encontrar agrupados em ilhas de patogenicidade ou extracromossomicamente, em plasmídios de virulência, são aqueles que contribuem para a habilidade do organismo em provocar doenças, e as proteínas por eles codificadas são os fatores de virulência (ALBERTS, 2004). Os fatores de virulência aumentam a capacidade de colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro. O lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo, é responsável pela sepse, através da ativação e liberação de mediadores da vasodilatação (FUENTEFRIA, 2009). Segundo Fuentefria (2009), *P. aeruginosa* é considerada a mais virulenta dentre as bactérias oportunistas Gram-negativas não fermentadoras de glicose.

Muitos dos fatores de virulência extracelulares necessários para invasão tecidual e disseminação são controlados por sistemas de sinalização célula-a-célula (ou “quorum-sensing”). Esses sistemas regulatórios possibilitam que *P. aeruginosa* produza fatores de virulência de uma forma coordenada e dependente da densidade celular, o que pode permitir à bactéria evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998). Logo, o “quorum sensing” é a expressão controlada de genes específicos em resposta a sinais químicos extracelulares produzidos pelas próprias bactérias (SOTO, 2013).

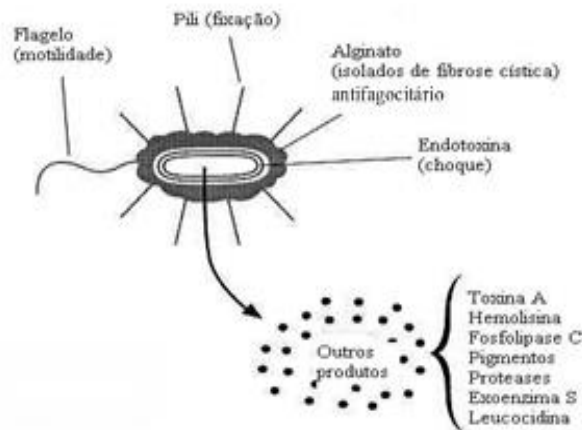


Figura 4 — Estrutura e mecanismos patogênicos de *P. aeruginosa*.

Fonte: Traduzido de Baron, 1996.

A presença de uma cápsula mucoide (alginato) possibilita a aderência à superfície mucosa normal e confere a habilidade de não ativar o complemento e de aumentar a atividade oxidativa dos neutrófilos, contribuindo para a patogênese da infecção crônica (NOUÉR, 2005). O alginato é um polissacarídeo composto por ácido manurônico e ácido glicurônico (TRABULSI, 2008). Segundo Martins (2005), o alginato protege a bactéria contra opsonização, fagocitose, quimiotaxia e anticorpos e pode estar associado ao mau prognóstico dos pacientes com fibrose cística, sendo o morfotipo mucoide frequentemente encontrado em secreções de pacientes com fibrose cística que estão cronicamente infectados por *P. aeruginosa* (ver Figura 5). Além disso, permite a formação de microcolônias, denominadas biofilme, que são recobertas por um espesso material composto pelo alginato, LPS e proteína (FERREIRA; LALA, 2010).



Figura 5 – Coloração de Gram de *P. aeruginosa* rodeada de material capsular mucoide em um paciente fibrocístico.

Fonte: Murray; Parental; Pfaller, 2006, p. 361.

Os biofilmes são formados na superfície de dispositivos introduzidos no organismo (TRABULSI, 2008), como cateteres, próteses vasculares e drenos. Podem ser encontrados em tubos de água, até mesmo, nos tubos de alimentação de água dos equipos odontológicos, uma vez que o biofilme se forma onde uma superfície sólida esteja em contato com água por um determinado espaço de tempo (OLIVEIRA, 2010). Nogueira e Miguel (2009) mencionam que os biofilmes funcionam como uma fonte permanente de bactérias que podem causar infecção em diferentes órgãos, e, de acordo com Oliveira (2010), eles representam mais de 90% dos contaminantes existentes em sistemas aquosos, industriais, clínicos e ambientais.

Os isolados mucoides são, portanto, mais resistentes, formam colônias de agregados firmes que superam os mecanismos de defesa — incluindo o mecanismo muco-ciliar do trato respiratório e os surfactantes, além dos antibióticos — e permitem maior aderência a superfícies celulares (NOUÉR, 2005). Segundo Soto (2013), os biofilmes são considerados responsáveis por 65% das infecções bacterianas. A reduzida sensibilidade bacteriana aos antibióticos nos biofilmes pode ser ocasionada pela escassa penetração do antibiótico, sua interação com constituintes do biofilme, o estabelecimento da fase estacionária dos micro-organismos no biofilme, o estresse adaptativo — condições ambientais, como luz-ultravioleta, calor, detergentes ácidos e anticorpos, que ativam mecanismos de resposta adaptativa capazes de possibilitar a sobrevivência das bactérias em ambientes hostis (ROSSI, 2008) — e o surgimento de células resistentes (TORTAS, 2009).

As fímbrias (ou pili), por sua vez, são apêndices filamentosos, geralmente em maior número que os flagelos, que permitem a aderência do micro-organismo a receptores presentes na superfície de células epiteliais do hospedeiro, através das adesinas localizadas em suas extremidades. Essas estruturas, quando especializadas, também podem agir como pili sexual (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009). Tanto as fímbrias quanto o alginato contribuem para o processo de colonização dos tecidos por *P. aeruginosa*, ao passo que fosfatase alcalina, exoenzima S, citotoxina, elastase, exotoxina A, lipase e fosfolipase são os principais produtos extracelulares relacionados à invasão tecidual pela mesma (FERREIRA; LALA, 2010). A exotoxina A, por exemplo, impede a síntese proteica, contribui para a dermonecrose e é imunossupressora (KVITKO, 2010). Ver Figura 6.

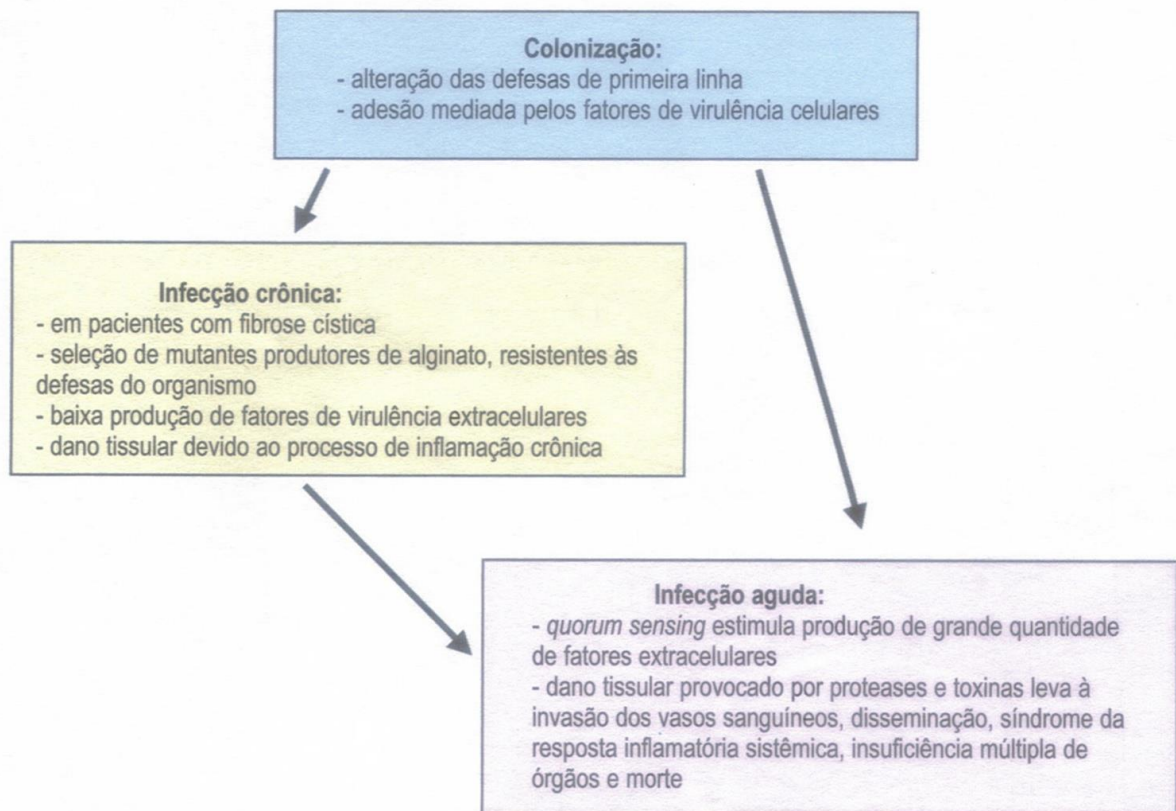


Figura 6 – Fases da patogênese da infecção por *P. aeruginosa*.

Fonte: Trabuasi, 2008, p. 380.

2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

P. aeruginosa é uma das bactérias causadoras de infecção hospitalar cuja resistência a antibióticos tem aumentado dramaticamente (SANTOS, 2004). Um antibiótico é, a princípio, uma substância sintetizada por micro-organismos vivos capaz de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos ou de destruí-los (VICENTE, 1982). A maioria dos fungos actinomicetos produtores de antibióticos possuem genes que codificam resistência aos compostos produzidos por eles (DAVIES; DAVIES, 2010). Assim, o desenvolvimento da resistência é um fato previsível quando se trata de antibióticos naturais, tais como penicilina, cloranfenicol, cefalosporinas, vancomicina, tetraciclina e eritromicina. O surgimento de bactérias resistentes a antibióticos provenientes de fontes naturais impulsionou a manipulação de suas moléculas, dando origem a classes de antibióticos de diferentes gerações (DAVIES; DAVIES, 2010).

Quando a Terra era recém-surgida, os micro-organismos, até então os únicos seres vivos do planeta, disputavam entre si os escassos nutrientes, e algumas espécies bacterianas produziam substâncias que destruíam as bactérias concorrentes. Deste modo, as mais aptas à sobrevivência eram selecionadas, e as mais vulneráveis desenvolveram mutações que as tornavam resistentes. Com o surgimento de novas formas de vida, algumas delas foram capazes de produzir antibióticos naturais. No entanto, em meio à guerra química, bactérias e fungos adquiriam mutações que capacitaram sua resistência aos mesmos. Nos seres humanos, a colonização pela microbiota, juntamente com infecções recorrentes, gerou igual situação de disputa entre micro-organismos, reproduzindo o fenômeno da resistência aos antibióticos naturais produzidos por bactérias e fungos concorrentes, ou mesmo, pelo próprio organismo humano (UJVARI, 2011). Atualmente, um grande número de genes de resistência para antibióticos são componentes de populações microbianas naturais (DAVIES; DAVIES, 2010).

O desenvolvimento da resistência a antimicrobianos se manifesta pela expressão de genes adquiridos (por mutações, transformação, conjugação ou transdução) capazes de conferir características que tornam as células aptas a resistir aos efeitos dessas drogas. Conforme descrito, esse processo é um aspecto inerente à evolução desses seres vivos (DAVIES; DAVIES, 2010), portanto, pode ser considerado inevitável e irreversível (SANTOS, 2004).

Não obstante, a aquisição de resistência pode ser impulsionada por condutas humanas. A transferência horizontal de genes ocorreu em toda a história evolutiva, mas a pressão seletiva contemporânea do uso e descarte de antibióticos é muito mais intensa (DAVIES; DAVIES, 2010). Em ambientes como hospitais, a grande pressão seletiva exercida por agentes antimicrobianos promove o aparecimento de linhagens resistentes, o que é influenciado pelo estado imunológico do paciente, o número de bactérias no local da infecção, o mecanismo de ação da droga e a quantidade da mesma que atinge as bactérias (SANTOS, 2004). Segundo Spindler (2009), o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos pode promover o aparecimento de bactérias resistentes, o que, por sua vez, proporciona a disseminação de genes de resistência no meio ambiente. Fora de hospitais, algumas das pressões que o ambiente exerce são: temperatura, pH, concentração de nutrientes, concentração de metais pesados e interações populacionais (OLIVEIRA, 2010). A principal solução bacteriana para as mudanças tóxicas assume a forma de sistemas de bombeamento multivalentes, que previnem a acumulação intracelular de diversas substâncias bactericidas e bacteriostáticas. Diferentes pressões seletivas podem levar a mutações que coincidentemente conferem um nível de

resistência a antibióticos (DAVIES; DAVIES, 2010). Durante a infecção crônica, contribuem para a seleção de fenótipos de resistência em *P. aeruginosa*, através de variação genética, fatores de estresse, como o sistema imunológico, antibióticos e a presença de um ambiente microaerófilo (com baixas concentrações de oxigênio) ou anaeróbico (em ausência de oxigênio) (FUENTEFRÍA, 2009).

A descoberta dos antibióticos é corretamente considerada um dos mais significativos eventos relacionados à saúde dos tempos modernos, e não somente por seu impacto no tratamento de doenças infecciosas, mas também pelas aplicações alternativas, dentre as quais o uso como agentes imunossupressores. Nos 60 anos desde sua introdução, milhões de toneladas de antibióticos têm sido produzidas e empregadas com uma ampla variedade de propósitos. O desenvolvimento de gerações de micro-organismos resistentes aos antibióticos e sua distribuição em populações de micro-organismos pela biosfera são os resultados de muitos anos de incessante pressão seletiva a partir de aplicações humanas dos antibióticos, através de uso excessivo, subutilização e uso indevido. Isso não é um processo natural, mas uma situação criada pelo homem e sobreposta à natureza (DAVIES; DAVIES, 2010).

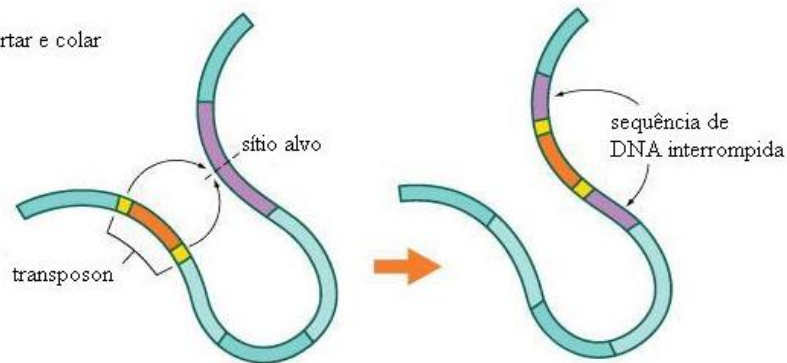
Embora a introdução dos antimicrobianos na clínica médica tenha representado um grande avanço no tratamento de infecções bacterianas graves, seu uso tem sido acompanhado pelo rápido aparecimento de cepas resistentes, e especialistas médicos alertam sobre um retorno à era pré-antibiótica (DAVIES; DAVIES, 2010). Ao longo dos anos, a resistência a, praticamente, todos os antimicrobianos disponíveis para tratamento tem aumentado consideravelmente e é descrita em várias partes do mundo, conforme vem sendo observado, principalmente, em espécies não fermentadoras, tais como *Pseudomonas* spp. (SPINDLER, 2009).

O tipo de resistência que resulta de características inerentes às células e, por isso, comuns a todos os indivíduos da espécie, é conhecido como resistência intrínseca e é, geralmente, determinado por genes cromossômicos (BARBOSA; TORRES, 2010). Contudo, a resistência pode, ainda, ser ocasionada pela aquisição de genes de resistência, através da transferência horizontal de genes (transportados em plasmídios, transposons ou integrons) e/ou da acumulação de mutações pontuais que conduzem à alteração do material genético (TORTAS, 2009). A observação inesperada da resistência antimicrobiana geneticamente transferível ocorreu no Japão, em meados de 1950 (DAVIES; DAVIES, 2010).

Os transposons, ou elementos transponíveis são definidos, de acordo com Alberts (2004, p.287), como “elementos genéticos móveis que normalmente possuem uma baixa seletividade aos sítios-alvo e podem, assim, inserir-se em vários sites diferentes de DNA” (ver Figura 7).

Dois métodos de transposição:

1. Mecanismo cortar e colar



2. Mecanismo copiar e colar

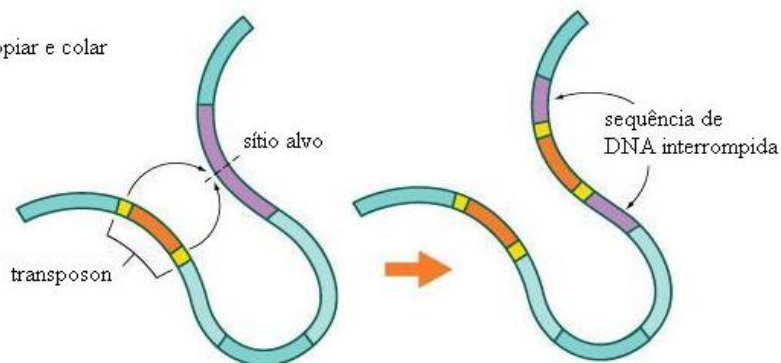


Figura 7 – Mecanismos de transposição.

Fonte: Traduzido de <http://www.broadinstitute.org/files/news/stories/full/transposons_720x720_v2.jpg>. Acesso em: 24 ago. 2013.

A transferência de genes pode ser promovida mediante a passagem de plasmídios, fragmentos circulares de DNA de localização extracromossômica (ver Figura 8) e duplicação independente, que podem, inclusive, ser vetores de transposons. A frequência dos genes de resistência em plasmídios é maior do que em cromossomos, ao menos dentre as bactérias de interesse clínico (BARBOSA; TORRES, 2010). A transferência da resistência aos antibióticos mediada por plasmídios tem sido o principal foco de investigação, devido a seu significado médico e, mais recentemente, prático (DAVIES; DAVIES, 2010).

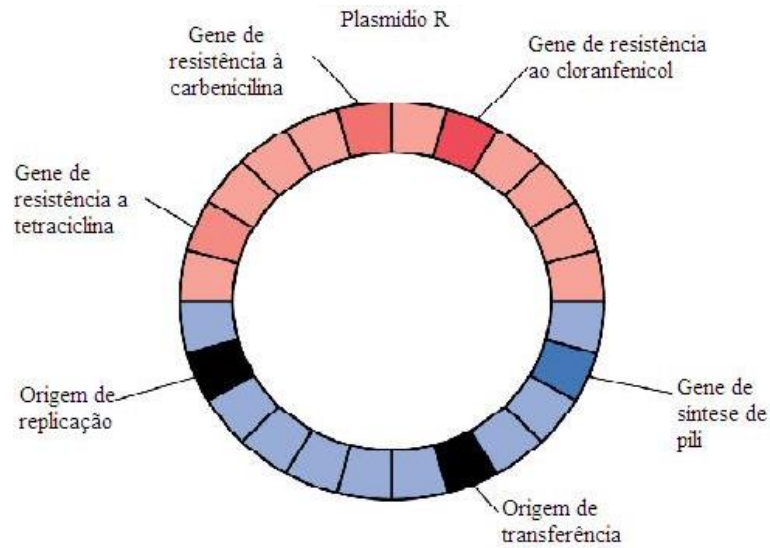


Figura 8 – Representação de um plasmídeo de resistência (plasmídeo R).

Fonte: Traduzido de <<http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/PAL/Lecture%202.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2013.

Os integrons são elementos genéticos que possuem determinantes de recombinação sítio-específica com capacidade de reconhecimento, captura e expressão de genes móveis não funcionais, os cassetes gênicos (elementos móveis não replicativos contendo um gene que pode codificar resistência aos antibióticos e um local de recombinação específico da integrase, a qual possui a capacidade de extrair ou integrar esses cassetes de gene ao integron ou a outro cassete), o que os transforma em genes funcionais (TORTAS, 2009) (ver Figura 9). Os integrons, identificados e caracterizados pela primeira vez por Stokes e Hall em 1987, não são elementos genéticos móveis por si mesmos (DAVIES; DAVIES, 2010). Esses elementos podem ser encontrados em cromossomos, plasmídios ou transposons, o que facilita a difusão dos genes de resistência a antibióticos (TORTAS, 2009). Uma vez que vários integrons têm sido reportados como localizados em transposons, tais estruturas podem proporcionar um meio adicional para a mobilidade dos genes de resistência aos antibióticos e podem explicar a localização plasmidial e cromossômica do mesmo gene de ESBL em *P. aeruginosa* (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003).

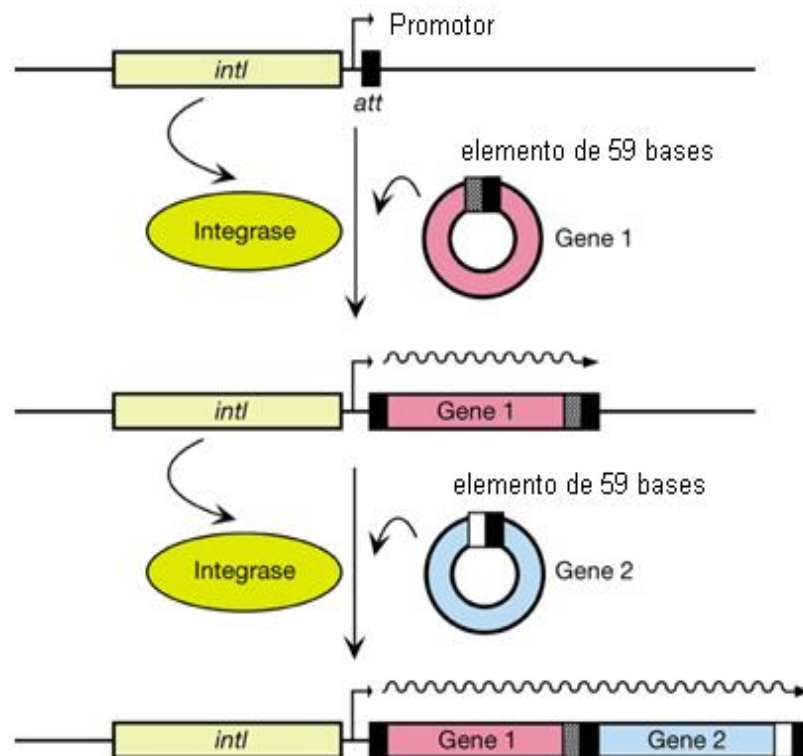


Figura 9 – Captura e expressão gênica por integrons.

Fonte: Traduzido de <http://www.nature.com/nature/journal/v405/n6784/fig_tab/405299a0_F3.html#figure-title>. Acesso em: 24 ago. 2013.

A troca de informações genéticas pode ocorrer através de três mecanismos: (1) transformação, onde ocorre a incorporação e o processamento de DNA exógeno livre; (2) conjugação, que envolve transferência de DNA plasmidial (do plasmídeo F) por um pili sexual entre um doador (F+) e um receptor (F-), o qual é convertido em F+, podendo, em alguns casos, haver também transferência de parte do cromossomo e plasmídios não conjugativos, devido à capacidade de integração, reversível, do plasmídeo F ao cromossomo; e (3) transdução, na qual o DNA de uma bactéria é transferido a outra por meio de um bacteriófago, vírus que infecta bactérias (BARBOSA; TORRES, 2010).

Essa relativa facilidade em adquirir genes de células vizinhas, o que ocorre com grande frequência nos procariontos, inclusive, entre diferentes espécies, pode fornecer à bactéria receptora uma vantagem seletiva, visto que podem ser transferidos genes que conferem resistência a um dado antibiótico ou que produzem determinada toxina (ALBERTS, 2004). Todavia, a resistência adquirida também pode ocorrer quando não há alteração genética, pela indução de um fenótipo devido às condições do meio, que pode ser estável e

permanecer mesmo quando o fator de exposição for retirado, ou instável, desaparecendo juntamente com o fator de exposição (MARTINS, 2005). Embora a resistência a antimicrobianos ocorra em muitas espécies e os processos para a recombinação genética bacteriana já mencionados sejam genéricos, somente serão abordados no presente trabalho os mecanismos referentes a *Pseudomonas aeruginosa*.

3 PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *P. aeruginosa*

O uso bem sucedido de qualquer agente terapêutico é comprometido pelo desenvolvimento potencial de tolerância ou resistência a esse composto a partir do momento em que é empregado pela primeira vez (ver Figura 10). Uma ampla variedade de mecanismos bioquímicos e fisiológicos pode ser responsável pela resistência. Em *P. aeruginosa*, os mecanismos de resistência a antibióticos evoluíram coincidentemente com a introdução de novos derivados de antibióticos, comprometendo a maioria dos tratamentos eficazes (como os β -lactâmicos e os aminoglicosídeos) (DAVIES; DAVIES, 2010). O fato de *P. aeruginosa* possuir uma elevada taxa mutacional faz com seja gerada uma resistência progressiva aos antibióticos (MILAGRES et al., 2008).

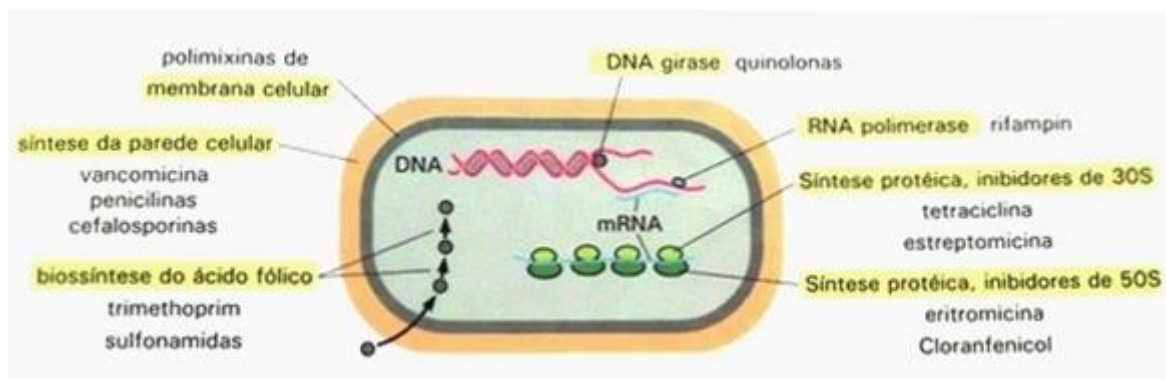


Figura 10 – Alvos bacterianos de alguns antibióticos.

Fonte: Alberts, 2004, p. 1429.

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a muitos agentes antimicrobianos não relacionados estruturalmente, devido à baixa permeabilidade da membrana externa, à expressão constitutiva de várias bombas de efluxo com uma ampla especificidade de substratos e à β -lactamase AmpC (também conhecida como cefalosporinase cromossômica da classe C), que ocorre naturalmente (STRATEVA; YORDANOV, 2009). O fato do peptidoglicano ser recoberto por uma membrana externa lipopolissacarídica reduz a permeabilidade celular, dificultando a penetração de alguns antibióticos que são mais hidrofílicos, como, por exemplo, os β -lactâmicos. A resistência intrínseca também está relacionada à produção de β -lactamases e de enzimas inativadoras de outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas (MARTINS, 2005). Em decorrência de tais mecanismos, a resistência natural da espécie diz respeito a algumas cefalosporinas de

espectro estendido (VAHABOGLU et al., 2001), além das cefalosporinas de primeira e segunda gerações (ver Figura 11), à penicilina G e a aminopenicilinas, incluindo aquelas combinadas com inibidores de β -lactamases (STRATEVA; YORDANOV, 2009) (ver Figura 12). Segundo Goodman e Gilman (2005), todas as cepas de *P. aeruginosa* são resistentes às tetraciclina (ver Figura 13) e esse micro-organismo resiste, inclusive, a concentrações muito altas de cloranfenicol (ver Figura 14). De acordo com Katzung (2010), a resistência intrínseca às tetraciclina se deve às bombas de efluxo codificadas cromossomicamente.

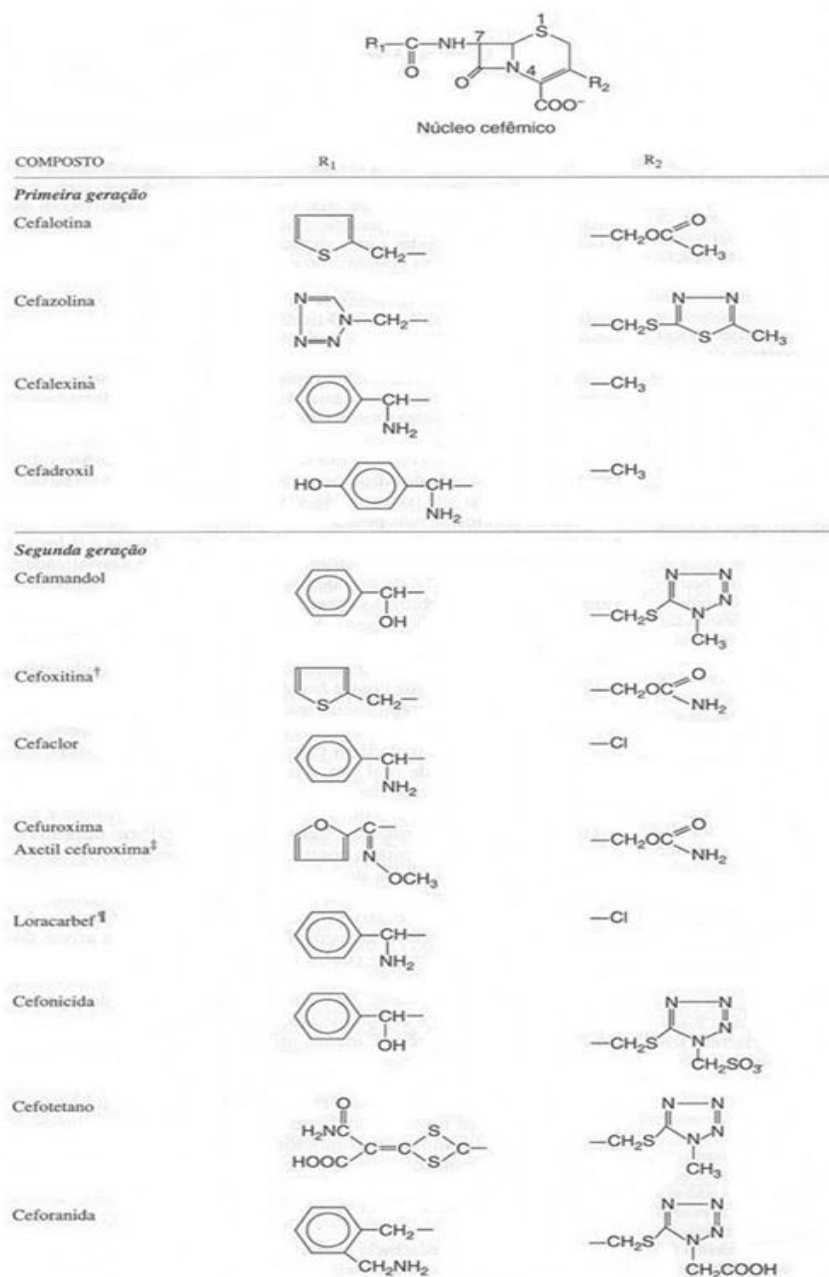


Figura 11 – Cefalosporinas de primeira e segunda gerações. Nenhuma cefalosporina de primeira ou segunda geração é ativa contra *P. aeruginosa* (KATZUNG, 2010).

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 904.

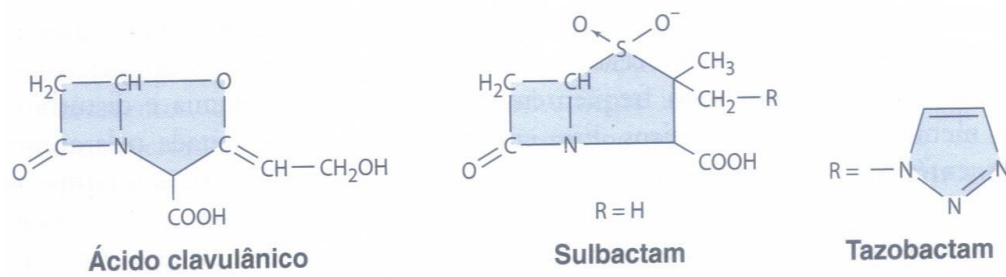


Figura 12 – Inibidores de β -lactamases.

Fonte: Katzung, 2010, p. 661.

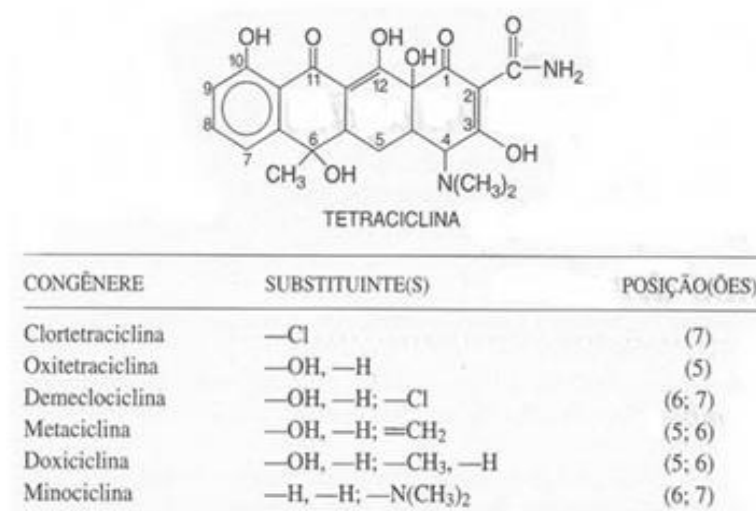


Figura 13 – Fórmulas estruturais das tetraciclina.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 930.

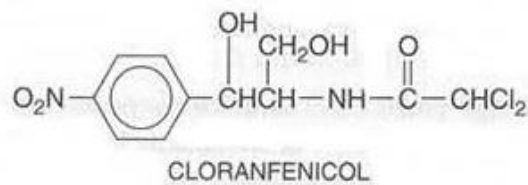


Figura 14 – Fórmula estrutural do cloranfenicol.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 934.

O fenótipo suscetível de *P. aeruginosa* (o chamado tipo selvagem) inclui suscetibilidade a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina), algumas cefalosporinas de terceira geração, todas as cefalosporinas de quarta geração (ver Figura 15), o monobactâmico aztreonam e os carbapenêmicos imipenem e meropenem (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Katzung (2010) afirma que as únicas cefalosporinas de terceira geração com atividade útil contra *P. aeruginosa* são a ceftazidima e a cefoperazona e que a cefepima apresenta boa atividade. Contudo, *P. aeruginosa* também adquire facilmente mecanismos de resistência adicionais, o que leva a sérios problemas terapêuticos (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

Esta espécie frequentemente pode apresentar mais de um mecanismo de resistência simultaneamente, o que aumenta o arsenal de resistência de algumas cepas aos antimicrobianos (FUENTEFRÍA, 2009). Esse fenômeno pode ter um impacto clínico considerável, como é o caso da coprodução de potentes mecanismos de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos (DOI et al., 2007). Em algumas cepas bacterianas, a coexistência de mecanismos de resistência pode torná-las multirresistentes aos antibióticos (TORTAS, 2009). Os critérios predominantemente utilizados pelos autores classificam linhagens de *P. aeruginosa* como multirresistentes quando há resistência a, pelo menos, três das seguintes classes de antibióticos: aminoglicosídeos, penicilinas anti*Pseudomonas*, carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas. São consideradas panresistentes as linhagens que se apresentam resistentes a todas essas classes, inclusive aos monobactâmicos e a polimixina B (CLÍMACO, 2011).

O fenômeno da multirresistência é frequentemente ocasionado pela exposição prévia de cepas de *P. aeruginosa* a esses agentes antimicrobianos (VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1998). O grande consumo de antibióticos em hospitais faz com que neles sejam encontradas bactérias com diversos mecanismos de resistência. A resistência a múltiplos antibióticos pode decorrer, por exemplo, da aquisição de vários genes de resistência e mutações que ocasionam alteração dos alvos do antibiótico, alteração da permeabilidade e mecanismos de efluxo (TORTAS, 2009). Alguns desses mecanismos, que serão abordados ao longo do capítulo, se encontram na Ilustração 1. Parece provável que a resistência a múltiplas drogas reflita a acumulação de múltiplas mutações. Além disso, a emergência da resistência a múltiplas drogas associada a plasmídios e integrons é menos previsível que a resistência mutacional, porque depende da fuga aleatória de genes de DNA móvel (LIVERMORE, 2002).

Núcleo cefêmico

COMPOSTO	R ₁	R ₂
Terceira geração		
Cefotaxima		$-\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$
Proxetil cefpodoxima [§]		$-\text{CH}_2\text{OCH}_3$
Ceftizoxima		$-\text{H}$
Ceftriaxona		
Cefoperazona		
Ceftazidima		$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_6\text{H}_5)$
Quarta geração		
Cefepima		

* C, comprimido; O, suspensão oral; I, injeção.
[†] A cefoxitina, uma cefamicina, tem um grupo $-\text{OCH}_3$ na posição 7 do núcleo cefêmico.
[‡] A axetil cefuroxima é o acetiloxietil éster da cefuroxima.
[§] O loracarbef, um carbacefem, tem um carbono no lugar do enxofre na posição 1 do núcleo cefêmico.
[§] A proxetil cefpodoxima tem um grupo $-\text{COOCH}(\text{CH}_3)\text{OCOOCH}(\text{CH}_3)$ na posição 4 do núcleo cefêmico.

Figura 15 – Cefalosporinas de terceira e quarta gerações.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 905.

Mecanismos	Efeitos
Baixa permeabilidade da membrana externa	Difícil penetração dos antimicrobianos hidrofílicos (MARTINS, 2005)
Enzimas β -lactamases	Clivagem dos antimicrobianos β -lactâmicos que penetram na célula (SPINDLER, 2009)
Bombas de efluxo	Extrusão de moléculas antimicrobianas da célula bacteriana (SCHWEIZER, 2003)
Perda de porinas	Redução da entrada de compostos antimicrobianos na bactéria (VAHABOGLU et al., 2001)
Mutações na DNA girase e na topoisomerase IV	Inativação das quinolonas por alteração do alvo (TORTAS, 2009)
Modificação das fluoroquinolonas por uma aminoglicosídeo-N-acetiltransferase	Redução da atividade das fluoroquinolonas (DAVIES; DAVIES, 2010)
Ligação da proteína QnrA à DNA girase e à topoisomerase IV	Impedimento da ligação entre as quinolonas e seus alvos (TORTAS, 2009)
Modificação enzimática dos aminoglicosídeos/ alteração ribossomal por mutações	Redução da afinidade de ligação dos aminoglicosídeos ao ribossomo (STRATEVA; YORDANOV, 2009; TORTAS, 2009)
Metilação da subunidade 16 do rRNA	Proteção ribossomal contra a ligação aos aminoglicosídeos (NEVES et al., 2011)
Alterações na constituição da membrana externa da bactéria	Comprometimento da interação das polimixinas em seu sítio de atuação (TORTAS, 2009)

Ilustração 1 – Quadro dos mecanismos de resistência e seus efeitos em *P. aeruginosa*.

Fonte: O autor.

3.1 ENZIMAS β -LACTAMASES

Os antibióticos β -lactâmicos são um variado grupo de agentes antimicrobianos amplamente utilizado no tratamento clínico de infecções causadas por diversas bactérias. Sua elevada eficácia antimicrobiana e baixa toxicidade para as células eucariotas os torna a opção terapêutica mais frequente. Os antibióticos desta classe apresentam um anel β -lactâmico, uma estrutura cíclica de quatro átomos (três de carbono e um de nitrogênio), com radicais substituintes (ver Figura 16). A união dos β -lactâmicos a receptores específicos da membrana citoplasmática, as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), inibe as enzimas (transpeptidases, carboxipeptidases) que participam da síntese do peptidoglicano. Por conseguinte, a síntese da parede celular é comprometida e ocorre a morte celular. A estrutura da cadeia lateral divide os β -lactâmicos em penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de β -lactamases (TORTAS, 2009).

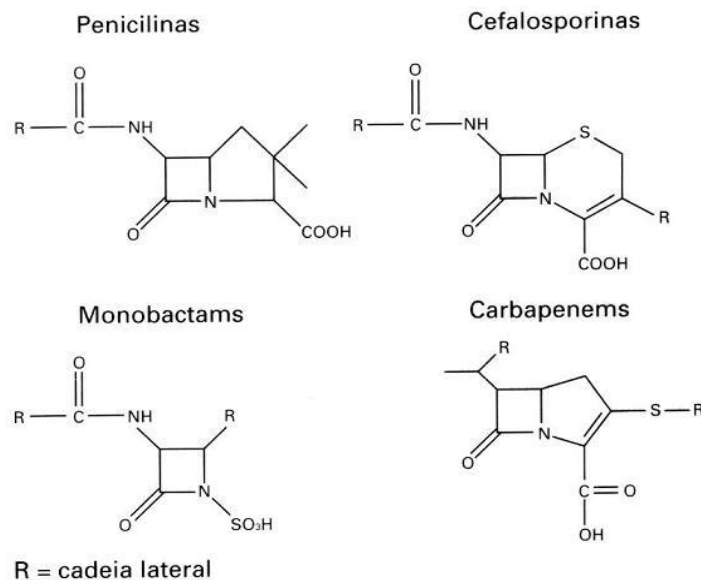


Figura 16 – Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos.

Fonte: <http://www3.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=57&lang=br>. Acesso em: 24 nov. 2013

Dentre os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, já foram citadas a hiperexpressão de sistemas de efluxo, a alteração da permeabilidade da membrana e a produção de enzimas β -lactamases, que é o mecanismo mais importante de resistência a esses agentes (FUENTEFRÍA, 2009). Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos não mediados por β -lactamases conferem, na maior parte das vezes, uma resistência de nível baixo a moderado, mas de amplo espectro, incluindo ainda as quinolonas (SPINDLER, 2009). Em *P. aeruginosa*, todos os possíveis mecanismos que determinam resistência aos β -lactâmicos

(inativação enzimática, efluxo ativo, mudanças na permeabilidade da membrana externa e síntese PBPs com baixa afinidade por β -lactâmicos) podem existir simultaneamente ou em várias combinações (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

A penicilina (ver Figura 17) foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, e, em 1940, vários anos antes da introdução da penicilina como terapêutica, uma penicilinase bacteriana foi identificada. Uma vez que os antibióticos foram usados largamente, cepas resistentes aptas a inativarem as drogas se tornaram prevalentes, e estudos sintéticos foram realizados para modificar quimicamente a penicilina a fim de prevenir a clivagem por penicilinases (β -lactamases). Até o momento, vários grupos e classes de β -lactamases foram identificados, compreendendo até 1000 β -lactamases relacionadas à resistência (DAVIES; DAVIES, 2010).

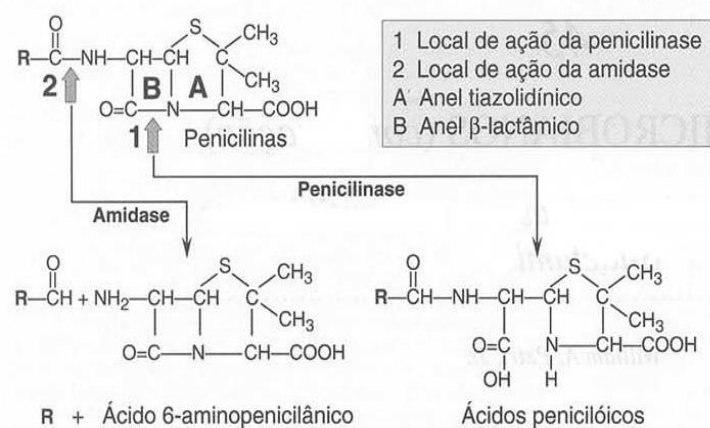


Figura 17 – Estrutura das penicilinas e produtos de sua hidrólise enzimática.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 892.

Conforme já citado, a produção enzimática é o principal mecanismo de resistência adquirida aos antibióticos β -lactâmicos em *P. aeruginosa* (STRATEVA; YORDANOV, 2009). As β -lactamases inativam os antimicrobianos β -lactâmicos pela quebra do anel β -lactâmico (SPINDLER, 2009), rompendo sua ligação amida, de forma que os produtos obtidos não possuem atividade antibacteriana (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos ocorre pela formação de uma ligação éster entre o sítio ativo de serina (ou com íons de zinco, no caso das metalo- β -lactamases) da enzima β -lactamase e o anel β -lactâmico do antimicrobiano (ver Figura 18). Em bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, essas enzimas se localizam no espaço periplasmático e inativam os β -lactâmicos logo que eles atravessam a membrana externa, antes que atinjam as PBPs

(TORTAS, 2009) (ver Figura 19). Ujvari (2011) menciona que uma única molécula de β -lactamase pode clivar até 1000 moléculas do antibiótico por segundo. Muitas β -lactamases plasmidiais e cromossômicas têm sido reportadas em *P. aeruginosa*, embora nenhuma seja de ocorrência mundial (CLÍMACO, 2011).

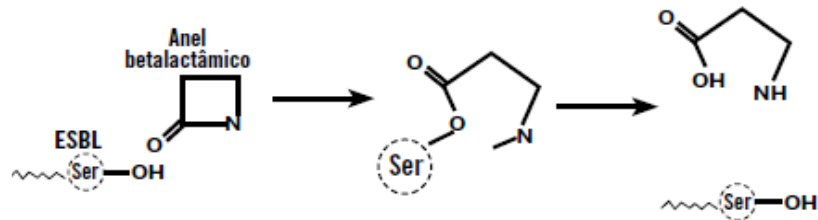


Figura 18 – Mecanismo de hidrólise dos β -lactâmicos por ESBLs.

Fonte: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442012000200004&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 nov. 2013.

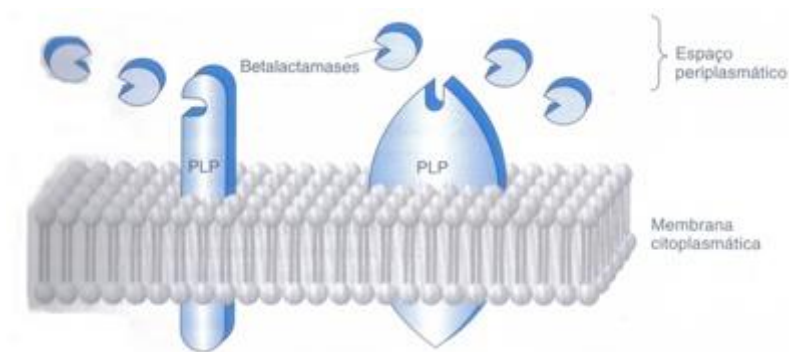


Figura 19 - Local de ação das enzimas β -lactamases. Quando presentes, essas enzimas se localizam no espaço periplasmático ou sobre a superfície externa da membrana citoplasmática. As PLPs são as proteínas de ligação da penicilina, também chamadas de PBPs (KATZUNG, 2010).

Fonte: Katzung, 2010, p. 657.

Os genes para as enzimas β -lactamases são, provavelmente, os mais internacionalmente distribuídos (DAVIES; DAVIES, 2010). A maioria desses genes está localizada em regiões móveis do DNA bacteriano, como plasmídios e integrons de classe 1 (apesar de alguns serem encontrados em integrons das classes 2 e 3) (SPINDLER, 2009), o que contribui para a disseminação da resistência entre bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes (TORTAS, 2009). Os genes de β -lactamases são antigos e podem também ser encontrados em ambientes remotos e desolados, o que implica que novas β -lactamases com alcances de substrato alterados ocorrem no ambiente. Mutações ao acaso de genes que codificam enzimas deram origem a catalisadores modificados com espectros de resistência cada vez mais estendidos (DAVIES; DAVIES, 2010).

A classificação de Ambler foi proposta com base na estrutura molecular das β -lactamases, de acordo com sua sequência de aminoácidos (SPINDLER, 2009), e as divide em 4 classes (A, B, C e D). Um número significativo de β -lactamases de todas as quatro classes moleculares é encontrado em *P. aeruginosa*, incluindo ESBLs das classes A, B e D (STRATEVA; YORDANOV, 2009). *P. aeruginosa* está sob contínua pressão seletiva da exposição aos antibióticos em ambientes hospitalares e, portanto, ESBLs devem ter sido amplamente distribuídas entre essa espécie (VAHABOGLU et al., 2001). Diferentemente da classificação de Ambler, a classificação de Bush foi a primeira a relacionar as estruturas moleculares das enzimas a seus substratos preferenciais e propriedades inibitórias (SPINDLER, 2009). Ver Tabela 1.

Tabela 1 – Betalactamases Descritas em *P. aeruginosa*

Grupos Funcionais (BUSH-JACOBY)	Classes Moleculares (AMBLER)	Betalactamases
1	C	AmpC (PDC-; intrínseca)
2a	A	TEM-1, -2, -90, -110 SHV-1
2be	A	PER-1, -2 VEB-1, -2, -3 TEM-4, -21, -24, -42, -115 SHV-2a, -5, -12 GES-1, -2, -5, -8, -9 BEL, LBT 802 CTX-M-1, -2, -43
2c	A	PSE-1, -4 CARB-3, -4, CARB-like AER-1
2d	D	LCR-1, NPS-1 OXA-1, -3, -4, -5, -7, 9, -10, -11, -12, -14, -19, -20, -21, -24/40, -28, -30, -31, -32, -35, -45, -46, -50, -53, -161
2f	A	KPC-2, -5
3	B	IMP-1, -4, -6, -7, -9, -10, -12, -13, -15, -16, -18, -22. VIM-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -11, -13, -15, -16, -17, -18. SPM-1 GIM-1 AIM-1 TMB-1

3.1.1 Classe A das β -lactamases

As β -lactamases mais frequentemente adquiridas são as enzimas específicas de *Pseudomonas* (PSEs) PSE-1 e PSE-4 (LIVERMORE, 2002). Na classe A de Ambler, dentro do grupo funcional 2c de Bush, quatro β -lactamases do tipo PSE que hidrolisam carbenicilina (ver Figura 20) foram encontradas em *P. aeruginosa*: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 e CARB-4 (cujo gene acredita-se ter sido adquirido de outra espécie bacteriana). Seu perfil de substrato inclui carboxipenicilinas, ureidopenicilinas e cefsulodina. A presença de PSEs pode ser contornada, já que cepas produtoras de carbenicilinas apresentam suscetibilidade variável a cefepima, ceftiofama e aztreonam (ver Figura 21) e suscetibilidade total para ceftazidima e carbapenênicos (STRATEVA; YORDANOV, 2009). O perfil de substrato de AER-1 se assemelha ao das demais carbenicilinas mediadas por plasmídios (SANSCHAGRIN; BEJAOU; LEVESQUE, 1998).

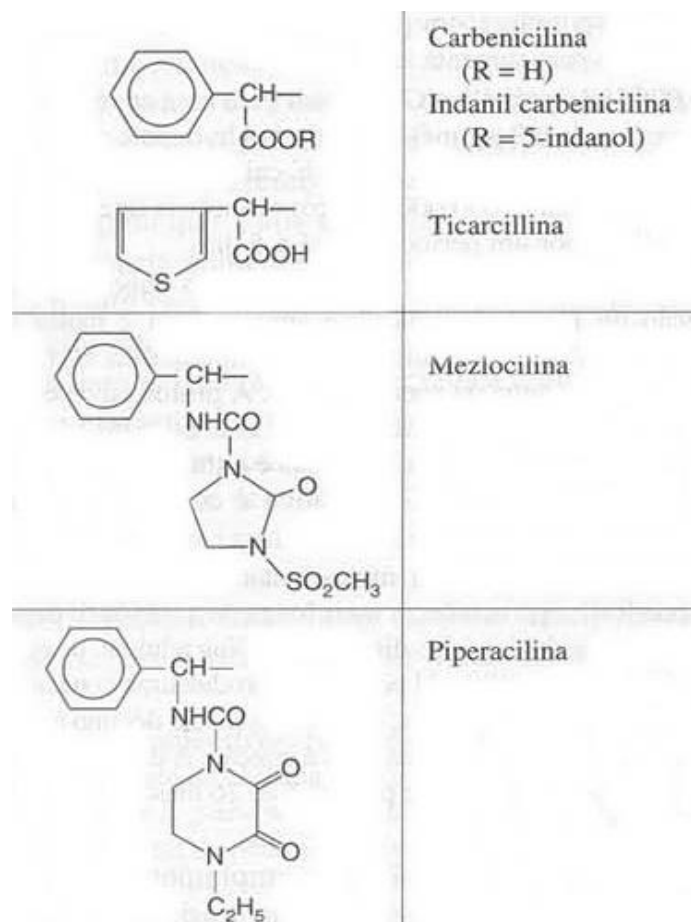


Figura 20 – Fórmulas estruturais de penicilinas com ação sobre *P. aeruginosa*.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 895.



Figura 21 – Fórmula estrutural do aztreonam.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 909.

Ao contrário das PSEs, as ESBLs da classe molecular A e do grupo funcional 2b' conduzem ao desenvolvimento da resistência não somente às carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, mas também a cefalosporinas de amplo espectro (STRATEVA; YORDANOV, 2009). As chamadas ESBLs conferem resistência a, no mínimo, várias cefalosporinas de amplo espectro, podendo ter uma atividade hidrolítica mais ampla, inclusive, sobre carbapenêmicos. Quase todas essas enzimas são inibidas por ácido clavulânico. A frequência das ESBLs, que já foram largamente reportadas em enterobactérias, tem aumentado, principalmente, em isolados de *P. aeruginosa* (SPINDLER, 2009).

Essas enzimas são dos tipos TEM (Temoniera, nome do paciente do qual foi isolada (HERITAGE et al, 1999)) e SHV (*Sulphydryl Variable*), bem conhecidos na família *Enterobacteriaceae*; do tipo PER (*Pseudomonas Extended Resistance*), majoritariamente originado de isolados da Turquia; do tipo VEB (*Vietnamese Extended-spectrum β -lactamase*), do Sudeste da Ásia, França e Bulgária; dos tipos GES, *Guiana Extended Spectrum*, e IBC, *Integron-Borne β -lactamase*, reportados na França, Grécia e África do Sul; e do tipo BEL, *Belgium Extended β -lactamase*. Esses seis tipos de enzimas são remotamente relacionados do ponto de vista genético, embora compartilhem perfis hidrolíticos semelhantes (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A arquetípica β -lactamase TEM, codificada por plasmídio, gerou várias famílias de enzimas relacionadas, proporcionando uma ampla prova de sua adaptabilidade (DAVIES; DAVIES, 2010).

Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{PER-1} são parte de estruturas transposonais, ao passo que os genes *bla*_{VEB} e *bla*_{GES} estão na forma de cassetes em integrons da classe 1 (POIREL et al., 2005). Assim, os genes codificando enzimas dos tipos VEB e GES são que estão associados a integrons, os quais podem conter também outros genes de β -lactamases dos tipos OXA

(Oxacilina). A presença de ESBLs em *P. aeruginosa* deve ser suspeitada diante do fenótipo de resistência a antibióticos combinando resistência a ticarcilina e ceftazidima e suscetibilidade a ticarcilina associada a ácido clavulânico (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003).

β -lactamases do tipo CTX-M (Cefotaximase), também incluído na classe A de Ambler, têm sido relatadas como uma família que apresenta alto nível de atividade hidrolítica, especialmente contra cefotaxima e ceftriaxona (SHIBATA et al., 2006), tendo sido a primeira enzima encontrada a hidrolisar cefalosporinas de espectro ampliado a um nível clinicamente significativo. Seus genes e variantes subsequentes são altamente bem sucedidos na transmissão e são um fenômeno e uma ameaça mundiais (DAVIES; DAVIES, 2010).

A β -lactamase PER-1 foi a primeira ESBL identificada e totalmente caracterizada em *P. aeruginosa*. Ela foi encontrada em um isolado de *P. aeruginosa* de um paciente turco hospitalizado na região de Paris, França, em 1991, e era codificada por cromossomo. Posteriormente, enzimas PER-1 codificadas por plasmídios foram reportadas (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Ainda assim, em *P. aeruginosa*, os genes *bla*_{PER} são majoritariamente codificados por cromossomos (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003). Cepas de *P. aeruginosa* produtoras de PER-1 também foram isoladas na Itália, Bélgica e Polônia. PER-1 apresenta o perfil de substrato típico das ESBLs clássicas e é moderadamente inibida por inibidores de β -lactamase e imipenem (ver Figura 22) (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Essa enzima confere resistência de alto nível à ceftazidima, com suscetibilidade restaurada pela adição de clavulanato (LIVERMORE, 2002).

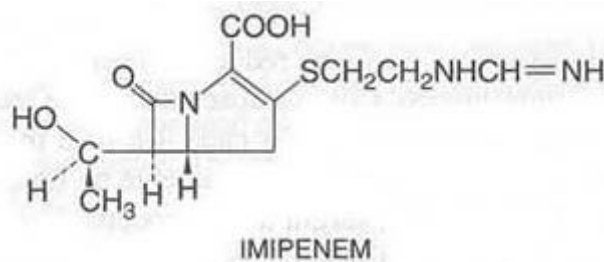


Figura 22 – Fórmula estrutural do imipenem.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 909.

O gene *bla*_{PER-1} é muito difundido na Turquia, e é possível que a propagação da PER-1 na Europa Ocidental possa ser relacionada, principalmente, à imigração de cidadãos turcos.

Vahaboglu et al. (2001) demonstraram, em seu estudo, que infecções nosocomiais com cepas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. produtoras de PER-1 foram significativamente relacionadas a um aumento da incidência de evolução fatal em pacientes turcos. Um grande surto hospitalar de *P. aeruginosa* produtora de PER-1, que ocorreu por um período de 10 meses, em uma unidade de atendimento terciário, foi documentada em Varese, Itália. Além do fenótipo de resistência aos β -lactâmicos conferido por PER-1, as cepas epidêmicas eram resistentes a vários desinfetantes, incluindo clorexidina, iodeto de povidona e tolueno-p-sulfocloramida. Também foi relatada uma cepa de *P. aeruginosa* que produzia a β -lactamase VIM-2, mediada por plasmídio, juntamente com a β -lactamase PER-1. Esse relato mostra que a mesma cepa de *P. aeruginosa* pode produzir duas β -lactamases não relacionadas, ambas com espectro hidrolítico expandido (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003), e evidencia que múltiplos fatores de resistência podem ser disseminados através do mesmo plasmídio. PER-2 ainda não foi descrita no gênero *Pseudomonas* (SPINDLER, 2009).

A SHV-2a foi originalmente detectada na França, em 1995, e, posteriormente, na Tailândia e na Polônia. Essa enzima hidrolisa fortemente cefalosporinas de quarta geração. Cepas de *P. aeruginosa* produtoras de SHV-5 e SHV-12 foram também identificadas na Tailândia e, mais tarde, em isolados da Grécia, sendo que a primeira determina alto nível de resistência a ceftazidima e monobactâmicos. Na mesma década, entre 1992 e 1998, na França, cepas de *P. aeruginosa* produtoras de enzimas do tipo TEM foram consecutivamente isoladas. Seu espectro hidrolítico inclui penicilina de espectro restrito, cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

Com relação a essas enzimas, dos tipos TEM (130 variantes descritas) e SHV (50 variantes descritas), o primeiro caso envolvendo a bactéria *P. aeruginosa* ocorreu em 1996 e, atualmente, ambos os tipos são descritos com maior frequência na Europa. Apesar de essas enzimas terem sido relacionadas a plasmídios (SPINDLER, 2009), recentemente, o gene *bla*_{TEM-21} foi identificado como parte de um transposon localizado em cromossomo. Mas é provável que genes para os tipos TEM e SHV de ESBLs, em *P. aeruginosa*, tenham se originado da família *Enterobacteriaceae*, da qual os genes foram passados por transferência genética. Diferenças nas origens de replicação dos plasmídios de *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* podem, contudo, limitar tal transferência. A verdadeira prevalência das ESBLs dos tipos TEM e SHV em *P. aeruginosa* pode ser subestimada pela dificuldade de sua detecção no laboratório clínico (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003).

O primeiro isolamento da β -lactamase VEB-1 ocorreu em 1998, na França. Em 2002, foi encontrada uma alta prevalência (93%) de genes do tipo *bla*_{VEB} em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima em um hospital tailandês. O mesmo estudo identificou um novo gene, *bla*_{VEB-2} (STRATEVA; YORDANOV, 2009). As enzimas VEB conferem resistência a cefepima, cefotaxima, cefpiroma, cefpodoxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefuroxima. Mas sua elevada capacidade de hidrolisar a ceftazidima e o aztreonam é o motivo de maior preocupação (SPINDLER, 2009). A enzima VEB-2 difere da VEB-1 somente por uma mudança de aminoácido, localizado fora do sítio ativo da enzima. O perfil de substrato das enzimas VEB é idêntico ao da PER-1, isto é, altas afinidades para penicilinas de espectro limitado e cefalosporinas de espectros limitado e estendido. Essas ESBLs têm baixos níveis de afinidade pelos carbapenêmicos e são moderadamente inibidas por ácido clavulânico e imipenem. Além disso, VEB-1, assim como PER-1, é bem inibida por cefoxitina. Os genes do tipo *bla*_{VEB} são, principalmente, codificados por cromossomos em *P. aeruginosa* (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003).

Ao final do século 20, foi descrita uma nova família de ESBLs, referida como GES (*Guiana Extended Spectrum*), devido ao país de origem do primeiro isolado, a Guiana Francesa. GES-1, peculiar em seu baixo nível de atividade catalítica, baixa afinidade pela maioria dos substratos e um perfil de inibição que inclui ácido clavulânico e imipenem, foi encontrada na França e no Brasil. Ao contrário da maioria das ESBLs da classe A, tem uma forte afinidade pela cefalosporina de segunda geração cefoxitina (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A enzima GES é capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro, e as variantes GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6 possuem também a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (SPINDLER, 2009). A GES-2, por exemplo, que difere da GES-1 pela mudança de um único aminoácido localizado no sítio ativo das enzimas, hidrolisa também o imipenem. Essa enzima foi identificada em uma cepa de *P. aeruginosa* de um paciente hospitalizado no hospital universitário de Pretória, África do Sul, e foi associada a isolados envolvidos em um surto ocorrido no mesmo hospital de maio a julho de 2000. Spindler (2009) menciona que isolados de *P. aeruginosa* produtores de GES de diferentes variantes já foram descritos em vários locais da Europa, China e África do Sul. Tais informações sugerem que esses genes de β -lactamases podem ter maior distribuição aleatória do que os das enzimas VEB e PER (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003).

O gene estruturalmente relacionado ao *bla*_{GES-1}, o *bla*_{ICB-2}, foi relatado em *P. aeruginosa* a partir de um isolado grego em Tessalônica (SPINDLER, 2009). A ICB-2

difere por um único resíduo de aminoácido da GES-1 e confere resistência a ceftazidima e outras oximino-cefalosporinas, sendo inibida por imipenem, tazobactam e ácido clavulânico. A enzima IBC-2 difere da IBC-1 por uma mudança de aminoácido, sendo ambas as enzimas relacionadas à linhagem de GES-1 e GES-2. Tanto os genes *bla*_{GES} quanto os *bla*_{IBC} foram encontrados como sendo codificados, em *P. aeruginosa*, por plasmídios ou no cromossomo (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003).

Também foi relatada uma β -lactamase designada BEL-1, que é remotamente relacionada a outras β -lactamases da classe A, apesar das propriedades bioquímicas serem semelhantes. Essa enzima foi identificada a partir de uma cepa clínica de *P. aeruginosa* isolada em um hospital de Flanders, na Bélgica. Os parâmetros cinéticos de BEL-1 mostraram sua atividade de amplo espectro contra a maioria dos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam, além de baixa suscetibilidade a sulbactam e tazobactam. Conforme é geralmente observado com muitas ESBLs, BEL-1 possui muito baixa afinidade por ceftazidima. Sua atividade é muito bem inibida por ácido clavulânico e em menor escala por moxalactam, sendo também inibida por imipenem (como observado para VEB-1 e GES-1) e por cefoxitina (conforme observado para VEB-1). O gene *bla*_{BEL-1} está na forma de um cassete gênico que faz parte de um integron de classe 1, localizado em um transposon cromossômico (POIREL et al., 2005).

A enzima LBT 802 apresenta um amplo espectro devido à hidrólise de benzilpenicilinas, ampicilina, cefalotina, cefaloridina, cefotaxima, ceftriaxona e cefpiroma, mas não ceftazidima, cefoxitina, imipenem ou aztreonam (REJIBA et al., 2002).

Em 2010, foi detectada *P. aeruginosa* produtora de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) pela primeira vez no Brasil, a partir de isolados multirresistentes (JÁCOME et al., 2012).

3.1.2 Cefalosporinases (AmpC)

Na classe C de Ambler, situa-se a AmpC, uma enzima β -lactamase codificada cromossômicamente, o que ocasiona uma resistência intrínseca a β -lactâmicos (MARTINS, 2005). O mecanismo mais frequentemente responsável pela resistência a cefalosporinas de

terceira geração é a hiperprodução dessa enzima, chamada desrepressão estável (STRATEVA; YORDANOV, 2009). O gene que codifica a AmpC, geralmente, está reprimido. A desrepressão dessa enzima é induzida pela exposição bacteriana a baixas concentrações de antibióticos β -lactâmicos, particularmente, o imipenem (MARTINS, 2005), mas, segundo Clímaco (2011), também por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico. Desse modo, ocorre a produção reversível da enzima. A produção constante de AmpC indica que ocorreu mutação (MARTINS, 2005). Strateva e Yordanov (2009) mencionam que a produção de cefalosporinase cromossômica pode aumentar de 100 a 1000 vezes na presença de indutores β -lactâmicos (especialmente imipenem). Disso decorre que um isolado inicialmente sensível a determinados agentes pode desenvolver resistência a partir do início da terapia, por meio da indução desse tipo de enzima (SPINDLER, 2009).

Em *P. aeruginosa*, esse mecanismo de desrepressão da AmpC cromossomal costuma ser responsável pela resistência aos β -lactâmicos (incluindo cefalosporinas de amplo espectro), com exceção dos carbapenêmicos. Assim, essa enzima é encontrada na maioria dos isolados de *P. aeruginosa* (MARTINS, 2005). Geralmente, a enzima é produzida em baixas quantidades e determina resistência a aminopenicilinas e à maioria das primeiras cefalosporinas. A atividade da AmpC não é inibida por inibidores de β -lactamases usados na prática clínica, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (STRATEVA; YORDANOV, 2009), visto o espectro de resistência, por vezes, alcança, até mesmo, combinações de β -lactâmicos/inibidores de β -lactamases (SPINDLER, 2009). Cabe mencionar que o nível da resistência depende do grau da desrepressão (LIVERMORE, 2002).

A existência de plasmídios transferíveis que podem adquirir genes para enzimas do tipo AmpC torna possível o advento dessa resistência em bactérias que não a possuem ou em bactérias que expressem fracamente o gene cromossômico *bla*_{AmpC} (SPINDLER, 2009), embora cefalosporinases mediadas por plasmídios ainda não tenham sido encontradas em *P. aeruginosa* (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A detecção de enzimas AmpC pode ser mais difícil, e essas podem conferir resistência a uma maior variedade de antimicrobianos do que as ESBLs, além de estarem evoluindo para a hidrólise mais eficaz de cefalosporinas de amplo espectro. A dificuldade de diagnóstico reside no fato de que essas enzimas não podem ser identificadas com testes laboratoriais de rotina, e torna-se difícil identificá-las quando há presença simultânea de outro tipo de enzima (SPINDLER, 2009).

3.1.3 Classe D das β -lactamases

A classe D de β -lactamases abrange ESBLs do tipo OXA-18, OXA-2, OXA-10 (PSE-2), OXA-21, ARI-1 (*Acinetobacter Resistant to Imipenem*). Essas enzimas possuem características variadas e é difícil detectá-las por métodos laboratoriais de rotina (MARTINS, 2005). O grupo é estruturalmente relacionado e exibe uma ótima atividade hidrolítica contra oxacilina e compostos similares (SPINDLER, 2009). As clássicas enzimas OXA (OXA-1, OXA-2, OXA-10) determinam resistência a carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, mas não a ceftazidima. Por isso, oxacilinasas que hidrolisam ceftazidima têm a maior importância clínica. Seu espectro hidrolítico também inclui cefotaxima, cefepima, ceftiproma, aztreonam e moxalactam. Com exceção de OXA-18, que é totalmente inibida por ácido clavulânico e cujas propriedades hidrolíticas se assemelham às das ESBLs da classe A, a atividade dessas enzimas não é suprimida por inibidores de β -lactamases (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A enzima NPS-1, também dessa classe, apresenta atividade contra penicilinas e cefalosporinas e é codificada por um plasmídeo que também confere resistência a estreptomicina e sulfonamida (LIVERMORE; JONES, 1986). Essa enzima é estruturalmente similar à LCR-1, codificada por um transposon e também descoberta na década de 1980 (PAI; JACOBY, 2001).

A maioria das oxacilinasas de espectro estendido é codificada por genes localizados em plasmídios ou integrons, o que contribui para sua disseminação e para a prevalência aumentada de isolados de *P. aeruginosa* produtores de ESBLs de classe D (STRATEVA; YORDANOV, 2009). De fato, várias oxacilinasas (OXA-2, OXA-10 e OXA-18) que possuem perfis de substrato ampliados, incluindo cefalosporinasas de espectro estendido, têm sido reportadas em *P. aeruginosa* (WELDHAGEN; POIREL; NORDMANN, 2003). Assim, a despeito do espectro estreito (aminopenicilinas, carboxipenicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda gerações) apresentado pela maioria das variantes OXA, a crescente importância clínica dessa classe se deve a sua atividade em potencial contra carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro (SPINDLER, 2009). De acordo com Clímaco (2011, p.3), “penicilinasas de classe D de espectro estendido, como a OXA-10 e a OXA-12, têm sido reportadas na Turquia e na França e são específicas de *P. aeruginosa*”. A maior parte dos casos descritos de ESBLs do tipo OXA se restringe a isolados clínicos de *P. aeruginosa* (SPINDLER, 2009).

3.1.4 Metalo- β -lactamases

Enquanto as β -lactamases das famílias A, C e D de Ambler usam um resíduo de serina como nucleófilo para a catálise, as metalo- β -lactamases (M β LS), inseridas na classe B de Ambler e na classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros, utilizam cátions divalentes, geralmente, Zn^{+2} , como cofator para sua atividade catalítica. Outra característica que diferencia as M β LS das serina- β -lactamases é que elas não são inibidas pelos antibióticos suicidas (tazobactam, sulbactam e ácido clavulânico). Além disso, as M β LS possuem atividade contra os carbapenêmicos, não hidrolisam os monobactâmicos, como o aztreonam, e são inibidas por agentes quelantes — isto é, compostos orgânicos que se ligam a íons metálicos (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010) —, como o EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) e o ácido mercaptopropiônico (MARTINS, 2005). Geralmente, as linhagens produtoras de M β LS demonstram resistência a múltiplos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos (imipenem e meropenem) (FUENTEFRÍA, 2009). Clímaco (2011) afirma que a produção metalcarbapenemases é um dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos mais emergentes em *P. aeruginosa*. Ademais, a maioria dos cassetes gênicos que carregam uma M β LS também contém um gene *aacA4* que confere resistência a amicacina, neomicina e estreptomicina (ver Figura 23), da classe dos aminoglicosídeos (FUENTEFRÍA, 2009).

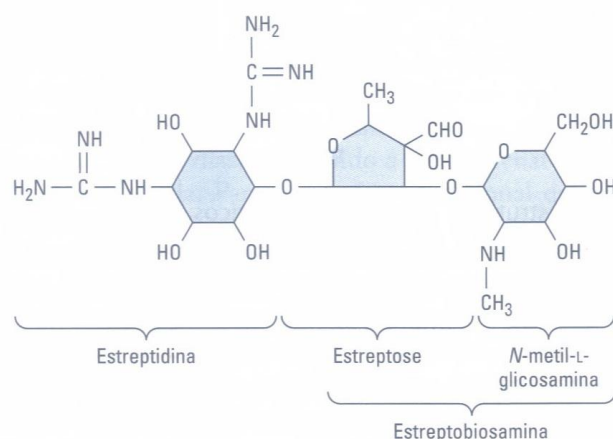


Figura 23 – Fórmula estrutural da estreptomicina.

Fonte: Katzung, 2010, p. 681.

Ainda que a primeira M β L tenha sido descrita como uma enzima dependente de zinco em 1960, somente a partir do início de 1990 uma grande diversidade de novos genes que codificam M β Ls tem sido descrita em patógenos clinicamente importantes, como *P. aeruginosa* (SPINDLER, 2009). Segundo Martins (2005), essas enzimas podem ser de origem cromossômica ou adquiridas, cujos genes são parte de elementos genéticos móveis. Até o momento, são conhecidas seis subclasses de M β Ls adquiridas: IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM (São Paulo Metalo- β -lactamase), GIM (*German Imipenemase*), SIM (*Seoul Imipenemase*) e, mais recentemente, AIM (*Australian Imipenemase*) (FUENTEFRÍA, 2009). A organização dentro dessas subclasses baseia-se, principalmente, na sequência de nucleotídeos dos genes que as codificam e sua localização (cromossômica ou plasmidial), na diferença na sequência de aminoácidos das enzimas e no seu perfil de hidrólise antimicrobiana (SPINDLER, 2009). Em *P. aeruginosa*, já foram identificados os tipos IMP, VIM, SPM e GIM (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

A diversidade de M β Ls tem aumentado nos últimos anos. No Brasil, há descrição de ocorrência de isolados de *P. aeruginosa* carregando genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-16}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-2} (SPINDLER, 2009). Clímaco (2011) sugere que a disseminação de *P. aeruginosa* produtoras dessas enzimas está mais relacionada a clones específicos do que à transferência horizontal de genes, apesar de serem mediados por plasmídios transferíveis. É importante notar que esses isolados foram encontrados quase unicamente no ambiente hospitalar, e as linhagens produtoras de M β Ls têm sido identificadas entre os principais patógenos nosocomiais (FUENTEFRÍA, 2009). As M β Ls têm sido comumente reportadas em surtos de infecção hospitalar em diversos países. Normalmente, isolados produtores de M β Ls demonstram resistência ao imipenem no método de disco difusão. Contudo, a detecção laboratorial da presença de M β Ls é difícil, uma vez que vários mecanismos de resistência podem coexistir (MARTINS, 2005). No cassete gênico, é comum encontrar, juntamente com a M β L, genes codificando resistência, por exemplo, aos compostos quaternários de amônio, biguanidinas e sulfonamidas, além de diversos genes conferindo resistência a aminoglicosídeos (SPINDLER, 2009).

A primeira carbapenemase comprovada em *P. aeruginosa* foi a IMP-1, encontrada no Japão durante um estudo entre 1992 e 1994. Em 2002, a IMP-16 foi encontrada em uma cepa de *P. aeruginosa* no Brasil (STRATEVA; YORDANOV, 2009). As variantes da classe IMP parecem ser mais comuns na Ásia, embora enzimas idênticas ou semelhantes tenham sido encontradas em outras regiões do mundo (SPINDLER, 2009). Atualmente, diferentes micro-

organismos produtores de IMP-1, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *K. pneumoniae*, são observados em diversos países (MARTINS, 2005). Os genes para as enzimas IMP costumam ser encontrados em cassetes gênicos em integrons das classes 1 e 3, no cromossomo ou em plasmídios (SPINDLER, 2009).

Em 1999, em Verona, Itália, foi identificada a VIM-1, a partir de uma amostra de *P. aeruginosa* (MARTINS, 2005). As enzimas VIM assemelham-se às IMPs, considerando suas propriedades hidrolíticas. Ambas hidrolisam rapidamente penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (LIVERMORE, 2002). O gene para VIM-1 é parte de um cassete gênico inserido em um integron de classe 1 que carrega, ainda, um gene de resistência a aminoglicosídeos, *aacA4*. VIM-2, intimamente relacionada à VIM-1, foi originalmente identificada em um isolado de *P. aeruginosa* da corrente sanguínea de um paciente neutropênico, em Marselha, sul da França, e seu gene foi localizado em um plasmídio (STRATEVA; YORDANOV, 2009). As enzimas VIM são de ocorrência mundial, sendo mais prevalentes na Europa e já tendo sido encontradas na Ásia, Estados Unidos da América, Chile, Brasil, Venezuela e Colômbia (SPINDLER, 2009).

Também em 1999, foi detectada, pela primeira vez, a enzima SPM-1 (SPINDLER, 2009), a partir de uma amostra clínica de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (FUENTEFRIA, 2009). Sua sequência de aminoácidos difere consideravelmente das encontradas nos tipos IMP e VIM. Essa diferença confere maior força de ligação e hidrólise dos β -lactâmicos à SPM-1 (SPINDLER, 2009), que se liga a cefalosporinas mais fortemente do que a penicilinas (STRATEVA; YORDANOV, 2009). O gene *bla*_{SPM-1} faz parte de uma ilha de patogenicidade genômica móvel localizada em um plasmídio. Visto que, até o momento, a proteína SPM-1 não foi identificada em nenhum outro micro-organismo, acredita-se que o gene que a codifica esteja especificamente relacionado à *P. aeruginosa* (SPINDLER, 2009). Martins (2005) cita que foi relatada a presença dessa enzima em São Paulo, Bahia, Brasília, Ceará e Paraná. Os isolados produtores de enzimas SPM-1 parecem ser endêmicos e provocar altos índices de mortalidade (NEVES et al., 2011). Clímaco (2011) menciona que, mais recentemente, a enzima SPM foi relatada na Suíça.

Em 2002, a quarta subclasse de M β L adquirida, GIM-1, foi reportada em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* proveniente da Alemanha. Sua sequência de aminoácidos possui baixa identidade com outros genes de M β Ls de importância clínica. Apesar de apresentar um

perfil hidrolítico similar ao de IMP-1, GIM-1 é uma enzima consideravelmente mais fraca. O *bla*_{GIM-1} está situado em um cassete gênico em integrons de classe 1, contido em um plasmídeo, como observado na maior parte dos genes para MβLs (SPINDLER, 2009).

Recentemente, em Florença, Itália, foi encontrada uma nova MβL, denominada FIM-1 (*Florence Imipenemase*), aparentemente, inserida no cromossomo, e com um substrato preferencial de penicilinas e carbapenêmicos (POLLINI et al., 2013).

3.2 BOMBAS DE EFLUXO

Mutações de permeabilidade são amplamente responsáveis por uma maior resistência a β-lactâmicos e fluoroquinolonas, mas muito do que fora atribuído à impermeabilidade celular, atualmente, é compreendido como reflexo da hiperexpressão de efluxo (LIVERMORE, 2002). Além da hidrólise pelas enzimas descritas, muitos antibióticos são excluídos da célula de *P. aeruginosa*. Sistemas ativos de efluxo, que expõem antimicrobianos de dentro da bactéria, promovem a resistência através do aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de diversos agentes, como quinolonas, aminoglicosídeos e β-lactâmicos (MARTINS, 2005). O efluxo ativo é um importante mecanismo não-enzimático de resistência aos β-lactâmicos em *P. aeruginosa* (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Além disso, Soto (2013) menciona que a expressão de bombas de efluxo é um dos mecanismos responsáveis pela resistência antimicrobiana em biofilmes.

A habilidade de bombear antibióticos para fora das células é uma característica comum da maioria dos micro-organismos no meio ambiente e seus familiares patogênicos e é a forma mais comum de resistência à maioria das classes de antibióticos (DAVIES; DAVIES, 2010). Estas bombas exportam, além de antibióticos, biocidas, corantes, detergentes, inibidores metabólicos, solventes orgânicos e moléculas envolvidas na comunicação entre células bacterianas (SCHWEIZER, 2003). Dessa forma, os genes e as proteínas das bombas de efluxo também estão presentes em bactérias sensíveis aos antimicrobianos. Por outro lado, um isolado aparentemente suscetível pode tornar-se resistente ao hiperproduzir um sistema de efluxo quando este é induzido por seu substrato específico (SPINDLER, 2009). Embora genes que codificam bombas de efluxo possam estar presentes em plasmídios, os encontrados no cromossomo são frequentemente relacionados a mecanismos de resistência intrínseca e

capacitam a bactéria a sobreviver em ambientes hostis. A resistência adquirida pode ocorrer devido a mutação e amplificação dos genes que codificam transportadores multidrogas, alterando seu nível de expressão ou atividade; a mutações em genes específicos ou genes regulatórios globais, resultando em uma maior expressão desses transportadores; e transferência de genes, por plasmídios ou transposons, entre bactérias (MOREIRA; SOUZA; MORAES, 2004).

Uma bomba de efluxo pode apresentar especificidade por um determinado substrato ou pode ser capaz de transportar diversas moléculas não relacionadas estruturalmente, até mesmo, antimicrobianos de diferentes classes (SPINDLER, 2009). Nesse último caso, os sistemas são conhecidos como bombas de efluxo multidrogas. Dessa forma, um único sistema de efluxo pode diminuir a suscetibilidade da célula a uma ampla variedade de drogas, o que faz com que esses sistemas representem um dos principais problemas em medicina (MOREIRA; SOUZA; MORAES, 2004).

De acordo com a estrutura, a fonte de energia utilizada e os tipos de moléculas exportadas, os sistemas de efluxo são classificados em seis famílias: *major facilitator superfamily* (MFS), *ATP-binding cassettes* (ABC) *superfamily*, *small multidrug resistance* (SMR) *family*, *resistance-nodulation-division* (RND) *superfamily*, *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) e *drug metabolite transporter* (DMT) *superfamily* (SOTO, 2013). Os sistemas de efluxo de maior relevância clínica em bactérias Gram-negativas são os da família RND. *P. aeruginosa* expressa vários sistemas de efluxo desse tipo. Dentre eles, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY são determinantes significativos para a resistência a diversas drogas em isolados laboratoriais e clínicos (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012). Em *P. aeruginosa*, foram encontrados genes que codificam, pelo menos, 12 sistemas de efluxo (SOARES, 2005), dentre os quais sete foram caracterizados: os quatro já citados, MexJK-OprM, MexHI-OpmD e MexVW (MIMA et al., 2005). Essas bombas são sistemas com três componentes. O primeiro componente é uma proteína localizada na membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF e MexY), que opera como uma bomba dependente de energia com ampla especificidade de substratos. O segundo componente é uma proteína de membrana externa, uma porina (OprM, OprJ e OprN). A terceira proteína (MexA, MexC, MexE e MexX) se localiza no espaço periplasmático e liga as outras duas (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Essa arquitetura tríplice permite a expulsão de componentes diretamente do citoplasma para o meio externo (DEAN et al., 2003). A energia utilizada para o transporte pode ser proveniente da hidrólise de adenosina trifosfato

(ATP) ou do gradiente eletroquímico de prótons (MOREIRA; SOUZA; MORAES, 2004). Ver Figura 24.

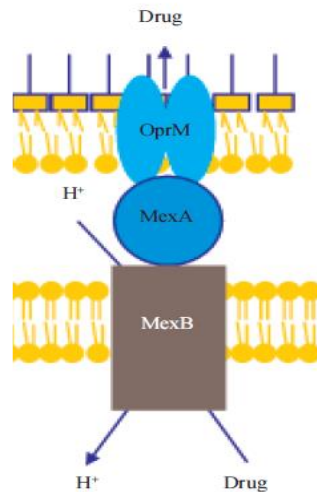


Figura 24 — Estrutura de um sistema de efluxo tipo RND em *P. aeruginosa*.

Fonte: Schweizer, 2003, p. 50.

Em 1993, foi descoberto o primeiro sistema de efluxo multidrogas do tipo RND em *P. aeruginosa*, o MexAB-OprM (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012). Esse sistema MexAB-OprM remove β -lactâmicos, cloranfenicol, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas (por exemplo, sulfametoxazol), tetraciclina e trimetoprim (ver Figura 25), assim como vários corantes e detergentes. MexAB-OprM é o sistema de efluxo mais comum, e sua superexpressão resulta em resistência às quinolonas, penicilinas e cefalosporinas. A sensibilidade ao meropenem também pode ser reduzida (CLÍMACO, 2011). Fuentesfria (2009) cita que esse sistema contribui para a resistência natural de *P. aeruginosa* a inibidores de β -lactamases (como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), além de ser expresso constitutivamente em níveis suficientes para resultar em resistência intrínseca a fluoroquinolonas. A superprodução de MexAB-OprM, geralmente, é resultado da transcrição aumentada do operon *mexA-mexB-oprM*, devido a mutações no gene cromossomal que codifica a proteína repressora MexR (ver Figura 26) (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

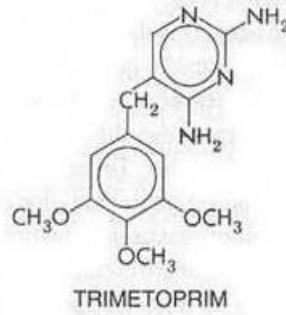


Figura 25 – Fórmula estrutural do trimetoprim.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 881.

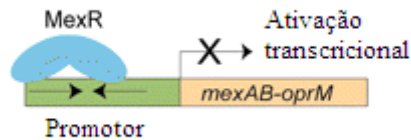


Figura 26 – Sistema de repressão do operon *mexAB-oprM* em *P. aeruginosa*.

Fonte: Traduzido de <<http://www.pnas.org/content/105/36/13586.figures-only>>. Acesso em: 24 nov. 2013

O sistema MexXY, descoberto em 1999, no Japão, é intrigante por ser um determinante significativo de resistência a aminoglicosídeos somente em *P. aeruginosa*, com muitos relatos de isolados clínicos durante a última década (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012). O sistema MexXY-OprM é expresso constitutivamente em cepas de *P. aeruginosa*, o que confere multirresistência intrínseca, caso haja sua indução por concentrações subinibitórias de seus substratos. Se houver um acúmulo de mutações que eleve a atividade desse sistema, pode surgir uma resistência adquirida. MexXY-OprM é capaz de exportar, além dos aminoglicosídeos, tetraciclina (SPINDLER, 2009). Também foi observado que ele participa da resistência a quinolonas, macrolídeos (como a eritromicina), cloranfenicol, lincomicina e a maioria dos β -lactâmicos. Sua especificidade pelo substrato é determinada, quase inteiramente, pelo domínio periplasmático de MexY. Ao contrário dos sistemas já conhecidos, nenhuma sequência codificando o componente da membrana externa, como a OprM, foi encontrada na região do gene *mexY*. Observou-se, no entanto, que esse sistema funciona cooperativamente com OprM em *P. aeruginosa* (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012). As proteínas MexXY podem ser constitutivamente superproduzidas devido a mutações no repressor *mexZ* (STRATEVA; YORDANOV, 2009), o qual controla negativamente a expressão do operon. A regulação positiva da bomba MexXY é considerada

o mecanismo de resistência mais comum e parece ser o principal determinante da resistência a aminoglicosídeos em isolados pulmonares de fibrose cística por *P. aeruginosa*. Mesmo em isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* com fibrose cística ausente, MexXY contribui significativamente para o desenvolvimento da resistência de alto nível aos aminoglicosídeos, via combinação com enzimas modificadoras desses antibióticos (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012).

MexCD-OprJ e MexEF-OprN participam da resistência adquirida ao serem induzidos por alguns substratos (SPINDLER, 2009). O operon *mexC-mexD-oprJ* é superexpresso em *P. aeruginosa* com mutações no gene *nfxB*, que codifica um repressor transcricional do operon. O sistema MexCD-OprJ exporta, principalmente, cefems (cefalosporinas e cefamicinas, antibióticos que apresentam um núcleo cefêmico (MONTECINOS et al., 2001), conforme mostrado na Figura 27) de espectro estendido (cefepima e ceftiroma) da célula bacteriana, além de quinolonas (incluindo as fluoroquinolonas), macrolídeos, tetraciclina e cloranfenicol. Segundo Fraud et al. (2008), a expressão desse sistema é induzida por biocidas catiônicos, o que sugere que ocorre em resposta a danos na membrana. Já o operon *mexE-mexF-oprN* determina resistência a quinolonas, cloranfenicol e trimetoprim, sendo superexpresso em *P. aeruginosa* com mutações no gene *nfxC* (STRATEVA; YORDANOV, 2009). De acordo com Neves et al. (2011), a expressão de MexEF-OprN depende da presença da proteína MexT, que atua como ativadora pós-transcricional. Tem sido descrito, ainda, que a coexpressão desses dois sistemas é responsável pela presença de isolados resistentes a fluoroquinolonas em pacientes com fibrose cística (SOARES, 2005).

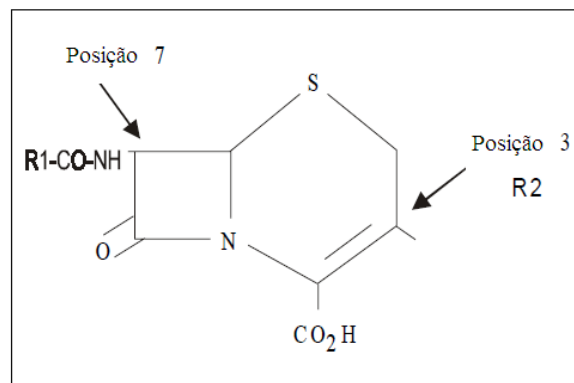


Figura 27 – Núcleo cefêmico.

Fonte: Traduzido de Montecinos et al., 2001, p. 8.

Outro sistema de efluxo, MexJK, foi descrito em mutantes do gene *mexL*, o qual regula a transcrição do gene *mexJK*. Assim como o MexXY, MexJK requer OprM para efluxo de seus substratos, e sua expressão pode ser selecionada pela exposição ao triclosan, bem como a do MexCD-OprJ (CHUANCHUEN; NARASAKI; SCHWEIZER, 2002). O sistema MexVW também parece utilizar a OprM como componente da membrana externa, já que não há gene para tal componente na região do gene *mexW*. O componente de membrana externa pode afetar a especificidade de substrato da bomba de efluxo. Sugeriu-se, por exemplo, que o sistema MexVW-OprM pode expulsar o cloranfenicol, mas MexVW associado a outra proteína de membrana não o faz (LI et al., 2003). Por último, o sistema MexHI-OpmD confere alta resistência a norfloxacino, brometo de etídio, acriflavina e rodamina (AENDEKERK et al., 2005).

Apesar de conferirem um nível de resistência de baixo a moderado, o impacto das bombas de efluxo é de grande importância clínica, pois sua ação pode comprometer a eficiência de antimicrobianos quando suas concentrações são menores que a desejável. Além disso, frequentemente, causam resistência cruzada a antimicrobianos de diferentes classes em bactérias Gram-negativas (SPINDLER, 2009). Dean et al. (2003) afirmam que a ação das bombas de efluxo em *P. aeruginosa* conduz a níveis particularmente elevados de resistência a drogas, como resultado do aparente sinergismo com a impermeabilidade atípica da membrana externa, que limita o influxo dos agentes antimicrobianos.

3.3 PERDA DE PORINAS

Em bactérias Gram-negativas, a penetração de compostos hidrofílicos e a excreção de metabólitos são mediadas por canais proteicos inespecíficos de difusão, as porinas (SOARES, 2005). Além de reduzir a penetração de antibióticos mais hidrofílicos, a membrana externa de *P. aeruginosa* pode conferir permeabilidade diminuída a outros antibióticos, devido à modificação de porinas (VAHABOGLU et al., 2001) (ver Figura 28). A ausência dessas porinas de alta permeabilidade em *P. aeruginosa* confere resistência intrínseca a um grande número de antibióticos (MARTINS, 2005), e sua perda ou expressão reduzida ainda não foi relacionada a elementos de mobilidade genética (SPINDLER, 2009).

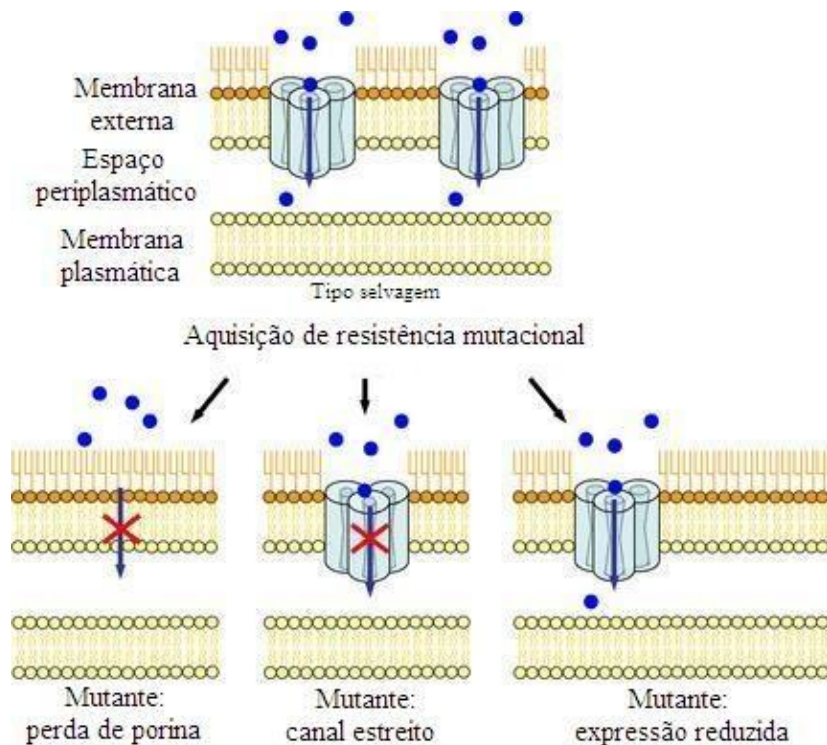


Figura 28 – Exemplos de diferentes mecanismos de resistência associados a porinas.

Fonte: Traduzido de < <http://cmr.asm.org/content/25/4/661/F3.expansion.html>>. Acesso em: 14 dez. 2013.

Os carbapenêmicos são β -lactâmicos de amplo espectro, com eficácia, até mesmo, no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistente. Eles são capazes de permanecer estáveis diante da maioria das β -lactamases, incluindo as ESBLs, e, por isso, são considerados último recurso terapêutico diante de infecções hospitalares causadas por Gram-negativos resistentes aos demais antibióticos (NEVES et al., 2011). O mecanismo de ação dos carbapenêmicos se baseia na inibição das transpeptidases de montagem do peptidoglicano, localizadas na face externa da membrana citoplasmática. Geralmente, esses antibióticos, pequenos e hidrofílicos, são capazes de cruzar a membrana externa da bactéria de forma eficiente, através de canais aquosos formados pelas porinas (OCAMPO-SOSA et al., 2012). A produção de enzimas carbapenemases, principalmente, as M β Ls, é o mecanismo mais grave de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* (FUENTEFRÍA, 2009). Na ausência dessas enzimas, o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos está associado à perda de porinas (MARTINS, 2005).

A principal porina para entrada dos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* é a OprD, cuja inativação por mutações tem sido documentada como causadora de resistência ao imipenem e, em menor escala, ao meropenem e ao doripenem (OCAMPO-SOSA et al., 2012). A OprD é uma porina que forma estreitos canais transmembranares, os quais são acessíveis a carbapenêmicos, mas não a outros β -lactâmicos (LIVERMORE, 2002). Por ser considerada uma porina específica de carbapenêmicos (TOMÁS et al., 2010), pois os outros β -lactâmicos utilizam outras porinas, a perda da OprD levaria a uma resistência maior aos carbapenêmicos (MARTINS, 2005).

A resistência ao imipenem é o principal problema encontrado nas UTIs de hospitais brasileiros, e, ultimamente, os índices de resistência no Brasil têm aumentado de forma alarmante (NEVES et al., 2011). As mutações no gene *oprD*, causadas por inserções ou deleções de nucleotídeos, podem conduzir à inativação da OprD, com perda da porina na membrana externa, que aumenta as CIMs para os carbapenêmicos. Menos frequentemente, a regulação negativa do gene *oprD* pode acontecer em mutantes nos quais MexEF-OprN é superexpresso, mediante o regulador MexT (OCAMPO-SOSA et al., 2012). Além da perda da porina OprD, a reduzida sensibilidade ao imipenem pode resultar da presença de PBPs com baixa afinidade por carbapenêmicos, superexpressão de bombas de efluxo e hidrólise enzimática (NEVES et al., 2011).

A superfamília OprD, cujos membros participam do transporte de aminoácidos e peptídios, da captação de antibióticos e do transporte de fontes de carbono, alberga, também, a porina OprQ. O gene que codifica a OprQ é regulado positivamente em condições de diminuição de ferro e magnésio, e foi observado que sua superexpressão pode aumentar a sensibilidade de *P. aeruginosa* a determinadas classes de antibióticos. A OprQ também parece ter um efeito sobre a produção de piocianina e aparenta ser um importante fator de virulência em infecções por *P. aeruginosa* (ARHIN; BOUCHER, 2010). Já a porina OprE, homóloga à OprD, tem como substratos específicos as cefalosporinas, de forma que sua deficiência prejudica a sensibilidade bacteriana a essa classe de antimicrobianos (SPINDLER, 2009).

Segundo Soares (2005, p. 19), “a principal porina expressa por *P. aeruginosa* é a OprF”, pela qual os substratos se difundem lentamente. Provavelmente, essa é a porina mais utilizada para penetração da maioria dos β -lactâmicos na célula bacteriana (NEVES et al., 2011). A baixa permeabilidade da OprF é o principal fator que aumenta outros tipos de resistência e frequentemente cria uma forte multirresistência em *P. aeruginosa*, devido à sua

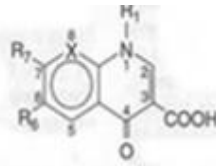
inespecificidade. A OprF serve como um elemento que liga fisicamente a membrana externa e o peptidoglicano, e sua deleção torna a membrana externa instável, produzindo uma morfologia anômala. Embora seja abundante na membrana externa de *P. aeruginosa*, OprF apresenta duas conformações, de modo que somente uma pequena porcentagem são canais abertos. A outra conformação, majoritária, não possui atividade como porina, uma vez que se apresenta como um canal fechado, o que explica a baixa permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* (SUGAWARA; NAGANO; NIKAIDO, 2010). Fito-Boncompte et al. (2011) mencionam que, além de permitir a difusão de espécies iônicas e pequenos nutrientes polares, a OprF é importante para a aderência às células do hospedeiro e está envolvida na formação de biofilmes em condições anaeróbicas. A OprF tem, portanto, emergido como fator de virulência de *P. aeruginosa*, agindo, inclusive, no “quorum sensing” (KRISHNAN; PRASADARAO, 2012).

Conforme já abordado, a OprM funciona com diferentes complexos transportadores em *P. aeruginosa*. Entretanto, sua estrutura contém o domínio de porina fechado nas duas extremidades, de modo que seu estado fundamental não permite a entrada de xenobióticos na célula (PHAN et al., 2010).

3.4 OUTROS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

3.4.1 Resistência a fluoroquinolonas

A grande eficácia das quinolonas (ver Figura 29) contra bastonetes Gram-negativos fez com que essa classe se tornasse a principal escolha para o tratamento de infecções do trato urinário. Esse grupo de antimicrobianos apresenta, também, boa disponibilidade, um bom perfil farmacocinético e baixa ocorrência de efeitos secundários. Sua atividade bactericida se deve à inibição das enzimas DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, fundamentais para a replicação e transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA). Em bactérias Gram-negativas, tais quais *P. aeruginosa*, a DNA girase é o principal alvo das quinolonas (TORTAS, 2009). Dentre essas moléculas, o ciprofloxacino é o agente mais ativo contra *P. aeruginosa* e outros Gram-negativos (KATZUNG, 2010).



CONGÊNERE	R ₁	R ₆	R ₇	X
Ácido nalidíxico	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-N-
Cinoxacino*	-C ₂ H ₅	(Fusão do anel dióxolo) [†]		-CH-
Norfloxacino	-C ₂ H ₅	-F		-CH-
Ciprofloxacino		-F		-CH-
Ofloxacino		-F		-CH-
Esparfloxacino [‡]		-F		
Lomefloxacino	-C ₂ H ₅	-F		
Floxacino	-CH ₂ -CH ₂ -F	-F		
Pefloxacino	-C ₂ H ₅	-F		-CH-
Levofloxacino		-F		
Trovafloxacino		-F		-N-
Gatifloxacino		-F		
Moxifloxacino		-F		

* N substituído C-2 na estrutura de anel básica do cinoxacino.



† Um grupo -NH₂ liga-se ao C-5 na estrutura de anel básica do esparfloxacino.

Figura 29 – Fórmulas estruturais de quinolonas e fluoroquinolonas.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 884.

A introdução das fluoroquinolonas na prática médica, em 1987 (DAVIES; DAVIES, 2010), fez crescer a resistência às quinolonas, principalmente, em *P. aeruginosa* e estafilococos (TORTAS, 2009). À época, especialistas imprudentes previram que a resistência a essa nova classe de inibidores de girase seria improvável, uma vez que, pelo menos, duas mutações seriam necessárias para gerar um fenótipo de resistência significativo. Também foi sugerido que a ocorrência de resistência a fluoroquinolonas horizontalmente transmitida era improvável. Não obstante, mutações nos genes da girase bacteriana, alvo das fluoroquinolonas, e de sistemas de efluxo para esse antimicrobiano proporcionaram o surgimento de um mecanismo transmissível de inativação das fluoroquinolonas (DAVIES; DAVIES, 2010). Atualmente, acredita-se que uma das causas para a emergência de cepas resistentes seja a prescrição indiscriminada dessas drogas em hospitais e ambulatórios (TORTAS, 2009).

Os principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* se baseiam em alterações na DNA girase e/ou na topoisomerase IV, provocadas por mutações cromossômicas nos genes que as codificam, e em mutações nos genes que regulam a expressão dos sistemas de efluxo (TORTAS, 2009). Mutações nas topoisomerasas I e IV conferem resistência a fluoroquinolonas mais facilmente em *P. aeruginosa* do que na família *Enterobacteriaceae*, porque *P. aeruginosa* é intrinsecamente menos suscetível (LIVERMORE, 2002). Há três mecanismos descritos de resistência a quinolonas mediada por genes plasmídicos (PMQR – *plasmid-mediated quinolone resistance*). Um desses genes, *qepA*, codifica uma bomba de efluxo pertencente à MFS (TORTAS, 2009). O segundo mecanismo é uma das muitas aminoglicosídeos-N-acetiltransferases, que tem a capacidade de modificar uma amina secundária nas fluoroquinolonas, conduzindo a uma atividade reduzida. Essa não resulta em um alto nível de resistência, mas pode conferir um baixo nível de tolerância que favorece a seleção de mutações de resistência (DAVIES; DAVIES, 2010). O terceiro mecanismo, a proteína QnrA, faz parte de um grupo de proteínas codificadas por determinantes *qnr* e se liga à DNA girase e à topoisomerase IV, de forma a impedir sua ligação com as quinolonas (TORTAS, 2009). Esse mecanismo é, segundo Davies e Davies (2010), responsável por baixos níveis de resistência às quinolonas.

3.4.2 Resistência a aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são um grupo de agentes bactericidas formados por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas a um núcleo de hexose (GOODMAN; GILMAN, 2005). Eles provocam inibição da síntese proteica, através do bloqueio irreversível das subunidades do ribossomo bacteriano (ver Figura 30). Assim, são ocasionados erros na leitura do código genético bacteriano e a translocação do ácido ribonucleico (RNA) é inibida, o que, geralmente, provoca a morte celular (TORTAS, 2009). Os aminoglicosídeos possuem rápida ação bactericida e são amplamente utilizados. No entanto, a toxicidade desses compostos (principalmente, a nefrotoxicidade e a ototoxicidade) ainda limita sua administração (GOODMAN; GILMAN, 2005).

A resistência aos aminoglicosídeos tem sido descrita como um processo multifatorial, decorrente do somatório de diferentes mecanismos de resistência (CLÍMACO, 2011). Os mecanismos mais comuns de resistência adquirida são a atividade de enzimas modificadoras, sistemas de efluxo ativo e redução da permeabilidade da célula bacteriana (FUENTEFRÍA, 2009). Pode ocorrer, ainda, alteração dos ribossomos por mutação, que reduz sua afinidade para esses antibióticos, e proteção ribossomal (TORTAS, 2009) pela metilação sítio-específica da subunidade 16S do rRNA (RNA ribossômico), realizada por enzimas conhecidas como metilases 16S rRNA (NEVES et al., 2011).

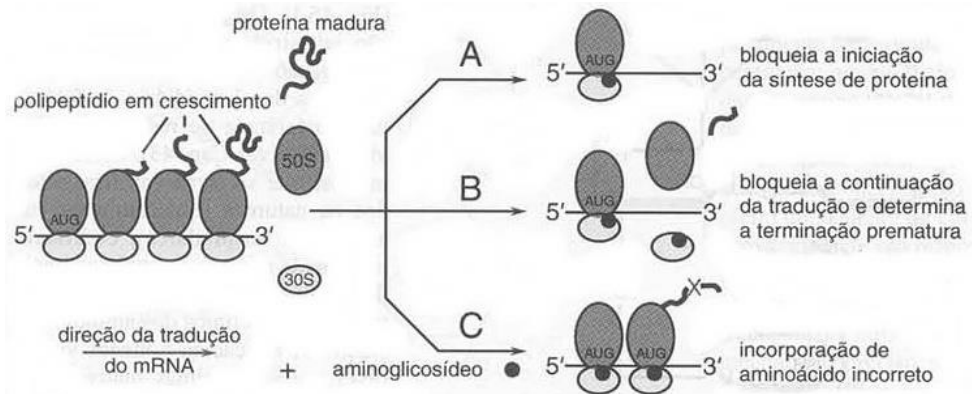


Figura 30 – Mecanismos de ação dos aminoglicosídeos.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 916.

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, que são codificadas por plasmídios, atacam radicais fosfato, adenil ou acetil, reduzindo a afinidade de ligação dos antibióticos modificados a alvos na célula bacteriana, a subunidade ribossomal 30S (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Os aminoglicosídeos são inativados enzimaticamente por reações de fosforilação (através das aminoglicosídeo-fosforiltransferases, APHs), acetilação (por ação

das aminoglicosídeo-acetiltransferases, AACs) e adenilação (por intermédio das aminoglicosídeo-nucleoditiltransferases, ANT) (FUENTEFRÍA, 2009). As enzimas mais frequentemente expressas por *P. aeruginosa* são: AAC(6')-II, que confere resistência a gentamicina, tobramicina e netilmicina; AAC(3)-I, que determina resistência a gentamicina; AAC(3)-II, com o mesmo perfil de resistência da AAC(6')-II; AAC(6')-I, de resistência a tobramicina, netilmicina e amicacina; e ANT(2')-I, que confere resistência a gentamicina e tobramicina (ver Figura 31) (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Além disso, uma aminoglicosídeo-3'-adenililtransferase confere resistência a estreptomicina e espectinomicina (POIREL et al., 2005) (ver Figura 32).

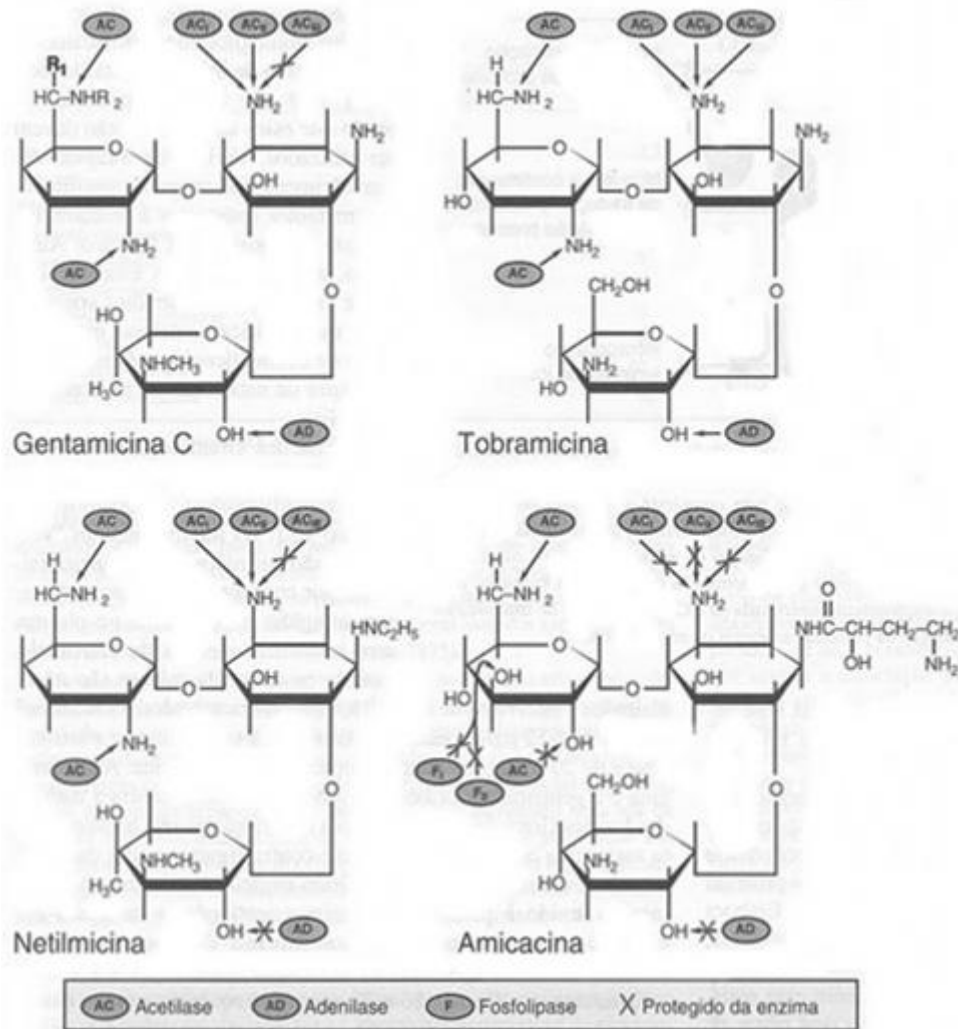


Figura 31 – Aminoglicosídeos e enzimas modificadoras.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 915.



Figura 32 – Fórmula estrutural da espectinomicina.

Fonte: Katzung, 2010, p. 687.

A produção de uma metilase de rRNA 16S recentemente emergiu como um mecanismo de alto nível de resistência a todos os aminoglicosídeos do grupo das desoxiestreptaminas 4,6-dissubstituídas, tais como amicacina, tobramicina e gentamicina. Esses agentes compreendem praticamente todos os aminoglicosídeos formulados parenteralmente em uso clínico, e a presença desse mecanismo pode não ser facilmente detectada nos testes de suscetibilidade de rotina atuais (DOI et al., 2007). Como exemplos de enzimas que realizam a metilação do rRNA 16S, podem ser citadas a metiltransferase ribossomal A (RmtA) e a RmtD (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A coprodução de uma M β L e uma metilase de rRNA 16S pode resultar em um perfil de resistência antimicrobiana extremamente significativo. Todos os genes responsáveis pelas metiltransferases de rRNA 16S foram encontrados associados a transposons ou elementos semelhantes (DOI et al., 2007).

3.4.3 Resistência a polimixinas

As polimixinas (ver Figura 33) são moléculas anfipáticas tensoativas (isto é, apresentam grupos lipofílicos e grupos lipofóbicos) e, por isso, são capazes de interagir com os fosfolipídeos das membranas celulares, desorganizando-as, o que altera a permeabilidade celular. Esse grupo, de atividade restrita às bactérias Gram-negativas (GOODMAN; GILMAN, 2005), consiste em cinco compostos diferentes designados por letras de A a E. Apenas as polimixinas B e E (colistina) são usadas como último recurso na prática clínica, em decorrência de sua elevada toxicidade (TORTAS, 2009). A polimixina B e a colistina são

derivadas, respectivamente, de produtos de *Bacillus polymyxa* e *Bacillus colistinus*. Essas duas moléculas diferem por um único aminoácido (KVITKO, 2010).

A resistência às polimixinas pode ser provocada por mutações que alteram a constituição da membrana externa da bactéria, através de redução de proteínas específicas da membrana externa, redução do conteúdo de íons de magnésio e cálcio e alterações lipídicas (TORTAS, 2009).

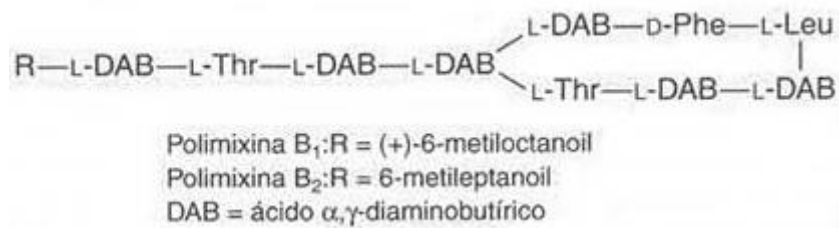


Figura 33 – Estrutura das polimixinas.

Fonte: Goodman; Gilman, 2005, p. 945.

4 INFECÇÃO HOSPITALAR POR *P. aeruginosa*

P. aeruginosa é responsável por 10 a 15% das infecções nosocomiais mundiais (STRATEVA; YORDANOV, 2009) e, juntamente com *Acinetobacter baumannii*, que também é um bastonete Gram-negativo não fermentador, está entre as bactérias mais isoladas atualmente em hemoculturas e amostras do trato respiratório (ANVISA, 2013b). *P. aeruginosa* pode causar um amplo espectro de infecções envolvendo os tratos respiratório, gastrointestinal e urinário, contribuindo para a alta morbidade e mortalidade entre pacientes de UTIs, departamentos oncológicos, unidades de queimados e enfermarias cirúrgicas (KAYABAS et al., 2008). Essa bactéria pode acometer pacientes crônicos, traqueostomizados ou submetidos a ventilação mecânica prolongada, sendo mais frequentemente isolada em pacientes oncológicos e fibrocísticos (BRASIL, 2005). Em UTIs, é frequente em casos de bacteremia e pneumonias, particularmente, em pacientes intubados, nos quais também costuma ser multirresistente e aumenta a mortalidade (VILAR-COMPTE et al., 2003).

A resistência é mais frequente em unidades para o tratamento de pacientes com queimaduras ou fibrose cística, ou em unidades de terapia intensiva. Observa-se, também, que em poucas estirpes concentra-se muita resistência (LIVERMORE, 2002). São fontes de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos: água de torneira, pias, sistemas de encanamento, ralos de chuveiros, torneiras, lavatórios e reprocessadores automatizados para endoscópios (MUSCARELLA, 2004). Através dos ralos e pias de enfermarias hospitalares, são lançados excretas de pacientes e resíduos de antibióticos e outros produtos, de forma que, além de favorecer o desenvolvimento da resistência, a presença de *P. aeruginosa* nesses locais pode contribuir para a ocorrência de infecções. Esse fato inclui como aspecto importante para o controle de infecções hospitalares o destino dos antimicrobianos que devem ser descartados (OLIVEIRA et al., 2011).

O descarte de antibióticos também é problemático fora do ambiente hospitalar, de modo a impactar as localidades onde são lançados seus efluentes. Esses poluentes são recebidos, principalmente, pelas águas dos rios, que, por sua vez, são frequentemente utilizadas, direta ou indiretamente, para consumo humano e animal. *P. aeruginosa* é uma das bactérias mais presentes nos efluentes hospitalares, os quais apresentam uma intensa pressão seletiva decorrente do uso de antimicrobianos nos hospitais. Portanto, a ausência de tratamento dos efluentes hospitalares, aliada às precárias condições de saneamento básico,

pode aumentar a disseminação da resistência em diversos ambientes e expor a comunidade a infecções por micro-organismos com perfil de sensibilidade reduzido (FUENTEFRÍA et al., 2008).

P. aeruginosa é fortemente associada à contaminação do ambiente (GRAS-LE GUEN et al., 2003) e é capaz de permanecer por tempo prolongado em líquidos e superfícies, como antissépticos, alimentação parenteral, equipamentos de terapia de inalação, líquidos de diálise, torneiras de água, entre outros (VILAR-COMPTE et al., 2003). Dentro do ambiente hospitalar, diversos surtos de *P. aeruginosa* têm sido associados a água de torneira contaminada (ROGUES et al., 2007). A ANVISA (2013a) aponta como fontes de infecção hospitalar por *P. aeruginosa* a contaminação de soluções antissépticas, como PVPI (iodopovidona) e clorexidina, circuitos respiratórios, monitores de temperatura, colchões e outros equipamentos que mantenham contato direto com o paciente colonizado ou infectado. Equipamentos médicos, sistemas de água hospitalares, procedimentos de desinfecção inadequados, funcionários do hospital e outros pacientes também são possíveis fontes de infecção por *P. aeruginosa* em hospitais (KAYABAS et al., 2008).

P. aeruginosa pode colonizar o aparelho digestivo de pacientes hospitalizados (OMS, 2003) e é frequente em misturadores de alimentos e vegetais (TRABULSI, 2008). Essa bactéria pode provocar um quadro clínico constituído por diarreia, cólica, náuseas, vômitos e mal-estar, como consequência da ingestão de alimentos contaminados e mal cozidos que foram deixados em condições inadequadas de temperatura por várias horas (OLIVEIRA; ALBUQUERQUE; ROCHA, 1998). Foi relatado um surto de infecção hospitalar por *P. aeruginosa* devido à contaminação do pasteurizador do banco de leite utilizado para alimentar as crianças de uma unidade neonatal, o que ocasionou infecções sintomáticas (septicemia fulminante, falência múltipla de órgãos, deterioração do estado ventilatório e otite média aguda) e colonização gastrointestinal (GRAS-LE GUEN et al., 2003).

Essa bactéria é o principal agente infeccioso em banhos, podendo causar foliculite (geralmente, benigna), otite externa, que pode se tornar grave em condições de diabetes ou imunodeficiência, e infecções de feridas (OMS, 2003). Além disso, é frequente em casos de infecção superficial na prega da unha (paroníquia) (ANVISA, 2013a). Embora a infecção ocular mais comum provocada *P. aeruginosa* seja a ceratite relacionada a lentes de contato, ela também pode causar endoftalmite, a qual já foi associada à contaminação de soluções oftálmicas e a instrumentos ou equipamentos contaminados. Foi documentado um surto de

endoftealmite por *P. aeruginosa* após cirurgia de catarata em um centro oftalmológico brasileiro, mas sua fonte não foi esclarecida. Além disso, houve surtos associados a soluções de irrigação intraocular (GUERRA et al., 2012).

Inúmeros surtos têm sido associados a equipamentos ou produtos médicos defeituosos ou sujos. Foi descrito um grande surto de infecções por *P. aeruginosa* provocado por “swabs” bucais amplamente utilizados pelos serviços de saúde da Noruega. Foram apontados como causas de surtos anteriores loção para as mãos e enxaguatórios bucais misturados localmente (IVERSEN et al., 2007). Até mesmo as vias fluidas de um facoemulsificador, equipamento utilizado em cirurgia de catarata, já foram tidas como fonte de surtos por *P. aeruginosa* (GUERRA et al., 2012).

Embora complicações infecciosas por broncoscopia flexível sejam incomuns, surtos hospitalares relacionados à broncoscopia têm sido relatados, e endoscópios (incluindo broncoscópios) são os dispositivos médicos mais comumente relacionados a esses eventos (SRINIVASAN et al., 2003). Foi documentada uma transmissão de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos a partir de broncoscópios e endoscópios gastrointestinais contaminados utilizados em UTIs e salas de endoscopia. Sugeriu-se que as torneiras de água se tornaram contaminadas e colonizadas por *P. aeruginosa* resistente quando resíduos de copos foram despejados nas pias e espirraram para o alto. Já os endoscópios podem ter sido contaminados quando removidos molhados do reprocessador automatizado, possivelmente durante o manuseio pela equipe. Houve também um surto de bacteremia por *P. aeruginosa* após uma colangiopancreatografia retrógrada endoscópica, na qual se utilizaram endoscópios contaminados após o reprocessamento automatizado (MUSCARELLA, 2004).

P. aeruginosa é um dos agentes mais frequentes em sinusites de origem intra-hospitalar (ANVISA, 2013a) e um dos micro-organismos prevalentes em ambientes internos climatizados. Os sistemas de condicionamento de ar são capazes de albergar agentes etiológicos com a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes secos, o que pode aumentar o risco de infecções em pacientes imunodeprimidos (AFONSO et al., 2004). Em surtos hospitalares de *P. aeruginosa* relacionados a sistemas de ar condicionado, os quais já foram documentados (GUERRA et al., 2012), por exemplo, o indivíduo contamina-se através da via aérea, quando o patógeno é inalado e fica retido no trato respiratório em ambiente propício para seu desenvolvimento (QUADROS, 2008). Os micro-organismos podem ter acesso ao trato respiratório inferior através da aspiração de secreção contendo

agentes microbianos da orofaringe, da cavidade gástrica ou dos seios sinusais, disseminação bacteriana a partir de uma região próxima, dispositivos de terapia respiratória e inalação de aerossóis contaminados, além da passagem de micro-organismos de sítios distantes de infecção para os pulmões através do sangue (KUSAHARA et al., 2012). Oliveira et al. (2007) sugeriram que bactérias responsáveis pela pneumonia nosocomial em pacientes internados em UTIs, como *P. aeruginosa*, podem ser provenientes de seu biofilme bucal. Em infecções do trato respiratório inferior, *P. aeruginosa* pode provocar desde uma colonização assintomática ou traqueobronquite benigna até uma broncopneumonia necrotizante severa (KVIKTO, 2010).

P. aeruginosa sobrevive em água e outros ambientes com requisição de nutrientes, colonizando coleções de água relacionadas ao aparato de ventilação mecânica, o que favorece sua presença no trato respiratório (ANVISA, 2007). Ferimentos no epitélio traqueal podem favorecer a aderência de *P. aeruginosa*, de modo que essa bactéria é comumente encontrada em casos de pneumonia associada à ventilação (IVERSEN et al., 2007). Atinge, portanto, pacientes crônicos, em ventilação mecânica prolongada ou pacientes traqueostomizados (ANVISA, 2005). A cânula traqueal em pacientes traqueostomizados, por exemplo, pode agir como uma rota para que bactérias das vias aéreas superiores colonizem os pulmões. No decorrer da hospitalização em uma unidade de cuidados intensivos, pode haver substituição da microbiota orofaríngea usual por *P. aeruginosa*, o que é comum em pacientes críticos submetidos à ventilação pulmonar mecânica (KUSAHARA et al., 2012).

Essa bactéria é o principal agente etiológico nas pneumonias em pacientes com fibrose cística, o que contribui para sua morbimortalidade (SARGES et al., 2012). O aumento das taxas de mortalidade em pneumonia nosocomial são relacionados à bacteremia, principalmente, por *P. aeruginosa* (ANVISA, 2013a). Estima-se que mais de 90% dos pacientes fibrocísticos adultos sejam infectados por *P. aeruginosa* (MILAGRES et al., 2008), sendo frequentemente isolada no escarro, com maior prevalência quanto maior a idade. A fibrose cística é um distúrbio provocado por mutações no gene responsável pela produção de uma proteína que regula o canal de cloro das células, o que ocasiona a produção de um muco espesso que gera doença obstrutiva crônica nos pulmões e em alguns outros órgãos (SARGES et al., 2012). Na fibrose cística, há um comprometimento das glândulas exócrinas a nível sistêmico, e a doença pulmonar o principal foco de manifestação na maioria dos pacientes. Nesse casos, a infecção por *P. aeruginosa* agrava a deterioração do pulmão e, em crianças, ocasiona uma redução da expectativa de vida em, aproximadamente, 10 anos, em comparação àquelas não infectadas por esse patógeno (MILAGRES et al., 2008).

P. aeruginosa também é um dos principais micro-organismos responsáveis por infecções de sítio cirúrgico, um tipo de infecção hospitalar causado pela exposição do paciente durante a cirurgia e cuja principal causa é a contaminação bacteriológica por via aérea (QUADROS, 2008). Foi descrito um surto de infecção de sítio cirúrgico por *P. aeruginosa* em pacientes que passaram por mastectomia, considerada uma cirurgia limpa (surto por *P. aeruginosa* são incomuns nesse tipo de cirurgia). A cepa responsável pelos casos foi isolada das narinas de uma enfermeira e de gazes que ela manipulava, tendo sido sugerido que a contaminação ocorreu a partir das mãos da própria enfermeira. Foram observadas, ainda, diversas falhas nos procedimentos realizados pela equipe do hospital (VILAR-COMPTE et al., 2003).

P. aeruginosa comumente é responsável por colonizações de queimadura (KVIKTO, 2010), as quais podem se originar tanto da microbiota preexistente à lesão quanto do meio ambiente (BLACK, 2002). O ambiente inanimado de unidades de queimados tende a ser mais fortemente contaminado do que o das demais unidades. Assim, salas de hidroterapia associadas a unidades de queimados têm uma taxa de contaminação particularmente elevada (GRAS-LE GUEN et al., 2003). À colonização de queimaduras por *P. aeruginosa* seguem-se danos vasculares localizados, necrose do tecido e bacteremia. A bacteremia causada por *P. aeruginosa* se caracteriza por um estado febril, ou hipotermia em pacientes graves. A maioria dessas bacteremias tem origem em infecções do trato respiratório inferior, trato urinário, pele e tecidos moles (como infecções de queimaduras). Além de queimaduras extensas, são fatores de risco para a aquisição de bacteremia por *P. aeruginosa* neutropenia, diabetes mellitus e doenças hematológicas malignas (KVIKTO, 2010). Frequentemente, é a bacteremia por micro-organismos como *P. aeruginosa* que provoca a morte de pacientes queimados (BLACK, 2002).

Em infecções do trato urinário (ITUs), *P. aeruginosa* apresenta tendência à produção de aderência e obstrução do cateter (OLIVEIRA; ALBUQUERQUE; ROCHA, 1998). *P. aeruginosa*, geralmente, afeta o trato urinário por infecção ascendente e se adere fortemente ao epitélio da bexiga. Uma ITU nosocomial resulta, normalmente, de intervenções cirúrgicas ou instrumentação do trato urinário envolvendo a próstata e a bexiga urinária (KAYABAS et al., 2008). Além de ser uma das infecções mais frequentes na população adulta, a maioria dos casos de ITUs ocorre em pacientes submetidos a cateterismo vesical (MOURA, 2007). Assim, caso um grupo de casos seja detectado, deve-se suspeitar de uma fonte comum provavelmente associada à instrumentação urológica (KAYABAS et al., 2008). Apesar do agente etiológico

mais comum em ITUs ser *Escherichia coli* (SOARES; NISHI; WAGNER, 2006), a *P. aeruginosa* pode provocar uma ITU do tipo complicada, com quadro clínico associado a doença leve, ausência de náuseas e vômitos ou, até mesmo, com doença severa e possibilidade de sepse (OLIVEIRA; ALBUQUERQUE; ROCHA, 1998). Em casos menos frequentes, pode, ainda, causar prostatite, a qual pode ser assintomática ou provocar febre, calafrios e dor lombar. No contexto hospitalar, pode provocar cistite e pielonefrite (infecção nos rins), ocasionando dificuldade para urinar (disúria) (ANVISA, 2013a).

P. aeruginosa pode estar presente na osteomielite (processo infeccioso do tecido ósseo) hematogênica, sendo associada ao quadro pós-operatório de fixação de fraturas e colocação de próteses e a usuários de drogas endovenosas e pacientes que realizam hemodiálise crônica (ANVISA, 2013a). No procedimento de hemodiálise, pode haver contaminação através de solução de diálise contaminada (VILAR-COMPTE et al., 2003), vazamento ou entupimento nos tubos, bomba contaminada e cateteres vazando ou contaminados (BLACK, 2002). Foi descrita uma infecção de corrente sanguínea por *P. aeruginosa* multirresistente que acometeu pacientes imunocomprometidos na UTI de uma clínica hematológica na África do Sul. Em geral, infecções sanguíneas por *P. aeruginosa* resultam principalmente de fontes endógenas. Contudo, a similaridade entre as cepas isoladas sugeriu uma fonte exógena comum, que não foi identificada. Apesar disso, sugeriu-se que a fraca adesão às práticas de controle de infecções possa ter facilitado a transmissão da bactéria (MUDAU, 2013).

Embora já tenham sido descritos surtos de *P. aeruginosa* relacionados a reservatórios pessoais e ambientais, bem como a contaminação cruzada dentro de hospitais (IVERSEN et al., 2007), não é frequente que a equipe hospitalar seja um reservatório de *P. aeruginosa*. Somente funcionários que atendem pacientes hospitalizados altamente contaminados, por exemplo, queimados, podem ser colonizados no nariz, na faringe e na pele (VILAR-COMPTE et al., 2003). A transmissão entre pessoas acontece raramente (OLIVEIRA et al., 2011). Por outro lado, a transmissão de *P. aeruginosa* através das mãos da equipe da saúde é tida como um mecanismo frequente de transmissão em um surto, de forma que a contaminação cruzada, até mesmo em condições habituais, sugere um baixo apego às medidas de controle de infecções (VILAR-COMPTE et al., 2003).

As quatro infecções nosocomiais mais comuns são as infecções urinárias, as infecções de feridas cirúrgicas, a pneumonia e a infecção sanguínea primária (OMS, 2003). Conforme

apresentado, *P. aeruginosa* pode ser o agente etiológico dessas infecções, de forma que algumas medidas gerais para prevenção das mesmas podem incluí-la (ver Tabela 2).

Tabela 2 — Medidas de Prevenção das Infecções Nosocomiais

Infecção	Medidas de eficácia comprovada
Infecções urinárias	Limitação do período de uso da sonda Técnica asséptica na inserção Manutenção do tubo de drenagem fechado
Infecções de feridas cirúrgicas	Técnica cirúrgica. Limpeza do ambiente da sala de cirurgia. Roupa pessoal. Limitação da estadia pré-operatória no hospital. Banho pré-operatório e preparação da pele local do paciente. Profilaxia ideal com antibióticos. Prática asséptica na sala de cirurgia. Vigilância da ferida cirúrgica.
Pneumonia	Relacionada ao uso de respirador. Intubação e sucção assépticas. Limitação do período de uso do respirador. Respiração mecânica não invasiva. Outros. Vacinação da equipe contra Influenza. Normas sobre isolamento. Água estéril para o tratamento com oxigênio e aerossol. Prevenção da infecção por <i>Legionella</i> e <i>Aspergillus</i> durante qualquer renovação.
Infecções relacionadas ao uso de dispositivos vasculares	Todos os cateteres. Sistema fechado. Limitação do período de uso. Preparação da pele local. Técnica asséptica na inserção. Retirada caso haja suspeita de infecção. Cateteres centrais. Assepsia cirúrgica para inserção. Limitação da frequência da troca de curativos. Cateter com revestimento antibiótico para uso a curto prazo.

Fonte: Traduzido de OMS, 2003, p. 38.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *P. aeruginosa*

Inicialmente, é necessário realizar a coleta adequada do material de onde se suspeita haver infecção por *P. aeruginosa*. Em laboratório, as colônias são isoladas em cultura pura, após 24-72 horas de crescimento nos meios de cultura (ver Figura 34) e isolamento primário.

É importante que se observe se a colônia isolada apresentou pigmentação (amarela, rósea ou de cor metálica). Então, semeia-se somente uma dessas colônias nos meios TSI (tríplice açúcar ferro), TSA (tripticase soja agar) e TSB (tripticase soja caldo) e incuba-se a 30° C por 16-24 horas (ANVISA, 2013b). No meio TSI, *P. aeruginosa* provoca uma mudança na coloração do meio, de vermelho alaranjado (pH neutro) para púrpura (pH alcalino), na superfície e na base, e produz sulfato de hidrogênio, com a formação de um precipitado negro na base do tubo (ANVISA, 2004). Por ser móvel por um flagelo polar, *P. aeruginosa* cruza o campo em diferentes direções ou gira em torno de si mesma na lâmina feita a partir de uma gota do caldo TSB, utilizando-se o aumento de 400x a 37° e 20°C. Realizam-se, também, a coloração de Gram, onde observa-se, ainda, a morfologia bacilar de *P. aeruginosa*; e a prova de oxidase, na qual exibe cor púrpura quando em contato com o reativo de oxidase, uma vez que é oxidase positiva. O crescimento de *P. aeruginosa* também é observado quando semeada em placa com Ágar MacConkey e incubada a 30° C por 24-72 horas (ANVISA, 2013b).

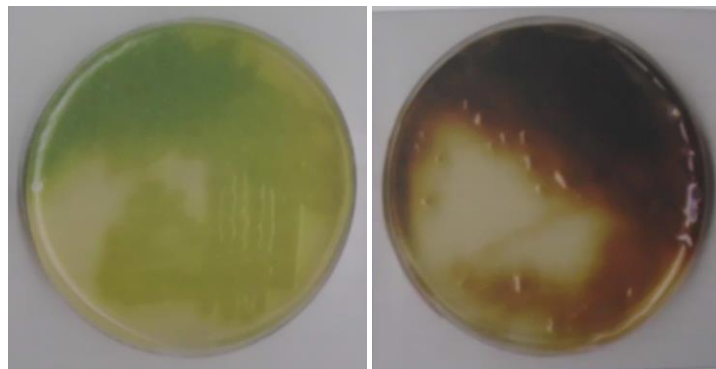


Figura 34 – Cultura de *P. aeruginosa* em ágar Mueller-Hinton. Coloração verde-azulada conferida pela pioverdina e pela piocianina, à esquerda, e marrom, pela piomelanina, à direita.

Fonte: Trabulsi, 2008, p. 370.

Após essa triagem inicial, realiza-se a identificação bioquímica a partir do crescimento no tubo de TSA utilizado para a prova de oxidase. Caso necessário, pode-se semear em mais de um tubo de TSA, a fim de obter maior massa bacteriana. Prepara-se, então, uma suspensão bacteriana em salina a 0,85%, correspondente à escala 0,5-1,0 da escala McFarland. No tubo de OF glicose com vaselina, *P. aeruginosa* fica verde e, no sem vaselina, amarelo. Pode acontecer de o tubo não mudar de cor (inerte). Isso ocorre porque *P. aeruginosa* pode oxidar ou apresentar-se inerte quanto à glicose. O tubo com lisina para *P. aeruginosa*, que apresenta resultado negativo, fica com uma coloração azul esverdeado pálido. Com o disco de PYR, *P. aeruginosa* pode apresentar resultado positivo (cor alaranjada) ou negativo (cor amarela).

No tubo com ágar esculina, *P. aeruginosa* confere uma prova negativa, observada através da cor castanho-escuro, gerada pela produção de pigmentos. Para o tubo pedaço de filme com gelatina, *P. aeruginosa* é 82% positiva, o que significa que, após a incubação a 30°C, é formado um precipitado cinza ao fundo do tubo. No tubo com NaCl 6%, *P. aeruginosa* apresenta comportamento variável, podendo haver crescimento, o qual é indicado pela turbidez ou mudança de cor. No tubo com arginina, *P. aeruginosa* fica púrpura, indicando a prova positiva. *P. aeruginosa* cresce em caldo TSB a 42°C e 44°C, de modo que o meio se apresenta turvo ou é nítido o aumento da densidade bacteriana. Para o disco de polimixina, é formado um halo de inibição, já que *P. aeruginosa* possui sensibilidade a esse antimicrobiano (ANVISA, 2013b). As etapas desse processo de identificação, conforme a descrição da ANVISA (2013b, 2004), estão esquematizadas na Ilustração 2.

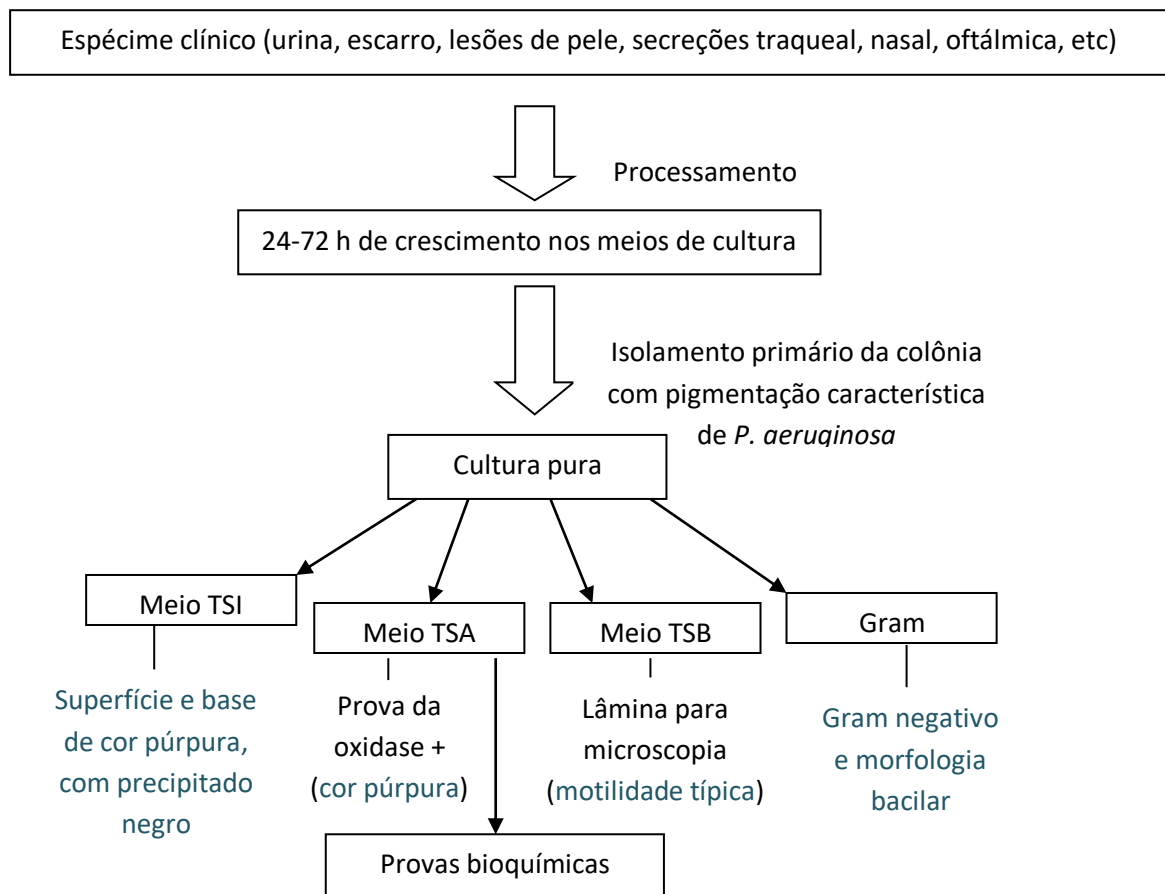


Ilustração 2 – Fluxograma das etapas da identificação laboratorial de *P. aeruginosa* segundo a ANVISA (2013b, 2004).

Fonte: O autor.

A principal diferenciação em relação à família *Enterobacteriaceae* é a produção da enzima citocromo oxidase, sendo a prova da oxidase uma das mais importantes para a identificação de *P. aeruginosa*. O crescimento a 42 °C e a oxidação de outros açúcares podem ser aplicados para sua distinção frente às demais espécies do gênero (KVITKO, 2010). A coloração de flagelos é uma prova complementar muito útil para a identificação de *P. aeruginosa* não produtora de pigmentos, pois permite a visualização de um flagelo polar (ANVISA, 2013b). As colônias de *P. aeruginosa* em meios de cultura apresentam um aroma adocicado característico da espécie, semelhante ao odor de uva (ZAVASCKI, 2003), devido à produção de trimetilamina (KVITKO, 2010). As provas bioquímicas utilizadas para a identificação dessa espécie podem ser realizadas através de métodos automatizados (ZAVASCKI, 2003).

Além da observação de características fenotípicas, os isolados bacterianos podem ser identificados através de métodos genotípicos, que possuem especificidade e reprodutibilidade maiores. Tais métodos, como RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), identificam os organismos a partir de suas sequências genômicas e permitem sua classificação ao nível de cepa. Em um surto hospitalar, o estabelecimento da relação entre as cepas isoladas é fundamental para a investigação das fontes de transmissão e, conseqüentemente, para a adoção de medidas de controle adequadas (TORTAS, 2009).

5 CONCLUSÃO

As infecções por *P. aeruginosa* representam um alto risco para pacientes hospitalizados, principalmente, em se tratando de cepas multirresistentes. O tratamento desses pacientes depende do perfil de suscetibilidade da cepa em questão, a qual deve ser adequadamente investigada, após isolamento e identificação do agente etiológico dessas infecções, através do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A seguir, deve ser realizada a antibioticoterapia apropriada, a partir dos antimicrobianos prescritos, em um esquema eficaz e durante o período de tempo necessário, de modo a debelar a infecção e conter o desenvolvimento de resistência.

Minimizar os riscos da aquisição de infecções hospitalares por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes depende tanto das práticas de controle de infecções no ambiente hospitalar quanto do uso criterioso dos antimicrobianos. A implementação de medidas de controle de infecção hospitalar capazes de diminuir sua transmissão (como a correta e frequente lavagem das mãos, por exemplo) é uma das vias essenciais para o controle da resistência microbiana e para a redução das taxas de mortalidade por infecções nosocomiais provocadas por *P. aeruginosa* e por demais patógenos hospitalares.

A necessidade de controlar a transmissão de infecções hospitalares valoriza ainda mais a postura dos profissionais de saúde diante da assistência aos pacientes. No trato com os imunocomprometidos (neutropênicos, fibrocísticos e queimados, por exemplo), a prudência deve ser a máxima possível, dado que apresentam maior vulnerabilidade a infecções oportunistas, inclusive, às provocadas por *P. aeruginosa*. Considerando que, no ambiente hospitalar, a frequência de micro-organismos resistentes a antibióticos é maior, é imprescindível recorrer às práticas de prevenção dessas infecções. Dentro do Sistema Único de Saúde, em que, muitas vezes, os recursos são limitados, essas medidas tornam-se urgentes. Portanto, a conduta adequada dos profissionais de saúde é de suprema importância para a recuperação dos pacientes hospitalizados e, como questão de saúde pública, deve ser objeto de discussão e aperfeiçoamento.

REFERÊNCIAS

- AENDEKERK, S. et al. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. **Microbiology**. London, v. 151, pt. 4, p. 1113-1125, Apr. 2005.
- AFONSO, M. S. M. et al. A qualidade do ar em ambientes hospitalares climatizados e sua influência na ocorrência de infecções. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. Goiânia, v. 6, n. 2, p. 181-188, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/reniss/manual%20_controle_bacterias.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2013.
- _____. **Investigação e controle de epidemias (surtos) hospitalares**. 2004a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/iras/M%F3dulo%203%20-%20Investiga%20e%20Controle%20de%20Surtos%20Hospitalares.pdf>>. Acesso em: 7 jun. 2013.
- _____. **Legislação e criação de um programa de prevenção e controle de infecção hospitalar**. São Paulo, 2004b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/iras/M%F3dulo%201%20-%20Legisla%20e%20Programa%20de%20Preven%20e%20Controle%20de%20Infec%20Hospitalar.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2013.
- _____. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo III: principais síndromes infecciosas**. 2013a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d416b5004e257138b072b3c09d49251b/M%203%20-%20Manual%20de%20Microbiologia%20Cl%C3%A9nica%20para%20o%20Controle%20de%20Infec%C3%A7%C3%A3o%20relacionada%20%C3%A0%20Assist%C3%ADncia%20%C3%A0%20Sa%C3%ADde%20-%20M%C3%ADdulo%20III%20-%20Principais%20S%C3%ADndromes%20Infecciosas..pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 7 jun. 2013.
- _____. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 3: principais síndromes infecciosas. Módulo IV: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf>. Acesso em: 22 set. 2013.
- _____. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo VI: detecção e identificação de bactérias de importância médica**. 2013b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1d5166804e2574a3b08db3c09d49251b/6+%20-%20Manual%20de%20Microbiologia%20Cl%C3%A9nica%20para%20o%20Controle%20de%20Infec%C3%A7%C3%A3o%20relacionada%20%C3%A0%20Assist%C3%ADncia%20%C3%A0%20Sa%C3%ADde%20-%20M%C3%ADdulo%20VI%20-%20Detec%C3%A7%C3%A3o%20e%20Identifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20Bact%C3%A9rias%20de%20Import%C3%A2ncia%20M%C3%A9dica..pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 mai. 2013.
- _____. **Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por micro-organismos multirresistentes**. 2010. Disponível em:

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/nota_tecnica2_IH.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2013.

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 23-24, 286-289, 1426-1429, 1440-1441, 1450-1455.

ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L. S. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. **Medicina**. Ribeirão Preto, v. 32, p. 492-497, out./dez. 1999.

ARHIN, A.; BOUCHER, C. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. **Microbiology**. Reading, v. 156, pt. 5, p. 1415-1423, May. 2010.

AZAMBUJA, E. P.; PIRES, D. P.; VAZ, M. R. C. Prevenção e controle da infecção hospitalar: as interfaces com o processo de formação do trabalhador. **Texto e Contexto Enfermagem**. Florianópolis, v. 13, p. 79-86, 2004.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 2010. 196 p.

BARON, S. (Ed.). **Medical microbiology**. 4th. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. cap. 27. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>>. Acesso em: 9 nov. 2012.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: “uma resposta aos microorganismos”. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, nov./dez. 2002.

BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 330-338, 342, 345, 376-383, 389-397, 495.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consenso racional sobre o uso de antimicrobianos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 36 p.

_____. **Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 116 p.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas Histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. p. 111.

CHALÉON, J. **Farmácia: terapêutica medicamentosa**. Tradução de Dália Gutemberg. 4. ed. São Paulo: Andrei, 1988. p. 57-86.

CHERRY, M. G. et al. Features of educational interventions that lead to compliance with hand hygiene in healthcare professionals within a hospital care setting. A BEME systematic review: BEME Guide No. 22. **Medical Teacher**. London, v. 34, n. 6, p. 406-420, 2012.

CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C. T.; SCHWEIZER, H. P. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 184, n. 18, p. 5036-5044, Sep. 2002.

CLÍMACO, E. C. **Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.** 76 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G. **Guia prático de controle de infecção hospitalar.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 167, 234, 239.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** Washington, v. 74, n. 3, p. 417-433, Sep. 2010.

DEAN, C. R. et al. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Washington, v. 47, n. 3, p. 972-978, Mar. 2003.

DOI, Y. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Washington, v. 51, n. 3, p. 852-856, Mar. 2007.

FERRAREZE, M. V. G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem.** São Paulo, v. 20, n. 1, p. 7-11, jan./mar. 2007.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia.** Foz do Iguaçu, v. 12, n. 2, p. 44-50, jan. 2010.

FITO-BONCOMPTE, L. et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. **Infection and Immunity.** Washington, v. 79, n. 3, p. 1176-1186, Mar. 2011.

FRASER, T. G. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* cholangitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: failure of routine endoscope cultures to prevent an outbreak. **Infection Control and Hospital Epidemiology.** Chicago, v. 25, n. 10, p. 856-859, Oct. 2004.

FRAUD, S. et al. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Washington, v. 52, n. 12, p. 4478-4472, Dec. 2008.

FUENTEFRÍA, D. B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Uberaba, v. 41, n. 5, p. 470-473, set./out. 2008.

FUENTEFRÍA, D. B. **Detecção de metalo β -lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial.** 169 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 859-1033.

GRAS-LE GUEN, C. et al. Contamination of a milk bank pasteuriser causing a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**. London, v. 88, n. 5, p. F343-F345, Sep. 2003.

GUARNERI, R. **Estudo de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e produtores de metalo- β -lactamases**. 174 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

GUERRA, R. L. L. et al. An outbreak of forty five cases of *Pseudomonas aeruginosa* acute endophthalmitis after phacoemulsification. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. São Paulo, v. 75, n. 5, p. 344-347, Sep./Oct. 2012.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Editora Manole, 1999. p. 1330.

HERITAGE, J. et al. Evolution and spread of SHV extended spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. London, v. 44, n. 3, p. 309-318, Sep. 1999.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 39, n. 18, p. 1182-1189, Oct. 2004.

IVERSEN, B. G. et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated mouth swabs. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 44, n. 6, p. 794-801, 2007.

JÁCOME, P. R. L. A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 56, n. 9, p. 4990, Sep. 2012.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10 ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 654-666, 671-677, 681-687, 691-694, 743, 747.

KAYABAS, U. et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: a pulsed-field gel electrophoresis-based epidemiologic study. **American Journal of Infection Control**. Saint Louis, v. 36, n. 1, p. 33-38, Feb. 2008.

KRISHNAN, S.; PRASADARAO, N. V. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. **The FEBS Journal**. Oxford, v. 279, n. 6, p. 919-931, Mar. 2012.

KUSAHARA, D. M. et al. Colonização e translocação bacteriana orofaríngea, gástrica e traqueal em crianças submetidas à ventilação pulmonar mecânica. **Acta Paulista de Enfermagem**. São Paulo, v. 25, n. 3, p. 393-400, 2012.

- KVITKO, C. H. C. **Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa***. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- LI, Y. et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London, v. 52, n. 4, p. 572-575, Oct. 2003.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. J. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 22, n. 4, p. 582-610, Oct. 2009.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 34, n. 5, p. 634-640, Mar. 2002.
- LIVERMORE, D. M.; JONES, C. S. Characterization of NPS-1, a novel plasmid-mediated beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 29, n. 1, p. 99-103, Jan. 1986.
- LLOYD, D. H. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. **Clinical Infectious Diseases**. Washington, v. 45, n. 2, p. S148-S152, 2007.
- LO, D. S. et al. Infecção urinária em menores de 15 anos: etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana em hospital geral de pediatria. **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo, v. 28, n. 4, p. 299-303, oct./dec. 2010.
- LOPES, H. V. O tratamento das infecções graves por *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Panamericana de Infectologia**. São Paulo, v. 11, n. 3, p. 74-76, set. 2009.
- MACIEL, C. C. S.; CÂNDIDO, H. R. L. F. Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas. **VEREDAS FAVIP Revista Eletrônica de Ciências**. Recife, v. 3, n. 1, p. 33-43, jan./jun. 2010.
- MARTINS, A. F. **Caracterização de metalo- β -lactamases produzidas por amostras de *P. aeruginosa* isoladas em dois hospitais de Porto Alegre**. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- MILAGRES, L. et al. Infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística: diagnóstico sorológico e conduta. **Pediatria (São Paulo)**. São Paulo, v. 30, n. 1, p. 56-65, 2008.
- MIMA, T. et al. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Immunology**. Tokyo, v. 49, n. 11, p. 999-1002, 2005.

MONTECINOS, S. M. et al. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. **Revista Chilena de Infectología**. Santiago, v. 18, n. 1, p. 7-19, 2001.

MOREIRA, M. A. S.; SOUZA E. C.; MORAES, C. A. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.35, n.1-2, p.19-28, Jan-June. 2004.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**. Lausanne, v. 3, n.408, Nov. 2012.

MOURA, M. E. B. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**. Brasília, v. 60, n. 4, p. 416-421, jul./ago. 2007.

MUDAU, M. et al. Outbreak of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection in the haematology unit of a South African Academic Hospital. **Public Library of Science one**. San Francisco, v. 8, n. 3, p. 1-7, Mar. 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. 5. ed. Madrid: Elsevier, 2006, p. 357-364.

MUSCARELLA, L. F. Contribution of tap water and environmental surfaces to nosocomial transmission of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. Chicago, v. 25, n. 4, p. 342-345, Apr. 2004.

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

NÓBREGA, M. S. **Evolução da resistência e aspectos microbiológicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2011.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009. cap. 3.

NOUÉR, S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente**. 144 p. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

NOUJAIM, J. K. et al. Otite externa maligna por *Pseudomonas aeruginosa*: relato de três casos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. São Paulo, v. 43, n. 4, Dec. 1985.

OCAMPO-SOSA, A. A. et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and –susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a

Spanish multicenter study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 56, n. 4, p. 1703-1713, Apr. 2012.

OLIVEIRA, A. C. **Análise genômica e suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de rede de água de consultórios odontológicos da cidade de Barretos-SP**. 39 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; ALBUQUERQUE, C. P.; ROCHA, L. C. M. **Infecções hospitalares: abordagem, prevenção e controle**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998. cap. 5, 19,22.

OLIVEIRA, C. et al. Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de ralos e pias de enfermarias hospitalares em Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 192-196, 2011.

OLIVEIRA, L. C. B. S. et al. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. São Paulo, v.19, n. 4, p. 428-433, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos**. 2001. Disponível em: <http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf>. Acesso em: 31 mai. 2013.

_____. **Prevención de las infecciones nosocomiales**. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf>. Acesso em: 31 mai. 2013.

PAI, H.; JACOBY, G. A. Sequences of the NPS-1 and TLE-1 β -lactamase genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 45, n. 10, p. 2947-2948, Oct. 2001.

PHAN, G. et al. Structural and dynamical insights into the opening mechanism of *P. aeruginosa* OprM channel. **Structure**. London, v. 18, n. 4, p. 507-517, Mar. 2010.

POIREL, L. et al. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 49, n. 9, p. 3743-3748, Sep. 2005.

POLLINI, S. et al. FIM-1, a new acquired metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 57, n. 1, p. 410-416, Jan. 2013.

QUADROS, M. E. **Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 134 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

REJIBA, S. et al. Biochemical characterization of a novel extended spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* 802. **Microbial Drug Resistance**. New York, v. 8, n. 1, p. 9-13, Mar. 2002.

- RIBEIRO, L. et al. Uma visão da abordagem da neutropenia. **Nascer e Crescer**. Porto, v. 20, n. 4, p. 255-261, 2011.
- ROGUES, A. M. et al. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. **The Journal of Hospital Infection**. London, v. 67, n. 1, p. 72-78, Sep. 2007.
- ROSSI, A. C. R. **Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- SANSCHAGRIN, F.; BEJAOU, N.; LEVESQUE, R. C. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 42, n. 8, p. 1966-1972, Aug. 1998.
- SANTOS, A. A. M. **O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares: após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos?** 135 p. Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e Contexto Enfermagem**. Florianópolis, v. 13, n. esp, p. 64-70, fev. 2004.
- SARGES, E. S. N. F. et al. Colonização por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística na região amazônica: efeitos na função respiratória. **Revista Paraense de Medicina**. Belém, v. 26, n. 1, jan./mar. 2012.
- SCHWEIZER, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, v. 2, n. 1, p. 48-62, Mar. 2003.
- SHIBATA, N. et al. PCR Classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated Gram-negative bacilli in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 50, n. 2, p. 791-795, Feb. 2006.
- SOARES, L. A.; NISHI, C. Y. M.; WAGNER, H. L. Isolamento das bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**. Rio de Janeiro, v. 2, n. 6, p. 84-92, jul./set. 2006.
- SOARES, M. C. S. T. **Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.
- SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**. Austin, v. 4, n.3, p. 223-229, Apr. 2013.
- SPINDLER, A. **Caracterização de cepas de *Pseudomonas spp* isoladas de efluente hospitalar não tratado: resistência a beta-lactâmicos e presença de integrons**. 101 p.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SRINIVASAN, A. et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with flexible bronchoscopes. **The New England Journal of Medicine**. Boston, v. 348, n. 3, p. 221-227, Jan. 2003.

STRATEVA T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**. Edinburgh, v. 58, pt. 9, p. 1133-1148, Sep. 2009.

SUGAWARA, E.; NAGANO, K.; NIKAIDO, H. Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. **The FEBS Journal**. Oxford, v. 279, n. 8, p. 910-918, Mar. 2012.

_____. Factors affecting the folding of *Pseudomonas aeruginosa* OprF porin into the one-domain open conformer. **mBio**. Washington, v. 1, n. 4, p. 1-9, Oct. 2010.

TOMÁS, M. et al. Efflux pumps, OprD porin, AmpC β -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 54, n. 5, p. 2219-2224, May. 2010.

TORTAS, L. M. **Caracterização de integrões de classe 1 em *Pseudomonas aeruginosa***. 65 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 7-49, 57-99, 143-168, 369-381.

UJVARI, S. C. **Pandemias: a humanidade em risco**. São Paulo: Contexto, 2011. 210 p.

VAHABOGLU, H. et al. Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of Medical Microbiology**. Edinburgh, v. 50, n. 7, p. 642-645, Dec. 2000.

VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 4, n. 4, p. 551-560, Oct./Dec. 1998.

VICENTE, A. G. **Manual e formulário do oficial de farmácia**. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1982. p. 62-67.

VILAR-COMPTE, D. et al. Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. **Salud Pública de México**. Cuernavaca, v. 45, n. 5, p. 371-378, Sep./Oct. 2003.

WANNMACHER, L. OPAS/OMS – Ministério da Saúde. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Brasília, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WELDHAGEN, G. F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impacts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 47, n. 8, p. 2385-2392, Aug. 2003.

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