Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Alex Guerra Ferreira

Epidemiologia molecular, resistência aos antimicrobianos e marcadores genéticos de adaptabilidade em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de pacientes com fibrose cística cronicamente infectados: um estudo multicêntrico

Rio de Janeiro
2013

Alex Guerra Ferreira

Epidemiologia molecular, resistência aos antimicrobianos e marcadores genéticos de adaptabilidade em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de pacientes com fibrose cística cronicamente infectados: um estudo multicêntrico

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.ª Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

F383 Ferreira, Alex Guerra.
Epidemiologia molecular, resistência aos antimicrobianos e marcadores genéticos de adaptabilidade em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de pacientes com fibrose cística cronicamente infectados: um estudo multicêntrico / Alex Guerra Ferreira. – 2013.
109 f.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Fibrose cística – Teses. 3. Pulmões – Infecções – Teses. 4. Epidemiologia. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Alex Guerra Ferreira

Epidemiologia molecular, resistência aos antimicrobianos e marcadores genéticos de adaptabilidade em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de pacientes com fibrose cística cronicamente infectados: um estudo multicêntrico

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 25 de março de 2013

Banca Examinadora: _____

Prof.ª Dra. Elizabeth de Andrade Marques (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. Agnaldo Luis Lopes

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Viviane Zahner

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese a memória do meu pai

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelo caminho mais correto.

A minha mãe, pelo simples fato de existir e ter batalhado para que eu chegasse até aqui.

A Profª. Elizabeth de Andrade Marques, pela oportunidade, confiança e o exemplo profissional. Você é muito mais do que uma orientadora.

Ao Profº. Robson de Souza Leão por toda a ajuda ao longo dos meus nove anos de microbiologia, suas conquistas são um exemplo pra mim.

A Raquel Leite Ribeiro pela amizade e carinho.

A Márcia Cruz Mota Fonseca Jones, por ter me ensinado os primeiros passos na Microbiologia e me tratado como um filho.

A Profª. Vânia Merquior pela participação em momentos importantes da minha vida acadêmica.

A Andrea Ferreira, Danielle Lima, Elenice Rosa e Géssica Araújo pelos almoços divertidos no departamento.

Aos companheiros que estão ou passaram pelo laboratório 2: Ana Karine, Gisele, Guilherme, Marcus, Orlando, Rosana, Selma e Viviane, pela ajuda durante a execução do trabalho.

A Denílson Ferreira Batista, por ter sido sempre prestativo e divertido comigo.

A Drª Ana Paula D'Alincourt Carvalho pelo carinho e disponibilidade desde os meus primeiros dias no laboratório.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia que me ajudaram desde que cheguei aqui.

Aos amigos Ana Lúcia, André, Antonio e Claudia pelos encontros e brincadeiras

A Paula Motta pelo carinho e momentos de estudo.

Aos amigos que fiz na FIOCRUZ: Polyana, Fernanda, Felipe, Thiago e Carlos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Fracassei em tudo o que tentei na vida. Tentei alfabetizar as crianças brasileiras, não consegui. Tentei fazer uma universidade séria e fracassei. Mas os fracassos são minhas vitórias. Eu detestaria estar no lugar de quem me venceu.

Darcy Ribeiro

RESUMO

Ferreira, Alex Guerra. **Epidemiologia molecular, resistência aos antimicrobianos e marcadores genéticos de adaptabilidade em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* obtidas de pacientes com fibrose cística cronicamente infectados**: um estudo multicêntrico. 2013. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

As infecções pulmonares crônicas por *Pseudomonas aeruginosa* são a principal causa de morbi-mortalidade em pacientes portadores de fibrose cística (FC). No Brasil os estudos sobre epidemiologia e resistência desse micro-organismo tem um caráter local. Diante disto, foram selecionados 75 pacientes com infecção pulmonar crônica atendidos em quatro centros de referência no Brasil: Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul; Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), Bahia; Instituto Fernandes Figueira (IFF) e Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), ambos do Rio de Janeiro. As amostras de *P. aeruginosa* foram obtidas entre maio de 2009 e junho de 2011 e submetidas à tipagem molecular por PFGE; a determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, a detecção de genes de resistência a carbapenens por PCR e ao sequenciamento dos genes *mucA* e *lasr*. A tipagem molecular das 274 amostras mostrou 224 clones. Não foram encontrados clones circulantes entre os centros ou dentro de um mesmo centro. No entanto, dois irmãos atendidos no HEOM apresentaram amostras de um mesmo clone e, tanto no IFF quanto no HCPA foram identificados “clusters” de dois pacientes distintos compartilhando um mesmo clone. A infecção crônica é caracterizada pela manutenção de um mesmo clone em cada paciente, porém, a maioria dos pacientes apresentou uma colonização por clones intermitentes. A análise geral do perfil de susceptibilidade mostrou os maiores índices de resistência para amicacina, gentamicina (26%) e cefepime (22%). Na comparação entre os centros verificamos que estes três antimicrobianos também foram os menos efetivos no HCPA, porém no IFF e no HEOM as drogas com maior índice de resistência foram tobramicina e piperacilina/tazobactam, respectivamente, o que indica a adoção de diferentes protocolos de tratamento entre os centros. As amostras do morfotipo Não Mucoide NM (presente nos estágios iniciais da infecção) foram significativamente mais resistentes a tobramicina do que as do morfotipo mucoide (M) (associada à infecção mais tardia) tanto no IFF quanto no HCPA, porém somente neste último as amostras M foram mais resistentes aos β-lactâmicos do que as NM. Cerca de 17% das amostras apresentaram multirresistência e 15(20%) pacientes estavam colonizados com pelo menos uma amostra com este fenótipo. As 24 amostras de três pacientes que apresentaram a manutenção de um mesmo clone foram submetidas ao sequenciamento dos genes *mucA* e *lasR*, destas, 14 (58%) exibiram mutações em pelo menos um dos genes, cujas alterações são consideradas marcadores da infecção crônica. Esse trabalho destaca-se por ser o primeiro de caráter multicêntrico no âmbito da FC no Brasil, ressaltando a necessidade de um contínuo monitoramento deste cenário no país.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Fibrose Cística. Resistência. Epidemiologia.

ABSTRACT

Ferreira, Alex Guerra. **Molecular epidemiology, antimicrobial resistance and genetic markers of adaptability in Pseudomonas aeruginosa samples obtained from chronically infected cystic fibrosis patients**: a multicenter study. 2013. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa* are the major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis (CF). In Brazil, epidemiology and resistance studies of this microorganism has a local feature. Given this, we selected 75 patients with chronic pulmonary infection attended in four reference centers in Brazil: Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul; Hospital Especializado Octavio Mangabeira (HEOM), Bahia, Instituto Fernandes Figueira (IFF) and Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), both of Rio de Janeiro. *P. aeruginosa* isolates were obtained between May 2009 and June 2011 and submitted to molecular typing by PFGE; determining the antimicrobial susceptibility profile, detection of carbapenem resistance genes by PCR and sequencing of genes *mucA* and *lasR*. Molecular typing of 274 samples showed 224 clones. No clones were found circulating between the centers or within the same center. However, samples from two brothers had attended at HEOM belong to the same clone, and were identified clusters of two different patients sharing the same clone in IFF and HCPA. Chronic infection is characterized by the maintenance of a single clone in each patient, but most patients were colonized by intermittent clones. A general analysis of the susceptibility profile showed the highest rates of resistance to amikacin, gentamicin (26%) and cefepime (22%). Comparing the centers, we found that these three antimicrobials were also the least effective at HCPA, but the IFF and HEOM drugs with greater resistance rate were tobramycin and piperacillin / tazobactam, respectively, which indicates the adoption of different treatment protocols between centers. Non mucoid NM isolates (present in the early stages of infection) were significantly more resistant to tobramycin than mucoid (M) (associated with later infection) in IFF and HCPA, but only in the latter M isolates were more resistant to β-lactam antibiotics than NM. About 17% of the samples has been multiresistant and 15 (20%) patients were colonized with at least one sample with this phenotype. The 24 samples from three patients with maintaining the same clone were subjected to sequencing of genes *mucA* and *lasR* and of these, of then, 14 (58%) exhibited mutations in at least one gene, which alterations are considered markers of chronic infection. This work stands out because its multicenter feature, the first in FC scope in Brazil, highlighting the need for continued monitoring of this scenario in the country.

Keywords: *Psedomonas aeruginosa*. Cystic Fibrosis. Resistance. Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentuais de resistência das 274 amostras de *P. aeruginosa*. 40

Figura 2 - Percentual de resistência de 133 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Hospital das Clínicas de Porto Alegre - RS..... 42

Figura 3 - Percentual de resistência de 68 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Instituto Fernandes Figueira - RJ..... 44

Figura 4 - Percentual de resistência de 47 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Hospital Universitário Pedro Ernesto – RJ..... 46

Figura 5 - Percentual de resistência de 26 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Hospital Especializado Octávio Mangabeira - BA..... 48

Figura 6 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *SpeI* das 133 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital das Clínicas de Porto Alegre..... 54

Figura 7 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *SpeI* das 68 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Instituto Fernandes Figueira..... 59

Figura 8 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *SpeI* das 47 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital Universitário Pedro Ernesto..... 62

Figura 9 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *SpeI* das 26 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital Especializado Octávio Mangabeira..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições metodológicas para detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamases (MBL)..... 32

Tabela 2 - Condições metodológicas para amplificação dos genes *mucA* e *lasR*..... 34

Tabela 3 - Características da amostragem estudada por centro de atendimento aos pacientes com Fibrose Cística..... 38

Tabela 4 - Fenótipo das 274 amostras de *P. aeruginosa* incluídas no estudo..... 39

Tabela 5 - Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide..... 41

Tabela 6 - Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Hospital das Clínicas de Porto Alegre resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide..... 43

Tabela 7 - Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Instituto Fernandes Figueira resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide..... 45

Tabela 8 - Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Hospital Universitário Pedro Ernesto resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide..... 47

Tabela 9 - Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Hospital Especializado Octávio Mangabeira resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide..... 49

Tabela 10 - Distribuição dos perfis de resistência de *P. aeruginosa* por centro hospitalar de origem..... 51

Tabela 11 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre..... 56

Tabela 12 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Instituto Fernandes Figueira..... 60

Tabela 13 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto..... 63

Tabela 14 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 15 pacientes do Hospital Especializado Octávio Mangabeira..... 65

Tabela 15 - Características dos clones de *P. aeruginosa* compartilhados por pacientes relacionados e não relacionados..... 67

Tabela 16 - Mutações nos genes *mucA* e *lasR* em 24 amostras de *P. aeruginosa*..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
ATCC	“American Type Culture Colection”
BGN-NF	Bastonetes Gram-negativos Não fermentadores
CAMHB	Caldo Mueller Hinton Cátion-ajustado
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo *Burkholderia cepacia*
CEP	Cefepime
CFTR	Proteína reguladora de condutância transmembranar da fibrose cística
CIP	Ciprofloxacina
CLED	Cystine Lactose Eletrolites Deficient
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
EDTA	Ácido etileno diamino-tetra-acético
FC	Fibrose cística
GEN	Gentamicina
HCPA	Hospital das Clínicas de Porto Alegre
HEOM	Hospital Especializado Octávio Mangabeira
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IMP	Imipenem
LPS	lipopolissacarídeo
M	Mucóide
MER	Meropenem
NM	Não Mucóide
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PTZ	Piperacilina-Tazobactam
RAPD	Amplificação Randômica do DNA Polimórfico
RFLP	polimorfismo dos fragmentos de restrição
TOB	Tobramicina
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	**OBJETIVOS**.....	28
1.1	**Geral**.....	28
1.2	**Específicos**.....	28
2	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	29
2.1	**Pacientes e amostras bacterianas**.....	29
2.2	**Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos**.....	30
2.3	**Detecção genotípica de metalo-β-lactamase (MBL) e Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)**.....	30
2.3.1	Extração do DNA bacteriano por lise térmica.....	30
2.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
2.3.3	Eletroforese em gel de agarose.....	32
2.4	**Perfil de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE)**.....	33
2.5	**Sequenciamento dos genes *mucA* e *lasR***.....	34
2.5.1	Purificação do DNA.....	35
2.5.2	Reação de sequenciamento.....	35
2.5.3	Precipitação do DNA e análise.....	36
2.6	**Análise estatística**.....	36
3	**RESULTADOS**.....	37
3.1	**Características da amostragem**.....	37
3.2	**Fenótipo de resistência aos antimicrobianos**.....	39
3.2.1	Análise geral.....	39
3.2.2	Análise por Centro de Atendimento.....	41
3.2.2.1	Hospital das Clínicas de Porto Alegre - RS.....	41
3.2.2.2	Instituto Fernandes Figueira - RJ.....	43
3.2.2.3	Hospital Universitário Pedro Ernesto – RJ.....	45
3.2.2.4	Hospital Especializado Octávio Mangabeira – BA.....	47
3.3	**Comparação dos perfis de resistência das amostras de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes atendidos nos quatro centros de referência avaliados**.....	49

3.4 **Pesquisa de genes associados à resistência aos carbapenemicos**..... 52
3.4.1 Metalo-β-lactamases..... 52
3.4.2 KPC (*Klebsiella pneumoniae* cabapenemase)..... 53
3.5 **Análise do polimorfismo genético das amostras**..... 53
3.6 **Sequenciamento dos genes *mucA* e *lasR***..... 68
4 **DISCUSSÃO**..... 70
CONCLUSÕES..... 88
REFERÊNCIAS..... 90
ANEXO – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto..... 109

INTRODUÇÃO

Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é a doença genética que mais comumente leva a mortalidade na população caucasiana (Cystic Fibrosis Foundation, 2011). Esta doença se manifesta por anormalidades na função de glândulas exócrinas resultando em alterações na composição de íons e aumento da viscosidade de secreções epiteliais. Ocorre, portanto um distúrbio generalizado no sistema secretor de todas as glândulas exócrinas, o que afeta principalmente as glândulas produtoras de muco, e os sistemas digestório e respiratório (Lyczak, Cannom & Píer, 2002; Voynow & Scanlin, 2005).

A doença tem origem genética autossômica recessiva, causada pela perda da expressão ou função da glicoproteína reguladora de condutância transmembranar (CFTR), devido a mutações em um único gene situado no cromossomo 7, que a codifica. Esta proteína é um canal de cloro, mas também regula canais de outros íons, incluindo sódio e potássio (Schwiebert *et al*., 1999), e está presente em células epiteliais de diversos tecidos, atuando na homeostase de íons e fluidos. São reconhecidas mais de 1900 mutações relacionadas com diferentes gravidades e manifestação da doença (Shreve *et al*., 1999; Moore *et al*., 2004; Riordan, 2007; http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage .html).

De todos os órgãos que podem ser comprometidos pela doença, o pulmão é o mais severamente afetado e, em decorrência disto, infecções pulmonares crônicas causam 95% dos óbitos nos pacientes com FC (Voynow & Scanlin, 2005; Doring *et al*., 2012; Taylor-Robinson *et al*., 2012). Isto se deve ao defeito no canal de cloreto que resulta em perda ou redução da secreção deste íon, no epitélio das vias aéreas, e do aumento da absorção ativa de sódio, o que leva a diminuição do conteúdo de água do muco que reveste as células mucosas. Essa desidratação da camada de muco resulta em uma ação mucociliar defeituosa e no acúmulo de secreções viscosas hiperconcentradas, que obstruem principalmente as vias aéreas e favorecem o estabelecimento de microrganismos (Lyczak, Cannom & Píer, 2002; Sadikot *et al*., 2005; Mayer-Hamblett *et al*., 2007).

A doença pulmonar é resultado da falência de funções do sistema imune inato do tecido pulmonar: ação mucociliar defeituosa, perda da atividade antimicrobiana e falência de mecanismos de opsonização e destruição bacteriana, associados à liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, principalmente proteases e elastases de neutrófilos, que contribuem significativamente para o declínio da função pulmonar. Com isso, obstrução pulmonar crônica, infecção e inflamação levam a bronquiectasias e falência pulmonar (Voynow, Fischer & Zheng, 2008).

A primeira descrição da FC foi em 1938. Inicialmente, 80% dos recém-natos afetados por esta doença não chegavam ao primeiro ano de vida e todos iam a óbito até os 10 anos de idade. Já na década de 1960, a média de vida era de seis anos (Renders *et al*., 2001; Manno *et al*., 2005) e estudos já descreviam uma considerável proporção de pacientes alcançando a adolescência (Nivens *et al*., 2001; Lyczak, Cannom & Píer, 2002). Em 1990, aproximadamente um terço dos indivíduos FC atingia a idade adulta e atualmente mais de 48% apresentam 18 anos ou mais. Este avanço se deu em função do maior conhecimento sobre a doença, o diagnóstico precoce, a instituição de programas de tratamento e o surgimento de centros de atendimento especializado, além de novos antimicrobianos, anti-inflamatórios e agentes mucolíticos (Alvaréz *et al*., 2004; García *et al*., 2004; Cystic Fibrosis Foundation, 2011).

Aspectos Microbiológicos na Fibrose Cística

A morbidade e mortalidade na FC são decorrentes da progressiva perda da função pulmonar, resultante de ciclos de inflamação e infecção (Zhang *et al*., 2005). As infecções pulmonares geralmente são polimicrobianas e, a maioria de etiologia bacteriana e restritas a alguns patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e espécies do grupo dos bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGN-NF), caracterizando-se por quadros progressivamente crônicos com episódios de exacerbação (Saiman & Siegel, 2004).

A prevalência dos patógenos nos pulmões dos pacientes com FC varia com a idade e como numa espécie de sucessão microbiológica. *S. aureus* e *H. influenzae* são os patógenos encontrados inicialmente colonizando o pulmão destes pacientes.

Quando os pacientes atingem a adolescência, outros microrganismos são encontrados nas secreções respiratórias, sendo a maioria do grupo dos BGN-NF, microrganismos caracteristicamente ambientais, destacando-se a *Pseudomonas aeruginosa* como o patógeno de maior relevância. Nos Estados Unidos, estudos envolvendo crianças portadoras de FC, com idades entre seis e 10 anos revelara índices de colonização de 60% para *S. aureus*, 40% para *P. aeruginosa* e 25% para *H. influenzae*. A maioria dos adultos (cerca de 80%) é cronicamente colonizada por *P. aeruginosa* (*Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry*, 2011).

S. aureus é o patógeno mais frequente na primeira década de vida, sendo encontrado em 30% de fluidos de lavado broncoalveolar de crianças fibrocísticas com média de idade de três meses (Foweraker, 2009) e, frequentemente, persiste a despeito do tratamento (Kahl *et al*., 2003). Sugere-se que a infecção por *S. aureus* precede a infecção do parênquima pulmonar dos fibrocísticos pelos BGN-NF (Burns *et al*., 2001). O uso de antibioticoterapia anti-estafilocócica, de forma rotineira ou intermitente, a fim de prevenir a progressão da infecção, tem sido clinicamente efetivo, mas seu papel como profilático em longo prazo é incerto (Smyth & Walters, 2003).

O aumento no isolamento de *S. aureus* resistentes a Meticilina (MRSA) é causa de preocupação, pois nestes casos, as opções de tratamento são limitadas. O mecanismo que confere resistência a meticilina é o mesmo para todos os beta-lactâmicos. Muitas cepas de MRSA também têm adquirido resistência a antimicrobianos não relacionados, como as quinolonas e os aminoglicosídeos (Foweraker, 2009). A prevalência de MRSA nos pacientes com FC, embora pequena, vem aumentando gradualmente (Coia *et al*., 2006; Macfarlance *et al*., 2007; Vergison *et al*., 2007).

Em crianças com menos de cinco anos de idade é comum se observar a infecção por *H. influenzae* encapsulado do sorotipo b, onde o biotipo 1 é o mais frequentemente encontrado (Renders *et al*., 2001; Jeffrey *et al*., 2002; Lyczak, Cannom & Píer, 2002). Alguns estudos mostram um aumento na resistência a antimicrobianos usados para o tratamento de infecções por este microrganismo, com 37% dos pacientes infectados com cepas resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos, incluindo resistência a ciprofloxacina, que é raramente observada em pacientes sem FC (Roman *et al*., 2004; Watson, Burns & Smith, 2004). Em geral,

após 11 meses de colonização, este microrganismo gradualmente torna-se resistente aos antimicrobianos usados no tratamento (Starner *et al*., 2008).

Nas ultimas décadas, o aumento da sobrevida dos pacientes foi acompanhado do aumento na frequência de isolamento de outros BGN-NF, além da *P. aeruginosa*, como as bactérias do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans.* Destes, o CBc foi o mais impactante para esses pacientes a partir da década de 1980. (Gilligan, 1991; Gladman *et al*., 1992; Burns & Saiman, 1999, Sibley, Rabin & Surette, 2006). O CBc consiste de espécies fenotipicamente muito similares, mas genotipicamente distintas, anteriormente nomeadas como genomovares (Vandamme *et al*., 1997). Atualmente, o CBc é composto por 17 espécies, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*, *B. ubonensis*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans* e *B. lata* e exceto *B. ubonensis*, as demais já foram isoladas das secreções respiratórias de pacientes com FC (Vanlaere *et al*., 2009; Li Puma, 2010; Vandamme & Dawyndt, 2011). As espécies variam em frequência de isolamento, apresentação clínica, resistência a antimicrobianos e atributos de virulência (Carvalho *et al.*, 2006). Além disso, algumas espécies possuem alta capacidade de transmissão entre os pacientes (Coenye *et al.*, 2001; Saiman *et al*., 2003; Govan, Brown & Jones, 2007).

O curso clínico após a colonização inicial pelo CBc pode variar desde uma colonização assintomática até a deterioração pulmonar aguda com bacteremia, pneumonia necrozante, sepse e evolução rápida do paciente ao óbito: caracterizando a “síndrome cepacia” (Coenye, Gillis & Vandamme, 2000; Vinion-Dubiel *et al*., 2004, Govan, Brown & Jones, 2007).

Infecções por *S. maltophilia* podem aumentar o risco de morbi-mortalidade nesses pacientes, devido a sua resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos (Beringer & Appleman, 2000), porém estudos recentes mostram que a sua significância clínica possa ser limitada, não sendo associada com deterioração pulmonar (Goss *et al*., 2004; Foweraker, 2009).

A melhoria nos métodos de identificação laboratorial nos últimos anos, também permitiu o reconhecimento, embora em menor frequência, de muitos outros bastonetes Gram negativos nesses pacientes, incluindo espécies dos gêneros *Ralstonia, Elizabethkingia, Comamonas, Moraxella, Acinetobacter, Bordetella,*

Inquilinus, além de membros da família *Enterobacteriaceae.* Até o momento o significado clínico destes microrganismos é desconhecido (Coenye *et al*., 2002; Foweraker, 2009).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo, água e plantas. São pouco frequentes como constituintes da microbiota de indivíduos saudáveis (Kiska & Gilligan, 2001). Trata-se de um microrganismo com elevado potencial adaptativo, de caráter oportunista, associado a uma variedade de infecções em humanos e outros animais (Dubois *et al*., 2001; Salunkhe *et al*., 2005).

É o principal patógeno, tanto em importância quanto em prevalência, encontrado no pulmão dos pacientes com FC. Em geral, as crianças com infecção por esse microrganismo apresentam uma redução da expectativa de vida de cerca de 10 anos, quando comparadas àquelas sem infecção pela bactéria. (Saiman *et al*., 2003). A partir do segundo ano de vida do paciente, *P. aeruginosa* torna-se um dos patógenos mais frequentes e até o terceiro ano sua freqüência atinge 33% (Simmonds, 2010). Cerca de 80% dos pacientes adultos são infectados por esses microrganismos (Li *et al*., 2005 & Hauser *et al*.,2011).

Na FC, as infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa*, associada à inflamação das vias aéreas, levam a um dano progressivo do tecido pulmonar, com consequente falência respiratória e óbito (Lyczak, Cannon *et al*., 2002; Sermet-Gaudelus *et al*., 2009). Alguns mecanismos têm sido sugeridos para explicar a associação entre *P. aeruginosa* e células respiratórias: falhas das células epiteliais na internalização e morte dessas bactérias (Pier *et al*., 1996); inativação de substâncias antibacterianas – defensinas, devido a alta concentração de sais existentes nas secreções respiratórias (Goldman *et al*., 1997); disfunção do movimento ciliar das células epiteliais por exoprodutos bacterianos (Look *et al*., 2005); a própria estagnação de secreções na superfície das células do epitélio respiratório com a conseqüente proliferação de microrganismos em geral (Lee *et al*., 2005) e, ainda, o aumento da expressão de asialo-GM1 na superfície apical das

células do epitélio respiratório favorecendo a adesão destes microrganismos (Yagci *et al*., 2007).

A colonização/infecção por *P. aeruginosa* inicialmente surge de forma intermitente e posteriormente a bactéria estabelece uma colonização/infecção crônica, onde o paciente pode se apresentar estável ou com exacerbações respiratórias. O fenótipo não mucóide (NM) é o responsável pela colonização inicial das vias aéreas dos pacientes com FC e pelo início da patogênese, devido ao arsenal de fatores de virulência que expressa, como lipolissacarídeo, pili, sistema de secreção do tipo III, exotoxina A, elastases e proteases, fatores estes que, associados à resposta inflamatória, causam o dano tecidual no pulmão (Hentzer *et al*., 2001; Finnam *et al*., 2004).

Estudos longitudinais mostram que o fenótipo inicial NM de *P. aeruginosa*, pode permanecer no pulmão dos fibrocísticos por vários anos (Mahenthiralingam *et al*., 1996; Bjarnsholt *et al*., 2009). Entretanto, esta infecção pode evoluir para o estágio crônico, caracterizado pela presença constante da *P. aeruginosa* nas culturas respiratórias destes pacientes (Johansen & Hoiby, 1992), uma vez estabelecida à cronicidade é muito difícil erradicar esta bactéria do trato respiratório dos pacientes (Hoiby, 2000; Koch, 2002).

A capacidade da *P. aeruginosa* de estabelecer a infecção crônica esta ligada a sua persistência no ambiente hostil que é o pulmão destes indivíduos, o que tem sido atribuído à versatilidade e adaptabilidade verificada nesta bactéria decorrente do seu vasto genoma (Winstanley, 2009). Esta versatilidade é mediada por variação genética, ou seja, a ocorrência de mutações simples levando a perda de função em alguns genes, o que em longo prazo aumentaria o *fitness* da bactéria (Mena *et al*., 2008, Hauser *et al*., 2011).

As alterações genéticas descritas atualmente como sendo as mais importantes para a persistência da *P. aeruginosa* são: a conversão para o fenótipo mucóide (M), a inativação dos genes regulados via *quorum-sensing* e o aumento da expressão ou a aquisição de genes ligados a mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Gibson *et al.*, 2003; D'Argenio *et al.*,2007 & Hoffman *et al.*, 2009).

O fenótipo M é resultado da hiperprodução de alginato, um polímero acetilado de ácidos manurônico e gulurônico (Ryder, Byrd & Wozniak, 2007). A conversão para o morfotipo M está associada principalmente a mutações no gene regulador *mucA*. O operon para biossíntese do alginato está sob controle do promotor do gene

algD, que codifica uma enzima importante nesta via, este promotor é regulado positivamente pelo fator sigma AlgT, porém existem outros três genes (*mucA*, *mucB* e *mucD*) que codificam proteínas que atuam como fatores anti-sigma e controlam negativamente a expressão de *algD* ao se ligarem a AlgT (Mahenthiralingam *et al*., 1994; Drenkard & Ausubel, 2002). O aparecimento do morfotipo M está associado a um pior prognóstico para os pacientes, com aumento da deterioração pulmonar (Pedersen *et al*., 1992; Demko, Byard & Davis, 1995; Li Puma, 2010; Hauser *et al*., 2011).

Estudos mostram que uma minoria de pacientes que não apresenta o fenótipo M possui a função pulmonar significativamente melhor que aqueles colonizados por este fenótipo (Sener *et al*., 2001; Bagge *et al*., 2004; Heijerman, 2005). O alginato atua como um importante fator de proteção contra a ação das imunidades inata e adquirida, protegendo o microrganismo contra a fagocitose, o estresse oxidativo e o sistema complemento, além de agir como uma relevante barreira à ação de antimicrobianos, garantindo, assim, a persistência da *P. aeruginosa* no ambiente pulmonar (May, Shinabarged & Mahara, 1991; Moss, 1995; Hentzer *et al*., 2001; Lyczak, Cannom & Píer, 2002).

O *quorum-sensing* é um mecanismo através do qual as bactérias podem se comunicar para alterar sua expressão gênica em resposta a mudanças na densidade populacional (Schuster & Greenberg, 2006). *P. aeruginosa* produz uma série de moléculas que participam deste sistema, porém os dois principais sistemas são Las e Rhl. *In vitro*, verificou-se que o sistema Las é o principal nesta bactéria e modula a expressão de cerca de 10% dos genes da *P. aeruginosa*, que em sua maioria participam de vias metabólicas importantes, mas também incluem possíveis sistemas de efluxo e proteínas de função ainda desconhecida (Wagner *et al.*, 2003).

Dentre os genes regulados pelo sistema Las estão os que codificam fatores de virulência importantes como a elastase, protease alcalina, fosfolipase C, piocianina e a exotoxina A (Storey *et al.*, 1998; Schaber *et al.*, 2004; Hoboth *et al.*, 2009). No início da colonização/infecção, estes fatores desempenham um papel importante, porém para o estabelecimento do estágio crônico é necessário que haja uma atenuação da virulência, o que tem sido atribuído a mutações no gene *lasR* e uma consequente deficiência neste sistema de *quorum-sensing* (Feliziani *et al*., 2010).

Estudos mostram que em até 46% dos pacientes com FC infectados por *P. aeruginosa* não é possível detectar no escarro a presença das moléculas de *quorum-sensing*, além disso, observou-se que em algum pacientes, cerca de 80% das amostras haviam sofrido perda funcional do sistema Las, indicando que esta seria uma das adaptações mais importantes para o estabelecimento da infecção crônica (Midlleton *et al.*, 2002; Lee *et al.*,2005; Heurlier *et al*., 2006; Wilder *et al.*, 2009).

Apesar do tratamento com drogas anti-pseudomonas ser necessário para impedir o rápido declínio da função respiratória dos pacientes infectados, a emergência de mutantes resistentes a múltiplos antibióticos invariavelmente ocorre, com consequente falência terapêutica. A administração de antimicrobianos por via inalatória, como tobramicina (TOB) e polimixina (POL) tem sido usada como uma tentativa de promover a erradicação da bactéria no pulmão do indivíduo, já que desta forma, a droga é capaz de atingir concentrações mais elevadas no sítio da infecção. Contudo, *P. aeruginosa* pode gerar mutantes que são resistentes a concentrações de uso clínico, para todos os agentes usados no tratamento (Livermore., 2002).

Resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*.

Um dos grandes problemas nas infecções por *P. aeruginosa* é a resistência intríseca e adquirida a diversos antimicrobianos. A resistência intrínseca pode ser devido à escassa permeabilidade de sua membrana externa, ao seu eficaz sistema de efluxo e à produção de β-Lactamase do tipo AmpC, que confere resistência a ampicilina, ácido clavulânico, e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, com exceção da ceftazidima, ticarcilina, piperacilina, as cefalosporinas de quarta geração, aztreonam e aos carbapenêmicos (Hancok & Speert, 2000).

A resistência adquirida em *P. aeruginosa* ocorre principalmente por mutações (mutações pontuais, deleções, inserções e inversões no genoma bacteriano) e por transferência genética horizontal (plasmídeos, transposons, integrons). *P. aeruginosa* apresenta diferentes mecanismos para adquirir resistência às diversas classes de antimicrobianos, sendo os principais: a diminuição da absorção da droga

(porinas mutantes); aumento da eliminação por bombas de efluxo, inativação ou modificação dos sítios alvo (mutações em proteínas ribossomais, proteínas ligantes de penicilina, metilação ou mutação do RNAr), a aquisição de genes de resistência, hidrólise enzimática (como por exemplo β-lactamases) e modificação dos antimicrobianos (como por exemplo a enzima modificadora de aminoglicosídeos) (Li *et al*., 2000; Normark & Normark, 2002).

P. aeruginosa com capacidade de produzir metalo-β-lactamases (MBLs) tem sido descritas, o que representa um problema mundial de grande importância clínica. As MBLs são enzimas com atividade sobre vários β-lactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenêmicos e, ainda, sobre os inibidores β-lactâmicos, como o sulbactam (Bush *et al*., 1995, Arakawa *et al*., 2000, Santos Filho *et al*., 2003).

Baseado em estudos moleculares de enzimas, dois grupos com capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos tem sido descritos. As enzimas que possuem serina como sítio ativo, chamadas de grupo dois, e enzimas que requerem cátions divalentes como co-fatores para sua atividade enzimática, denominadas MBLs, grupo três, que podem ser inibidas por quelantes de metais, como o EDTA ou compostos tiólicos. As MBLs pertencem ao grupo 3a, fazendo parte de uma classe funcional comum de metalo-enzimas classificadas com base em sua habilidade de hidrolisar o imipenem (Santos Filho *et al*., 2003; Shibata *et al*., 2003; Bush & Jacoby, 2010).

Dentro da classe B das metalo-enzimas, as duas primeiras β-lactamases encontradas nas amostras de *P. aeruginosa* foram a IMP-1 e VIM-1, ambas possuindo uma ampla diversidade de substratos para hidrólise que inclui penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos, mas que não atingem os monobactâmicos (Bush, 2001). As amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL, VIM-1 e VIM-2 são susceptíveis apenas ao aztreonam (Poirel *et al*., 2000). Existem, ainda, outras variantes identificadas na Ásia e em outras regiões, como é o caso da VIM 3 em Taiwan (Yan *et al*., 2001). Atualmente já estão descritas mais de 40 variantes do tipo IMP e 30 do tipo VIM presentes em amostras de *P. aeruginosa* (Castanheira *et al*., 2009; Jeannot *et al*., 2012; Pournaras *et al*., 2013; http://www.lahey.org/Studies/).

A propagação de *P. aeruginosa* produtoras de MBL têm sido descrita em vários locais do mundo. No Brasil, foram isoladas as primeiras amostras no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, havendo registros,

também, na região nordeste e em São Paulo (Pellegrino *et al*., 2002; Santos Filho *et al*., 2003; Samuelsen *et al*., 2010; Camargo *et al*., 2011; Lee & Ko, 2012; Rieber *et al*., 2012; Koutsogiannou *et al*., 2013). Em 2002, Tolleman *et al*., descreveram a caracterização bioquímica e molecular de uma nova MBL, presente em isolado proveniente de uma criança com quatro anos de idade, em São Paulo. Essa nova MBL foi denominada SPM-1 e faz parte de uma nova subfamília com características próprias. Assim como as amostras do tipo IMP e VIM, a SPM-1 também não hidrolisa o ácido clavulânico, nem o aztreonam. (Murphy *et al*., 2003; Walsh *et al*., 2005).

German Imipenemase- GIM-1 foi descrito como uma MBL única, localizada em uma estrutura distinta de integron, e representa a quarta sub-classe de MBL. Foi descrita em 2002, em amostra clínica de *P. aeruginosa* isoladas na Alemanha. As amostras produtoras dessa enzima apresentam susceptibilidade apenas à polimixina. (Castanheira *et al*., 2004; Walsh *et al*., 2005). Na Austrália, foi descrita uma classe de enzima, denominada AIM, também isolada em amostras de *P. aeruginosa* (Yong, 2007).

O primeiro relato de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL na FC aconteceu em 2008, e desde então outros trabalhos tem reportado a ocorrência deste fenótipo na FC (Cardoso *et al*., 2008; Pollini *et al*., 2011). Assim, o monitoramento dessas enzimas, bem como a detecção precoce deste perfil de resistência, tornou-se crucial para um tratamento eficaz e para o controle da infecção e da disseminação de amostras com este fenótipo (Migliavacca *et al*., 2002; Yong *et al*., 2002).

A enzima *Kebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é um grande problema atualmente, já que confere resistência a todos os β-lactâmicos. Esta enzima só havia sido encontrada em membros da família Enterobacteriaceae, contudo já se identificou a presença desta enzima em amostras de *P. aeruginosa* na América Latina (Villegas *et al*., 2007). Em outro estudo, dentre 33 amostras resistentes ao imipenem, 25 apresentaram o gene bla_{kpc} e mais recentemente foi relatado o primeiro caso de *P. aeruginosa* produtora de KPC nos Estados Unidos, tornando evidente a disseminação pelo continente americano (Wolter, *et al*., 2009, Poirel *et al*., 2010; Mataseje *et al*., 2012; Pasteran *et al*., 2012).

Em pacientes com FC o primeiro e único relato de KPC foi em uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* em paciente atendido em um centro de referência no Rio

de Janeiro (Leão *et al.*, 2011). Diante disto, a capacidade de disseminação deste genótipo associada aos frequentes casos de co-infecção nesses pacientes ressalta a necessidade de vigilância deste mecanismo de resistência.

Tipagem Molecular

Devido à importância de *P. aeruginosa* como agente de infecções hospitalares, e o surgimento de amostras multirresistentes, os estudos epidemiológicos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras tornam-se muito importantes, pois permitem a caracterização de surtos de infecção bem como a avaliação de possíveis fontes de transmissão e aquisição deste patógeno. Podem, também, determinar a prevalência de grupos clonais dentro de uma população bacteriana, visando o monitoramento da emergência e disseminação de bactérias mulltirresistentes e/ou potencialmente virulentas (Olive & Bean, 1999; Sader *et al*., 2003).

Métodos genotípicos como amplificação de segmentos do DNA empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e principalmente, a análise dos perfis de fragmentação do DNA, após digestão com enzimas de restrição, através de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), são recomendados para a tipagem de microrganismos com propósitos epidemiológicos. Estes métodos são menos sujeitos as variações e apresentam maior poder discriminatório, maior reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de bancos de dados para caracterização dos microrganismos (Tenover, Arbeit & Goering, 1995; Olive & Bean, 1999; Belkum *et al*., 2001).

O método de macrorrestrição é o mais discriminatório dos métodos moleculares em *P. aeruginosa*. Nele as bactérias são incluídas em blocos de agarose e lisadas *in situ* e seu DNA genômico é digerido com enzimas de restrição que clivam o cromossomo e o material obtido é submetido à eletroforese em gel de campo pulsado (Adodi *et al*., 2000).

Estudos mostram um alto nível de diversidade genotípica entre amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, refletindo a mesma diversidade verificada em amostras ambientais, o que sugere que estes pacientes adquirem as

cepas de *P. aeruginosa* de maneira independente, provavelmente de reservatórios ambientais distintos (Jensen *et al*., 1997; Burns *et al*., 2001).

Cepas de *P. aeruginosa* genotipicamente diferentes podem colonizar os pacientes com FC. No entanto, acredita-se que, uma vez infectados, os pacientes tendem a abrigar o mesmo clone de *P. aeruginosa* durante o curso da doença, indicando que, mesmo durante os períodos de antibioticoterapia, a cepa original não é erradicada (Römling, Fiedler & Bobhammer, 1994; Burns *et al*., 2001; Li Puma, 2010; Hauser *et al*., 2011). Outros pacientes parecem manter variantes de um clone original, caracterizados por pequenas diferenças no genoma, sugerindo uma adaptação da bactéria ao microambiente pulmonar dos pacientes, durante a infecção crônica. Este processo corresponde as consideráveis adaptações genéticas e acumulação ou perda por mutações funcionais em genes específicos da *P. aeruginosa* (Silbert, Barth & Sader, 2001; Smith *et al*., 2006).

A colonização/infecção do pulmão dos pacientes com FC por *P. aeruginosa* é um processo muito dinâmico, já que frequentemente verifica-se uma colonização mista por diferentes clones isolados em momentos diferentes (Renders *et al*., 1996; Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al*., 2007).

Em pacientes acompanhados por longos períodos foi identificada a ocorrência de diversos clones distintos, com períodos de estabelecimento de uma infecção seguidos pela eliminação de clones específicos, indicando a substituição de clones infectantes (Wayne *et al*., 2009; Cramer *et al*., 2012). Essa troca seria resultado de uma intensa competição por nichos específicos no pulmão dos pacientes, revelando que alguns clones possuem fatores competitivos mais vantajosos, principalmente no que tange as condições nutricionais, à tolerância ao sistema imune e aos períodos de antibioticoterapia (Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al*., 2007). Estudos similares sugerem que a transmissão cruzada de *P. aeruginosa* entre pacientes com FC ocorre mais frequentemente quando o contato é mais intenso, principalmente entre irmãos (Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al*., 2007).

A ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* altamente transmissíveis em centros de atendimento a indivíduos com FC tem sido demonstrada, indicando que alguns clones têm a habilidade de se difundir entre os pacientes. Esta transmissão pode ocorrer por rota direta ou indireta e estes clones possuem vantagens evolutivas significativas para colonizar o pulmão dos pacientes. Embora as vias de aquisição e os meios de transmissão não sejam ainda bem estabelecidos, são crescentes os

relatos de surtos envolvendo cepas epidêmicas altamente transmissíveis em unidades de atendimento a FC, e em alguns casos, as cepas apresentam também a característica de multirresistencia (Scott & Pitt, 2004; Panagea *et al*., 2005; Jelsbak *et al*., 2007; Tingpej *et al*., 2007).

Römling e colaboradores (1994) descreveram um clone epidêmico, denominado clone C, que se encontra disseminado em alguns países europeus. Cerca de 28% dos isolados dos pacientes estudados apresentavam este clone, o que também foi detectado, com uma frequência similar (21%) em amostras do meio ambiente, como por exemplo, água de rio, de piscina e mesmo água potável. Na Inglaterra, uma cepa epidêmica apresentando multirresistência (LES, *Liverpool Epidemic Strain*) foi encontrada em 59% das amostras de *P. aeruginosa* obtidas de crianças em uma clínica pediátrica na cidade de Liverpool (Cheng *et al*, 1996), sendo posteriormente isoladas em pacientes adultos com FC (McCallum *et al*, 2001). Jones e colaboradores (2001), em um estudo prospectivo com 159 pacientes adultos crônicos, verificaram a presença de um clone denominado Manchester. Scott and Pitt (2004) relataram a presença de um novo clone epidêmico, Midlands 1, sendo o segundo genótipo mais comumente encontrado, detectada em 10% das amostras de *P. aeruginosa* na Inglaterra e no país de Gales. Essa mesma cepa também já foi isolada na Austrália.

Centros especializados no acompanhamento de pacientes com FC adotam, em suas rotinas, diferentes critérios para a segregação de pacientes, incluindo os indivíduos colonizados por *P. aeruginosa* com genótipo transmissível (Jones *et al*., 2001. Armstrong *et al*, 2002). Nos EUA, 65% dos centros de atendimento a FC apresentam política de controle de infecção. Os dados sugerem que a adoção de políticas locais é extremamente importante para melhorar o controle de infecção na FC (Saiman & Garber, 2009).

Justificativa:

As infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa* são responsáveis pela alta morbi-mortalidade em pacientes com FC. A persistência de *P. aeruginosa* no pulmão de pacientes com FC está associada a um pior prognóstico. Um aspecto

importante nesta etapa é a conversão do fenótipo não mucóide para mucóide, mudança esta que traz uma série de vantagens adaptativas no microambiente pulmonar, o que permite a bactéria prolongar o tempo da infecção. Além disso, o estabelecimento da cronicidade estaria ligado a uma atenuação da virulência desta bactéria, o que muitas vezes é decorrente de mutações no sistema de *quorum-sensing*, que é responsável pelo controle da expressão destes fatores (Ciofu *et al*., 2010 & Feliziani *et al*., 2010).

Outro fator preponderante para a ocorrência de infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* nestes pacientes é a resistência aos antimicrobianos. Apesar dos constantes cursos de antibioticoterapia, a erradicação desta bactéria é um objetivo difícil de ser alcançado, em parte devido ao aparecimento da resistência durante o tratamento. A resistência aos beta-lactâmicos, mediada por enzimas e em especial MBL ou KPC, representa uma grande preocupação na atualidade em virtude da sua capacidade de circulação e transferência gênica inter-espécies (Hauser *et al*.,2011).

Os dados epidemiológicos acerca da *P. aeruginosa* na FC apontam para a manutenção de um mesmo clone ou de poucos clones em cada paciente após o início da infecção crônica, entretanto em alguns locais, como Europa e Austrália, já foi constatada a ocorrência dos chamados clones epidêmicos, indicando que algumas cepas apresentam a habilidade de se difundir entre pacientes distintos, até mesmo quando estes são atendidos em centros de referência diferentes (Vrankrijker *et al*.,2011).

No Brasil, a comunidade cientifica envolvida com Fibrose Cística carece de dados epidemiológicos nacionais, uma vez que os trabalhos são pontuais e relatam as características de uma amostragem restrita. Neste sentido, o caráter multicêntrico de nosso estudo ressalta o ineditismo do trabalho ao apresentar as características de um conjunto diversificado de amostras quanto à origem, promovendo a comparação entre os dados obtidos dos diferentes centros, o que permite uma visualização mais fidedigna da realidade das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* em pacientes com FC no Brasil.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral:

Investigar o perfil de resistência, genes associados a características de adaptabilidade e a similaridade genética em amostras de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes com FC cronicamente infectados acompanhados em quatro centros de referência de três estados, localizados em diferentes regiões do país: Rio de Janeiro (Sudeste – SE), Rio Grande do Sul (Sul – S) e Bahia (Nordeste – NE).

1.2 Objetivos Específicos:

- Determinar o perfil de resistência de *P. aeruginosa* aos principais agentes antimicrobianos usados no tratamento das infecções pulmonares;
- Comparar os perfis de resistência entre os centros de referência;
- Avaliar comparativamente o perfil de resistência nos fenótipos não mucóide e mucóide;
- Investigar a presença de genes de resistência (bla_{imp}, bla_{spm}, bla_{vim} e bla_{kpc});
- Analisar o polimorfismo genético das amostras de *P. aeruginosa* por técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE);
- Investigar a presença de mutações em genes considerados marcadores da infecção crônica (*lasR* e *mucA*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes e amostras bacterianas

Foi definido que seriam incluídos no estudo 20 pacientes com infecção pulmonar crônica que faziam acompanhamento regular em cada um dos quatro centros hospitalares de referência: Departamento de Pneumologia do Instituto Fernandes Figueira (IFF – FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ; Departamento de Pneumologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), Rio de Janeiro, RJ; Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS e Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), Salvador, BA, indicando o caráter multicêntrico do estudo. A infecção crônica foi definida como a ocorrência de pelo menos três culturas positivas para *P. aeruginosa* no período de um ano, com intervalo de pelo menos um mês entre elas. Para este estudo foram selecionados pacientes que preenchiam esses critérios, por pelo menos dois anos antes do início do estudo e incluídas todas as amostras de *P. aeruginosa* isoladas no período entre maio de 2009 e junho de 2011.

O processamento dos espécimes respiratórios e a identificação de *P. aeruginosa* foram feitos nos laboratórios de bacteriologia de cada centro, assim como a caracterização dos diferentes fenótipos: Não mucóide (NM), mucóide (M) ou *Small Colony Variant* (SCV). As amostras foram então encaminhadas para o Laboratório 2 da Disciplina de Microbiologia e Imunologia – UERJ e estocados sob a forma de suspensões em solução de leite desnatado a 10% (Skim Milk; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo glicerol a 10% e mantidas a -20^{o}C, até a realização dos testes.

Este trabalho recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (Anexo).

2.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada através da técnica de difusão em ágar, de acordo com as recomendações do *Committee for Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, M07-A8, 2009).

Foram utilizados discos contendo nove antimicrobianos comumente incluídos na terapia anti-*Pseudomonas*: Amicacina 30μg (AMI), Cefepime 30μg (CEP), Ceftazidima 30μg (CAZ), Ciprofloxacina 5μg (CIP), Gentamicina 10μg (GEN), Imipenem 10μg (IMP), Meropenem 10μg (MER), Piperacilina/tazobactam 100μg /10μg (PTZ) e Tobramicina 10μg (TOB) (Oxoid, Hampshire, UK).

Posteriormente foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano e a classificação da susceptibilidade realizada de acordo com as recomendações do CLSI (M100-S21, 2011) para *P. aeruginosa* de pacientes com FC. A amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle do teste.

2.3 Detecção genotípica de metalo-β-lactamase (MBL) e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC)

Foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos seguintes genes: bla_{SPM-1}, bla_{IMP-1}, bla_{VIM-2} e bla_{kpc}.

2.3.1 Extração do DNA bacteriano por lise térmica

As amostras foram semeados em agar *Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar* (CLED, Difco), e incubadas a 35±2ºC por 18-24h. Ao término deste período, uma colônia isolada foi semeada em 3mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck, Alemanha). Após incubação a 35±2ºC por 18-24h sob agitação, 200μL do crescimento bacteriano foram adicionados a 2mL de água destilada (1:10) para a

leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro (B295 II Micronal, SP, Brasil) (λ= 580nm). A partir desta leitura foi determinado o volume da cultura necessário para se obter a $D.O._{580nm}$ de 0,5.

As amostras foram distribuídas em tubos tipo *eppendorf* nos volumes especificados pela D.O., e a seguir, centrifugadas por 2 min a 14.000 rpm (HERMLE, Z 233M-2). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado completamente e o sedimento, ressuspenso em 600µL de água deionizada estéril. O DNA foi obtido após aquecimento destas suspensões à 100ºC por 10 min e subsequente centrifugação por 10 seg a 14.000 rpm. Uma vez extraído, o DNA permaneceu em banho de gelo durante a preparação da mistura de reação.

2.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 50 µL contendo 200 µL de dNTP; 25 pmol de cada par de iniciadores; 1 X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50mM KCl, 1 mg/mL gelatina); 2,5 mM $MgCl_2$; 2,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e um volume de 3 µL de DNA bacteriano.

Como controles negativos foram utilizados a mistura da reação sem adição do DNA molde (45µL) e com o DNA extraído de *P. aeruginosa* ATCC 27853, que não apresenta essas características de resistência. Para controles positivos de bla_{SPM-1}, bla_{IMP-1} e bla_{VIM-2} foram utilizadas as cepas de *P.aeruginosa* produtoras de SPM-1 (48-1997A), IMP-1 (PSA 319) e VIM-2 (AG-2), respectivamente, gentilmente cedidas pela Drª. Ana Cristina Gales da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

A amplificação dos segmentos gênicos empregando diferentes pares de iniciadores foi realizada conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições metodológicas para detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamases (MBL)

Gene	Iniciadores	Tamanho do Fragmento (pb)	Condições de amplificação	Referência
Bla$_{IMP-1}$	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3' 5'-GAACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'	593	Desnaturação inicial 95º C/2min; 33 ciclos de 94ºC/1 min; 60ºC/1 min; 72°/1min	Senda *et al*., 1996
Bla$_{SPM-1}$	5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'	648	Desnaturação inicial (95ºC/5min), 30 ciclos de 95ºC/1 min; 54ºC/1min; 68ºC/1min	Gales *et al*., 2003
Bla$_{VIM-2}$	5'-ATGTTCAAACTT TTGAGTAAGT-3' 5'-CTACTCAACGACTGAGCG-3'	800	Desnaturação inicial (95ºC/10min), 25 ciclos de 95ºC/30s; 53ºC/1min; 72ºC/45s	Gales *et al*., 2003
Bla$_{kpc-2}$	5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3' 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'	1011	Desnaturação inicial (94ºC/3min), 30 ciclos de 94ºC/1min; 52ºC/1min; 72ºC/1min	Yigit *et al*., 2001

Fonte: Ferreira, 2013.

2.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese a 100V, durante aproximadamente 1h em gel de agarose (Invitrogen) a 1,2%, com solução 1X de tampão TBE (Tris-Base, Ácido bórico, EDTA 0,5M, pH 8,0).

Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), por 10min e, em seguida, visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (*Cole Parmer* 96W *Instrument Co. Vernen Hills*, *Illinois,* EUA) e fotografado (*Kodak Digital Sciense, Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120).

2.4 Perfil de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *P. aeruginosa* foi realizada conforme descrito por Carvalho *et al.,* 2006. As amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo *Tryptcase Soy Agar* (TSA; Difco, Detroit, Mich.) e incubadas a 36±1ºC por 18-24h. A seguir, as células bacterianas foram suspensas em 500µL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,6) de forma a se obter turvação equivalente ao padrão 5 da escala de McFarland. Foi adicionado igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve GTG agarose; FMC BioProducts, Rockland, Maine, EUA) a 2% preparada em tampão PIV. A mistura obtida foi vertida em moldes apropriados para a obtenção de blocos.

Após a solidificação da agarose, os blocos foram colocados em 3,5mL de solução de lise (6mM Tris-HCl, pH 7,6; 1M NaCl; 100mM EDTA; 0,5% Brij-58; 0,2% desoxicolato sódico; 0,5% lauril sarcosinato de sódio; 1mg/mL de lisozima) e incubados por 15-18h a 36±1ºC, sob agitação branda. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4ºC - 8ºC e a solução foi substituída por 2,0mL de solução ESP (0,5M EDTA, pH 8,0; 1% Sarcosyl; 0,1mg/mL de proteinase K) com incubação por 18-24h a 50±1ºC sob leve agitação. A seguir, a solução foi substituída por nova solução ESP e incubada durante 18-24h a 50±1ºC. Os blocos foram, então, lavados em tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1mM EDTA) por seis vezes a 36±1ºC, sob agitação branda (três lavagens de 20 a 30 minutos cada, duas lavagens de 2h cada e uma lavagem de 24h).

Um bloco de cada amostra foi colocado em 200µL do tampão da enzima (20µL do tampão; 180µL de água milliQ esterilizada) e incubados por 2h à 36±1ºC. Após esse período, os blocos foram submetidos ao tratamento com solução contendo 15U da enzima de restrição *Spe*I (Invitrogen) por 16-18h a 36±1ºC em aerobiose.

A solução contendo a enzima de restrição foi retirada e os blocos contendo o DNA digerido foram fundidos à 72ºC e aplicados em gel de agarose (SeaKem GTG agarose; FMC) a 1,0% em 0,4X TBE. A separação eletroforética foi realizada no sistema CHEF DRIII (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA) por 15h a 6V/cm, com pulso inicial de 5s e pulso final de 35s, a 14ºC. Para a visualização das

bandas obtidas, o gel de agarose foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 20 min, sob agitação, descorado em água por no mínimo 30min, observado em transiluminador de UV e posteriormente fotografado.

Para análises dos géis foi utilizado o aplicativo BioNumerics Software 6.0 (Applied Maths, St. Marten-Latem, Bélgica) e os percentuais de similaridade foram determinados pelo Coeficiente de Dice. Os dendrogramas foram construídos pelo método UPGMA usando-se tolerância de 1% e otimização de 1%. Foram considerados clones idênticos aqueles com percentuais de similaridades iguais ou superiores a 80%.

2.5 Sequenciamento dos genes *mucA* e *lasR*

A extração do DNA foi executada como descrito no item 3.1, e posteriormente as amostras foram submetidas a reações de amplificação utilizando-se os pares de iniciadores e as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições metodológicas para amplificação dos genes *mucA* e *lasR*.

Gene	Iniciadores	Condições de amplificação	Referência
mucA	5'-GAAGCCTGACACAGCGGCAAATGC-3' 5'-CCTCAGCGGTTTTCCAGGCTGGCTGC-3'	Desnaturação inicial 95º C/8min; 33 ciclos de 94ºC/1 min; 60ºC/1 min e 20s; 72°/2min; extensão final 72°/10min	Feliziani *et al*., 2010
lasR	5'-CACGGGCGCATGCGCCTC-3' 5-AAGCTTCTATATAGAAGGGCA-3'	Desnaturação inicial 95º C/8min; 33 ciclos de 94ºC/1 min; 50ºC/1 min e 20s; 72°/2min; extensão final 72°/10min	Feliziani *et al*., 2010

Fonte: Ferreira, 2013.

2.5.1 Purificação do DNA

Os produtos de amplificação foram submetidos à purificação através do kit de purificação Ilustra GFX PCR e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). As suspensões contendo os produtos de amplificação foram misturadas a 500 µL do tampão de captura em um sistema composto pelos tubos coletores e colunas GFX, onde o DNA fica retido, e em seguida centrifugadas a 14.000 rpm por 30 seg. O tampão de captura foi descartado e adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem, submetendo-se a nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 seg. Os tubos coletores foram descartados e a coluna GFX foi transferida para tubos tipo *eppendorfs*, sendo adicionado 40 µL do tampão de eluição, que retira o DNA retido na coluna GFX, incubado por 1 min e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 1 min. O DNA purificado foi submetido à eletroforese, a 100V, durante aproximadamente 30 min em gel de agarose (Invitrogen) a 1,2%, com solução 1X de tampão TBE, corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), por 10min e, em seguida, visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (*Cole Parmer* 96W *Instrument Co. Vernen Hills*, *Illinois,* EUA), para confirmação da pureza, manutenção e qualidade do DNA purificado, e posteriormente foi conservado congelado (-20°C) até a realização da reação de sequenciamento.

2.5.2 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação com dideoxinucleotídeos (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977) utilizando-se os iniciadores da reação de PCR e o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences). A reação continha 2µL de DNA (180ng/µL), 2µL do mix de terminação (Amersham Biosciences) e 2,5pmoles/µL do iniciador em cada poço de microplaca de PCR (96 poços, com borda inteira (Axygen). Após uma centrifugação rápida (4.000 rpm, 1min), a placa foi submetida à reação de sequenciamento. As reações foram realizadas no sequenciador Beckman Coulter CEQ 8000 System (Beckman Coulter,

High Wycombe, UK) em triplicata, sob as seguintes condições: 25 ciclos de 95°C/20s, 50°C/15s e 60°C/1min.

2.5.3 Precipitação do DNA e análise

Para realizar a precipitação, foi adicionado a cada poço da microplaca 26μL de etanol absoluto e 1μL de acetato de sódio, em seguida submeteu-se a centrifugação rapidamente (4.000 rpm, 1min), e as placas foram armazenadas sob refrigeração 4-8ºC, em ausência de luz por 18-24h. Posteriormente, as sequências foram lidas com auxílio do sistema MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences).

Os resultados do sequenciamento foram comparados com as sequências dos genes *mucA* e *lasR* na amostra padrão PAO1 (http://www.pseudomonas.com) através do software BioEdit 7.1.3.0 para a detecção de mutações

2.6 Análise estatística

Para validar a análise comparativa entre as diferentes situações abordadas neste estudo foi utilizado o teste Exato de Fisher. Os dados foram avaliados no aplicativo Prism (GraphPad, Inc., versão 5.0). Qualquer diferença foi considerada significativa quando $P<0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Características da amostragem

No período de maio de 2009 a junho de 2010, foram obtidas 274 amostras de *P. aeruginosa* referentes aos quatro centros participantes do estudo (HUPE-RJ, IFF-RJ, HCPA-RS e HEOM-BA). Foram incluídos 75 pacientes, sendo 20 atendidos em cada um dos centros do Rio de Janeiro e no do Rio Grande do Sul e 15 no centro da Bahia.

A média de idade dos 20 pacientes atendidos no HUPE - RJ foi de 26,4 anos, na faixa de 20 a 38 anos e o número total de amostras deste centro foi 47, perfazendo uma média de 2,3 amostras por paciente. No IFF - RJ, a média de idade foi 10,3 anos, faixa etária de 1 a 17 anos, com um total de 68 amostras, contabilizando 3,4 amostras por paciente. Para os 15 pacientes atendidos no HEOM - BA, o intervalo de idade foi de 5 a 18 anos e a média foi 12,3 anos e o número de amostras 26, indicando uma média de 1,7 amostras por paciente. No HCPA - RS foram obtidas 133 amostras de 20 pacientes, o que totaliza 6,6 amostras por paciente, a média de idade destes pacientes foi 14,2 anos, com intervalo de 2 a 30 anos (Tabela 3).

Tabela 3 - Características da amostragem por centro de atendimento aos pacientes com Fibrose Cística.

Características	Centros de Atendimento				Total
	HUPE	IFF	HCPA	HEOM	
Pacientes (n)	**20**	**20**	**20**	**15**	**75**
Média de idade (anos)	**26,4**	**10,3**	**14,2**	**12,3**	**15,8**
Variação (anos)	**20-38**	**1-17**	**2-30**	**5-18**	
Amostras (n)	**47**	**68**	**133**	**26**	**274**
Média de amostras/ paciente	**2,3**	**3,4**	**6,6**	**1,7**	**3,6**

Legenda: HUPE – Hospital Universitário Pedro Ernesto – RJ; IFF – Instituto Fernandes Figueira – RJ; HCPA – Hospital das Clínicas de Porto Alegre – RS; HEOM – Hospital Especializado Octávio Mangabeira – BA.

Fonte: Ferreira, 2013.

Dentre as 274 amostras estudadas, 149 (54,3%) apresentaram fenótipo NM, enquanto 124 (45,2%) amostras exibiram o fenótipo M. Apenas uma amostra foi caracterizada como SCV (*Small Colony Variant*). Das 133 amostras do HCPA - RS, 80 (60,1%) apresentaram fenótipo NM, 52 (39%) o fenótipo M e uma com fenótipo SCV. O número de amostras do IFF - RJ (total de 68) com fenótipo NM e M foi 29(42,6%) e 39 (57,4%), respectivamente. Dentre as 47 amostras do HUPE - RJ, 21 (44,7%) foram classificadas como NM e 26 (56,3%) como M, enquanto no HEOM - BA, em um total de 26 amostras, 19 (73%) foram identificadas como NM e sete (27%) como M (Tabela 4).

A maioria dos pacientes (n=47, 62,6%) apresentou infecção intermitente pelos dois fenótipos (NM e M), sendo 15, 14, 13 e cinco atendidos no HUPE - RJ, HCPA - RS, IFF - RJ e HEOM, respectivamente. Apenas oito (10,6%) exibiram infecção exclusivamente por amostras M, dos quais quatro do HUPE - RJ, três do IFF - RJ e um do HCPA - RS. Nos outros 20 pacientes a infecção foi restrita a amostras NM.

Tabela 4 - Fenótipo das 274 amostras de *P.aeruginosa* incluídas no estudo

Fenótipo	Centros de atendimento (nº de amostras)				Total
	HCPA (133)[a]	IFF (68)	HUPE (47)	HEOM (26)	
Não Mucóide	80 (60,1%)	29 (42,6%)	21 (44,7%)	19 (73%)	149 (54,3%)
Mucóide	52 (39%)	39 (57,4%)	26 (53,3%)	7 (27%)	124 (45,2%)

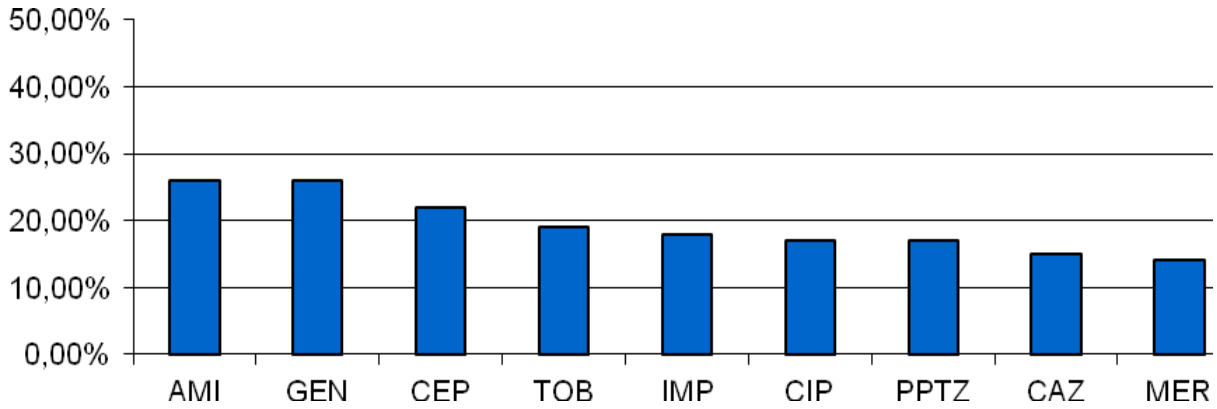
Legenda: [a] Uma amostra apresentou morfotipo SCV (Small Colony Variant); HUPE – Hospital Universitário Pedro Ernesto – RJ; IFF – Instituto Fernandes Figueira – RJ; HCPA – Hospital das Clínicas de Porto Alegre – RS; HEOM – Hospital Especializado Octávio Mangabeira – BA.
Fonte: Ferreira, 2013.

3.2 Fenótipo de resistência aos antimicrobianos

3.2.1 Análise geral

Dentre as 274 amostras de *P. aeruginosa* os maiores percentuais de resistência (resistência plena e intermediária) foram observados para AMI e GEN, 26% (n=71), seguido de CEP, 22% (n=60) e do outro aminoglicosídeo (TOB), com 19% (n=52). 18% (n=50) e 14% (n=39) das amostras não foram susceptíveis ao IMP ao MER, respectivamente. Percentuais de amostras não susceptíveis (resistência plena e intermediária) inferiores a 18% foram observados para CIP e para PTZ (17%, n=47) e CAZ (15%, n=40) (Figura 1).

Figura 1 – Percentuais de resistência das 274 amostras de *P. aeruginosa*



Legenda: AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem.

Fonte: Ferreira, 2013.

Ao correlacionarmos a resistência com o fenótipo (NM e M), verificamos que para os três aminoglicosídeos e para a CIP, o número de amostras resistentes com fenótipo NM foi maior que o número de amostras resistentes com fenótipo M e esta diferença mostrou-se significativa no caso da GEN (P=0,02) da TOB (P=0,008) e da CIP (P=0,006). Por outro lado, no caso dos beta-lactâmicos e da PTZ, o número de amostras M resistentes foi maior que o de amostras NM resistentes. Entretanto, apenas no caso do IMP (P=0,03), da CAZ (P=0,003) e da PTZ (P=0,01), a diferença mostrou-se estatisticamente significativa (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide

Antimicrobiano (número de amostras resistentes)	Fenótipo		P[b]
	Não mucóide	Mucóide	
Amicacina (70)	**43**	**27**	**0,21**
Gentamicina (71)	**47**	**24**	**0,02***
Cefepime (60)	**27**	**33**	**0,10**
Tobramicina (52)	**37**	**15**	**0,008***
Imipenem (50)[a]	**20**	**29**	**0,03***
Ciprofloxacina (47)	**35**	**12**	**0,006***
Piperacilina-tazobactam (47)	**18**	**29**	**0,01***
Ceftazidima (40)	**13**	**27**	**0,003***
Meropenem (39)	**17**	**22**	**0,16**

Legenda: [a]Uma amostra apresentou fenótipo SCV; [b]Teste exato de Fisher – considerado significativo quando P<0,05*.

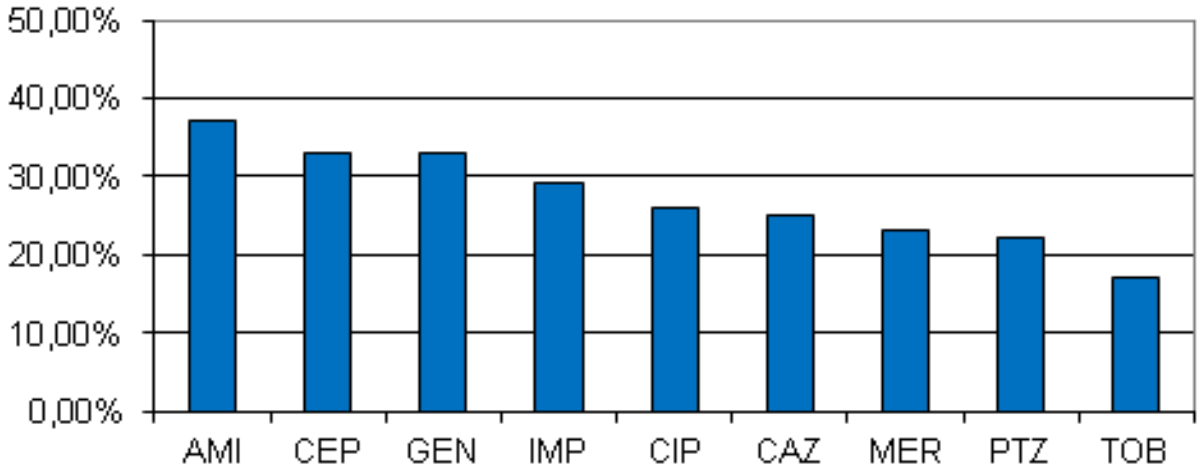
Fonte: Ferreira, 2013.

3.2.2 Análise por Centro de Atendimento

3.2.2.1 Hospital das Clínicas de Porto Alegre - RS

Nas 133 amostras obtidas do HCPA - RS, verificou-se um percentual de resistência acima de 30% para os antimicrobianos AMI, CEP e GEN (37% [n=49], 33% [n=44] e 33% [n=44], respectivamente). Para IMP, CIP, CAZ, MER e PTZ os índices foram 29% [n=38], 26%[n=34], 25% [n=33], 23% [n=31] e 22% [n=29], respectivamente. A menor resistência foi observada para TOB, 17% [n=23] das amostras (Figura 2).

Figura 2 – Percentual de resistência de 133 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Hospital das Clínicas de Porto Alegre - RS



Legenda: AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem.

Fonte: Ferreira, 2013.

Ao avaliarmos o percentual de amostras não susceptíveis entre os fenótipos NM ou M verificamos que para os três aminoglicosídeos testados (AMI, GEN e TOB) e para CIP o número de amostras do fenótipo NM não susceptíveis foi maior que o de M e no caso da CIP (P=0,04) esta diferença foi estatisticamente significativa. Para todos os beta-lactâmicos e PTZ (P<0,05), o número de amostras M não susceptíveis foi estatisticamente maior que o de amostras NM (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Hospital das Clínicas de Porto Alegre resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide

Antimicrobiano (número de amostras resistentes)	Fenótipo		P[b]
	Não mucóide	Mucóide	
Amicacina (49)	**31**	**18**	**0,71**
Cefepime (44)	**20**	**24**	**0,01***
Gentamicina (44)	**30**	**14**	**0,25**
Imipenem (38)[a]	**16**	**21**	**0,01***
Ciprofloxacina (34)	**26**	**8**	**0,04***
Ceftazidima (33)	**11**	**22**	**0,004***
Meropenem (31)	**13**	**18**	**0,02***
Piperacilina-tazobactam (29)	**7**	**22**	**0,001***
Tobramicina (23)	**18**	**5**	**0,06**

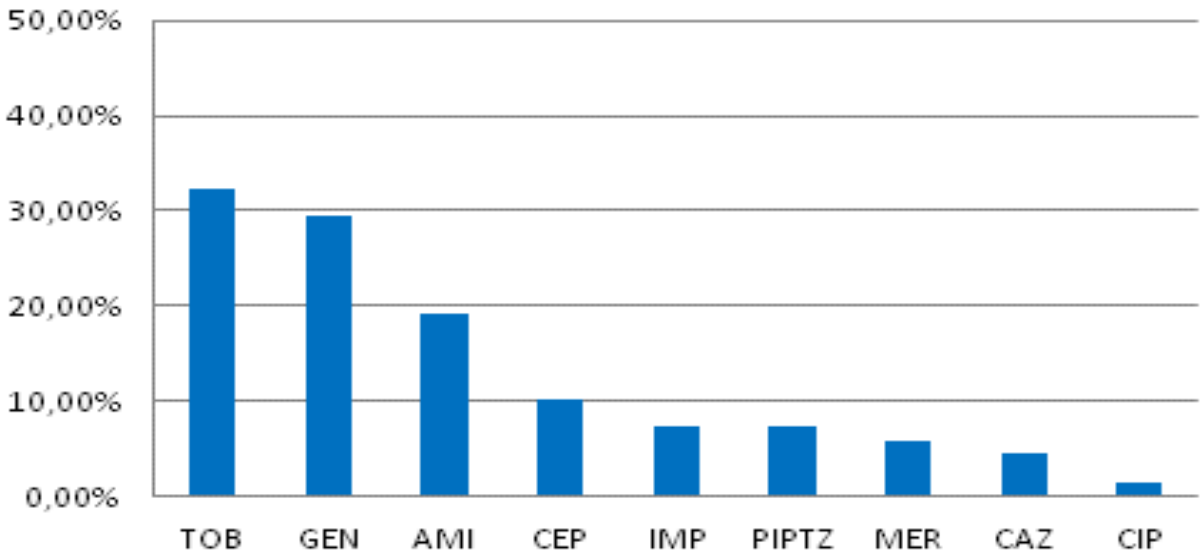
Legenda: [a]Uma amostra apresentou fenótipo SCV ; [b]Teste exato de Fisher – considerado significativo quando P<0,05*.

Fonte: Ferreira, 2013.

3.2.2.2 Instituto Fernandes Figueira - RJ

A Figura 3 mostra que dentre as 68 amostras oriundas do IFF - RJ, as maiores taxas de resistência foram verificadas para os aminoglicosídeos, TOB, GEN e AMI, 32,4% (n=22), 29,5% (n=20) e 19,2% (n=13), respectivamente. Percentuais inferiores foram observados para CEP (10,3%, n=7), IMP e PTZ (7,4%, n=5). Os percentuais de resistência a MER, CAZ e CIP, foram 5,9% (n=4), 4,5% (n=3) e 1,5% (n=1), respectivamente.

Figura 3 – Percentual de resistência de 68 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Instituto Fernandes Figueira - RJ



Legenda: AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem.

Fonte: Ferreira, 2013.

O número de amostras NM não sensíveis foi maior que o número de amostras M para os três aminoglicosídeos, porém esta diferença só foi significativa para TOB (P=0,003) e GEN (P=0,02). Para todos os outros antimicrobianos, o número de amostras M não sensíveis foi maior que o de NM, contudo em nenhum dos casos a diferença foi significativa (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Instituto Fernandes Figueira resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide

Antimicrobiano (número de amostras resistentes)	Fenótipo		P[a]
	Não mucóide	Mucóide	
Tobramicina (22)	**15**	**7**	**0,003***
Gentamicina (20)	**13**	**7**	**0,02***
Amicacina (13)	**7**	**6**	**0,53**
Cefepime (7)	**1**	**6**	**0,22**
Imipenem (5)	**-**	**5**	**0,06**
Piperacilina-tazobactam (5)	**-**	**5**	**0,06**
Meropenem (4)	**-**	**4**	**0,13**
Ceftazidima (3)	**-**	**3**	**0,25**
Ciprofloxacina (1)	**-**	**1**	**1,0**

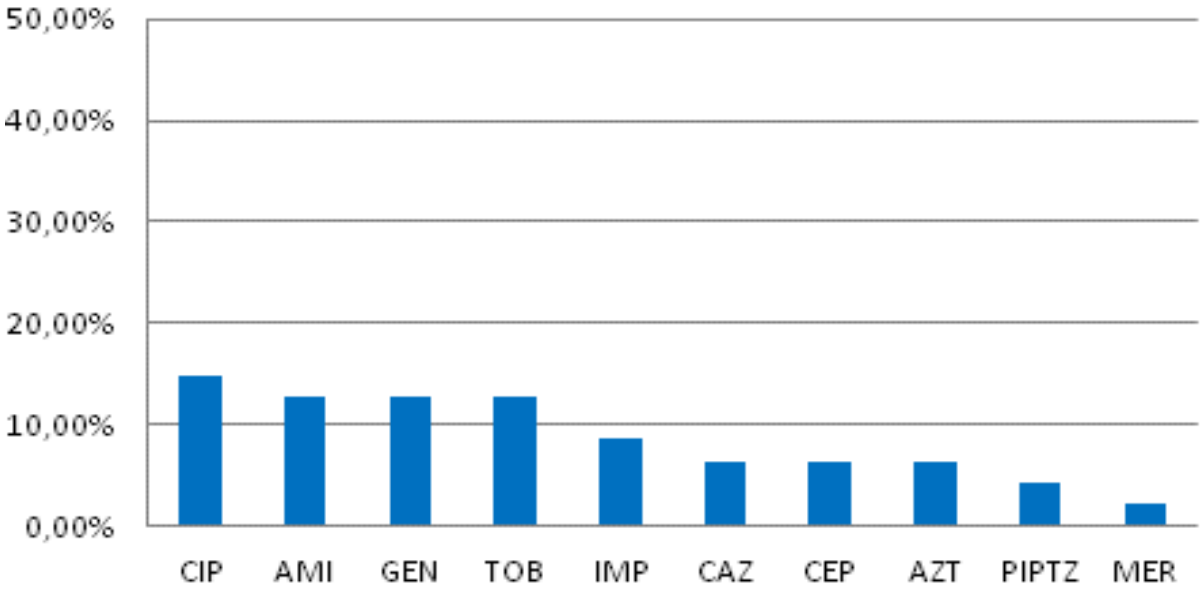
Legenda: [a]Teste exato de Fisher – considerado significativo quando P<0,05*.

Fonte: Ferreira, 2013.

3.2.2.3 Hospital Universitário Pedro Ernesto - RJ

Dentre as 47 amostras obtidas do HUPE - RJ, 14,9% (n=7) e 12,8% (n=6) não foram susceptíveis a CIP e aos aminoglicosídeos, respectivamente. Percentuais inferiores foram observados para os demais antimicrobianos: IMP (8,6%, n=4), CAZ (6,4%, n=3), CEP (6,4%, n=3), PTZ (4,3%, n=2) e MER (2,2%, n=1) (Figura 4).

Figura 4 – Percentual de resistência de 47 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Hospital Universitário Pedro Ernesto - RJ



Legenda: AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem.

Fonte: Ferreira, 2013.

O número de amostras NM não sensíveis foi maior que o de M para CIP e MER, enquanto para IMP, CAZ e CEP constatamos o oposto. Em nenhum dos casos a diferença foi estatisticamente significativa. Para GEN, AMI e PTZ, o número de amostras não sensíveis foi igual para os dois fenótipos (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Hospital Universitário Pedro Ernesto resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide

Antimicrobiano (número de amostras resistentes)	Fenótipo		P[a]
	Não mucóide	Mucóide	
Ciprofloxacina (7)	**5**	**2**	**0,27**
Tobramicina (6)	**3**	**3**	**1,0**
Gentamicina (6)	**3**	**3**	**1,0**
Amicacina (6)	**3**	**3**	**1,0**
Imipenem (4)	**1**	**3**	**1,0**
Ceftazidima (3)	**1**	**2**	**1,0**
Cefepime (3)	**1**	**2**	**1,0**
Piperacilina-tazobactam (2)	**1**	**1**	**1,0**
Meropenem (1)	**1**	**-**	**1,0**

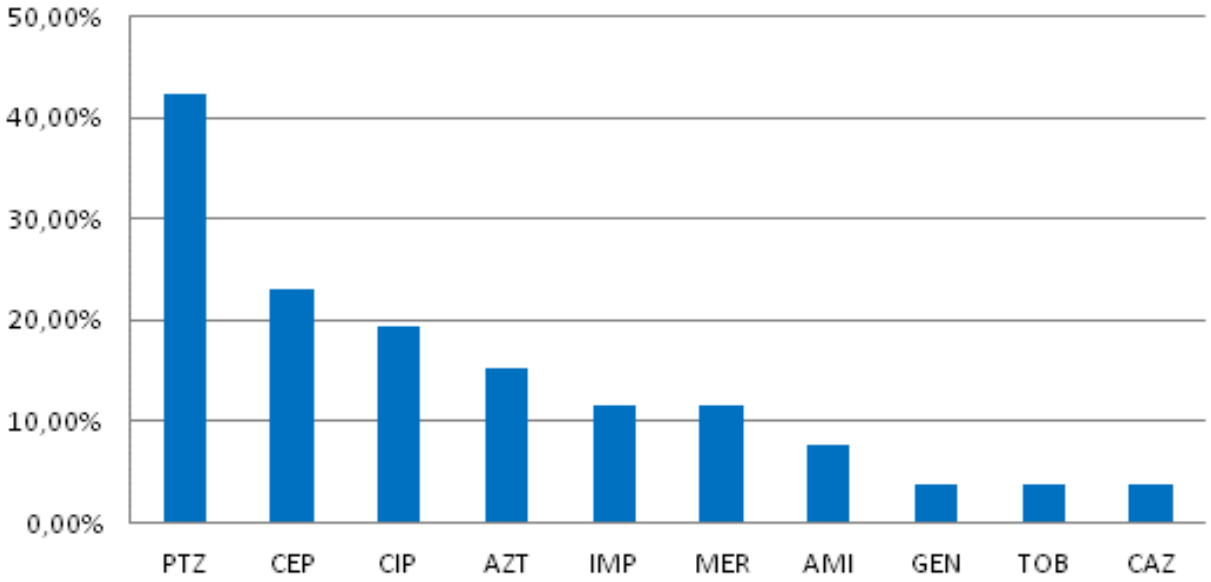
Legenda: [a]Teste exato de Fisher – considerado significativo quando P<0,05*.

Fonte: Ferreira, 2013.

3.2.2.4 Hospital Especializado Octávio Mangabeira - BA

A Figura 5 aponta que cerca de 43% (n=11) das 26 amostras originárias do HEOM - BA exibiram resistência a PTZ. Para CEP e CIP, as taxas de não susceptibilidade foram 23,1% (n=6) e 19,3% (n=5), respectivamente. Para os carbapenêmicos, a taxa de resistência foi de 11,6% (n=3). Para os demais antimicrobianos, os percentuais de amostras não sensíveis foi inferior a 10%.

Figura 5 – Percentual de resistência de 26 amostras de *P. aeruginosa* obtidas do Hospital Especializado Octávio Mangabeira - BA



Legenda: AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem.

Fonte: Ferreira, 2013.

O número de amostras NM não sensíveis foi maior que o de M para todos os antimicrobianos testados. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* do Hospital Especializado Octávio Mangabeira resistentes aos antimicrobianos de acordo com os fenótipos não mucóide e mucóide

Antimicrobiano (número de amostras resistentes)	Fenótipo		P[a]
	Não mucóide	Mucóide	
Piperacilina-tazobactam (11)	**10**	**1**	**0,17**
Cefepime (6)	**5**	**1**	**0,64**
Ciprofloxacina (5)	**4**	**1**	**1,0**
Imipenem (3)	**3**	**-**	**1,0**
Meropenem (3)	**3**	**-**	**1,0**
Amicacina (2)	**2**	**-**	**1,0**
Gentamicina (1)	**1**	**-**	**0,51**
Tobramicina (1)	**1**	**-**	**0,51**
Ceftazidima (1)	**1**	**-**	**0,51**

Legenda: [a]Teste exato de Fisher – considerado significativo quando P<0,05*.

Fonte: Ferreira, 2013.

3.3 Comparação dos perfis de resistência das amostras de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes atendidos nos quatro centros de referência avaliados

A Tabela 10 lista todos os perfis de resistência encontrados na amostragem avaliada. Verificamos a ocorrência de 51 perfis de resistência. O perfil prevalente incluía resistência concomitante aos três aminoglicosídeos (AMI, GEN e TOB) e foi identificado em 11 amostras. Contudo este perfil foi restrito aos centros de referência localizados no Rio de Janeiro (HUPE - RJ e IFF - RJ). O segundo perfil mais comum foi caracterizado pela resistência simultânea a GEN e TOB (encontrada em sete amostras) e foi exclusivo do IFF – RJ. Enquanto que, a resistência exclusiva a CIP (também encontrada em sete amostras) foi constatada no HUPE - RJ (RJ) e no HCPA (RS). A maioria dos perfis de resistência foi encontrada exclusivamente em

apenas uma amostra. Além disso, nenhum perfil foi encontrado simultaneamente nos quatro centros de referência incluídos neste estudo.

Tabela 10 - Distribuição dos perfis de resistência de *P. aeruginosa* por centro hospitalar de origem

Perfil de resistência[a]	HUPE	IFF	HCPA	HEOM	TOTAL
GEN-AMI-TOB	4	7			11
GEN-TOB		7			7
CIP	4		3		7
PTZ- CAZ-CEP-IMP-MER-GEN-AMI			6		6
GEN-AMI-TOB-CEP-CIP		1	5		6
IMP	1		5		6
GEN-AMI			6		6
PTZ- CEP-CAZ		1	3	1	5
PTZ- CAZ-CEP-IMP-MER			3	1	4
GEN-AMI-TOB-CIP	2		2		4
PTZ- CAZ-CEP-IMP-MER-GEN-AMI-TOB		1	2		3
PTZ				3	3
PTZ- CEP-CIP				2	2
PTZ- CAZ-CEP-IMP-MER-AMI			2		2
PTZ-CIP			1	1	2
PTZ-CEP-IMP-MER-GEN-AMI-TOB		2			2
GEN-AMI-TOB-CEP		1	1		2
IMP-MER-CIP			2		2
TOB		2			2
CAZ-CEP	1		1		2
PTZ- CAZ-CEP-IMP-MER-GEN-AMI-TOB-CIP			2		2
PTZ- CEP				1	1
PTZ- CEP-IMP				1	1
PTZ- CAZ-CEP-IMP			1		1
PTZ- CAZ-CEP-IMP-MER-GEN-CIP	1				1
IMP-MER				1	1
PTZ-CEP-IMP-MER-GEN-AMI-TOB-CIP				1	1
AMI-PTZ				1	1
PTZ-CEP-CAZ-IMP-GEN-AMI			1		1
CIP-MER				1	1
PTZ-CEP-GEN-AMI-TOB-CIP			1		1
CAZ-CEP-IMP-CIP			1		1
PTZ-CAZ-IMP	1				1
CEP-IMP	1				1
PTZ-CEP-IMP-MER-AMI			1		1
IMP-AMI-TOB-GEN		1			1
CAZ			1		1
GEN			1		1
CEP-GEN			1		1
AMI-GEN-TOB-IMP-MER-CIP			1		1
AMI-GEN-TOB-CAZ-CEP-CIP			1		1
PTZ-CEP-CAZ-MER-TOB			1		1
AMI-GEN-IMP-MER-CAZ-CEP-CIP			1		1
PTZ-CEP-CAZ-MER-AMI			1		1
AMI-IMP-CIP			1		1
AMI-GEN-TOB-IMP-MER-CEP-CAZ			1		1
AMI-TOB-IMP-MER-CAZ-CEP			1		1
PTZ-CEP-IMP-MER-GEN-AMI-CAZ-CIP			1		1
AMI-GEN-CEP-IMP			1		1
CAZ-CEP-MER			1		1
GEN-AMI-CIP			1		1
PTZ-CAZ-CEP-IMP-MER-CIP	1				1

Legenda: [a]Os perfis destacados foram classificados como multirresistentes; AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem; HUPE – Hospital Universitário

Pedro Ernesto – RJ; IFF – Instituto Fernandes Figueira – RJ; HCPA – Hospital das Clínicas de Porto Alegre – RS; HEOM – Hospital Especializado Octávio Mangabeira – BA.
Fonte: Ferreira, 2013

As amostras que apresentaram resistência simultânea a representantes de pelo menos três classes de antimicrobianos foram classificadas como multirresistentes (MR). Diante deste critério, encontramos 46 (16,7%) amostras MR. Ao analisarmos a distribuição desses fenótipos por centro verificamos que no HCPA - RS 35 de 133 amostras (26,3%) eram MR. No HEOM - BA, IFF - RJ e HUPE - RJ cinco de 26 (19,2%), quatro de 68 (5,8%) e duas de 47 (4,2%) exibiram esta característica. Apenas duas amostras (ambas do HCPA - RS) apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados (Tabela 10).

Observando a distribuição das amostras MR por paciente constatamos que 15 (20%) dos 75 incluídos no estudo apresentaram pelo menos uma amostra com este fenótipo. Destes 15, 40% eram pacientes do HCPA - RS e 27%, 10% e 5% eram pacientes do HEOM - BA, IFF - RJ e HUPE - RJ, respectivamente.

3.4 Pesquisa de genes associados à resistência aos carbapenêmicos

3.4.1 Metalo-β-lactamases

Dentre as 274 amostras do estudo, 54 (19,7%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos (IMP e/ou MER). Diante da importância deste fenótipo, estas amostras foram submetidas à técnica de PCR para detecção dos genes correspondentes as enzimas metalo-β-lactamases mais frequentes em *P. aeruginosa*: bla$_{IMP}$ (IMP), bla$_{VIM}$ (VIM) e bla$_{SPM}$ (SPM). Entretanto, nenhuma das 54 amostras testadas apresentou resultado positivo.

3.4.2 KPC (*Klebsiella pneumoniae* cabapenemase)

As 54 amostras resistentes aos carbapenêmicos também foram submetidas à técnica de PCR para amplificação do gene bla_{KPC} correspondente à enzima KPC. Contudo, nenhuma das amostras testadas apresentou resultado positivo para esse gene.

3.5 Análise do polimorfismo genético das amostras

As 274 amostras de *P. aeruginosa* incluídas no estudo foram submetidas à análise do polimorfismo genético através da técnica de PFGE. Verificamos a ocorrência de uma grande diversidade entre as amostras, sendo identificados 224 clones. Além disto, não foi observada a presença de clones circulantes entre os diferentes centros de onde as amostras foram obtidas.

Ao analisarmos isoladamente as 133 amostras do HCPA - RS identificamos 96 clones (Figura 6). A maioria dos pacientes (90%) apresentou infecção por clones diferentes e que só apareceram uma vez ao longo do período de estudo, entretanto em dois (10%) pacientes, HCPA4 e HCPA12, foi possível constatar a manutenção de um mesmo clone por 10 e oito meses, respectivamente (Tabela 11).

No IFF - RJ foram observados 60 clones dentre as 68 amostras e não houve um clone circulante (Figura 7). Apenas um paciente (IFF17) apresentou a persistência de um clone por cinco meses, os outros 19 tiveram a infecção marcada por clones diferentes (Tabela 12).

As 47 amostras obtidas do HUPE - RJ foram agrupadas em 43 clones distintos (Figura 8). Não houve clones circulantes ou compartilhados por mais de um paciente. Em um dos pacientes (HUPE3) constatamos a manutenção de um mesmo clone por cinco meses (Tabela13).

A figura 9 apresenta a relação clonal das 26 amostras obtidas do HEOM - BA. Foi possível identificar 25 clones. Todos os pacientes apresentaram infecção por clones diferentes que só foram encontrados uma vez em cada indivíduo (Tabela 14).

Figura 6 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *Spe*I das 133 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital das Clínicas de Porto Alegre (continua)

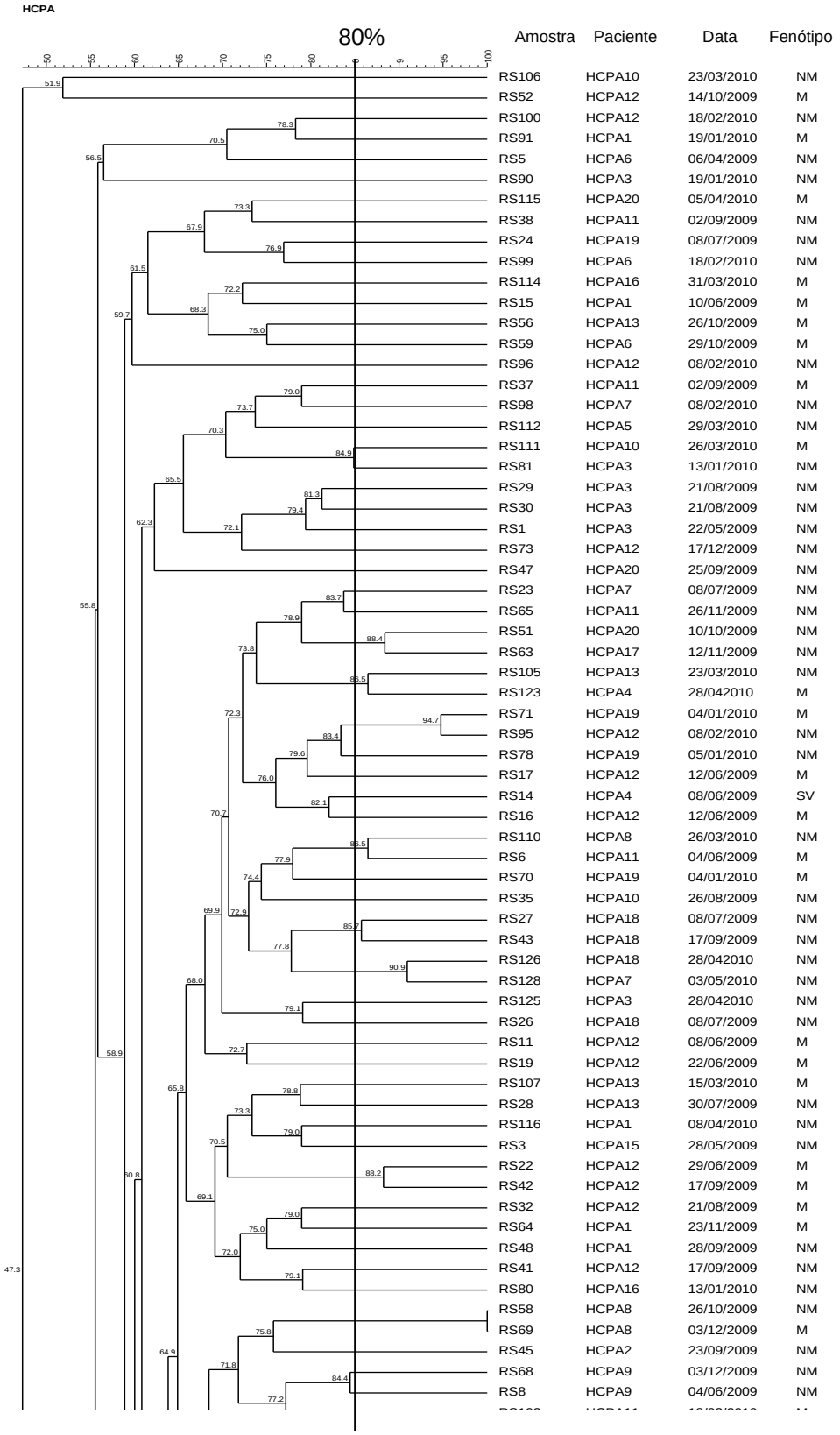
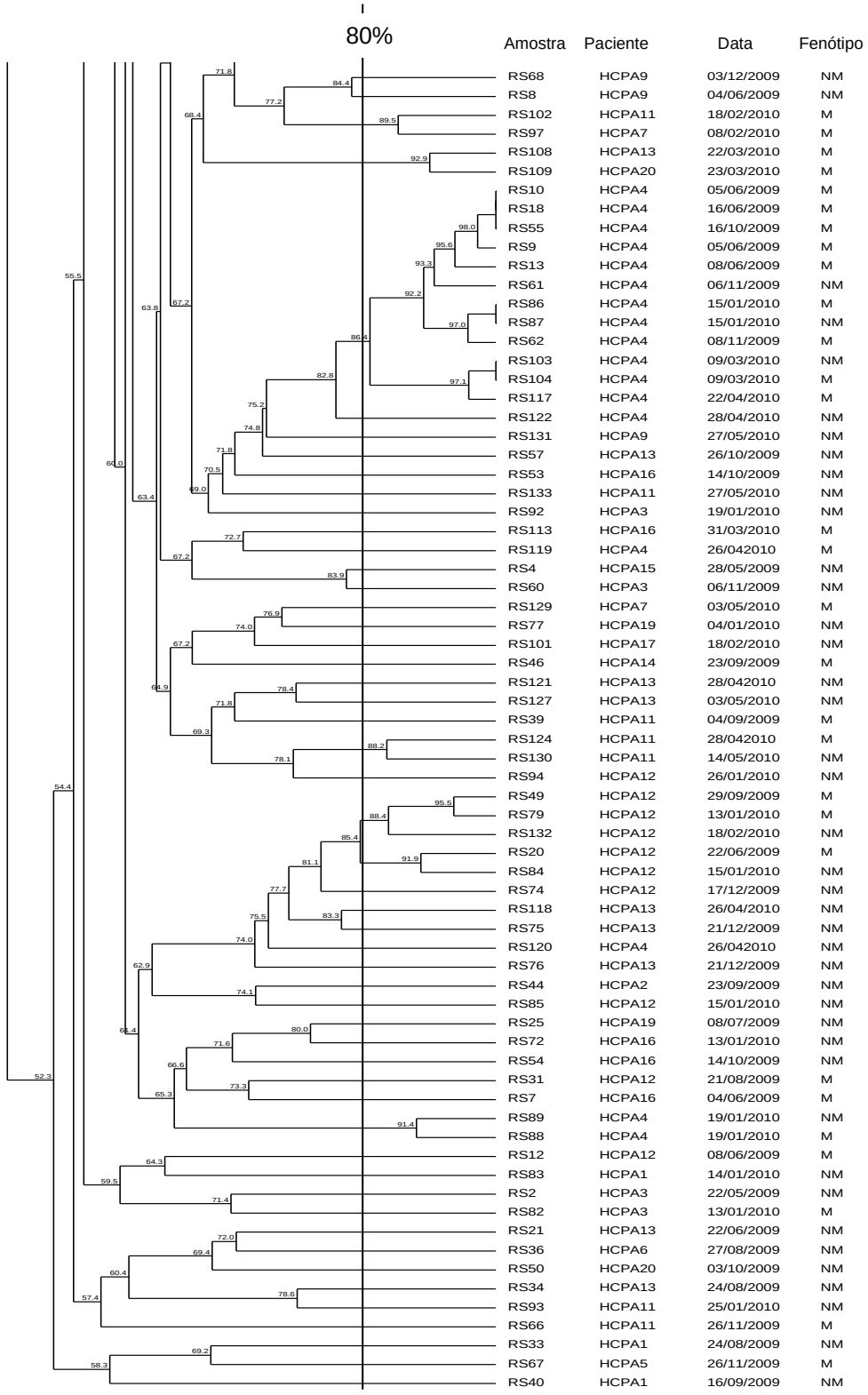


Figura 6 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *Spe*I das 133 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital das Clínicas de Porto Alegre (conclusão)



Fonte: Ferreira, 2013

Tabela 11 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (continua)

Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
HCPA1	8	1	1	
		2	1	
		3	1	
		4	1	
		5	1	
		6	1	
		7	1	
		8	1	
HCPA2	2	9	1	
		10	1	
HCPA3	10	11	1	
		12	1	
		13	2	
		14	1	
		15	1	
		16	1	
		17	1	
		18	1	
		19	1	
HCPA4	19	20	13	10
		21	1	
		22	2	
		23	1	
		24	1	
		25	1	
HCPA5	2	26	1	
		27	1	
HCPA6	4	28	1	
		29	1	
		30	1	
		31	1	
HCPA7	5	32	1	
		33	1	
		34	1	
		35	1	
		36	1	
HCPA8	3	37	2	2
		38	1	
HCPA9	3	39	2	6
		40	1	
HCPA10	3	41	1	
		42	1	
		15	1	

Tabela 11 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (continuação)

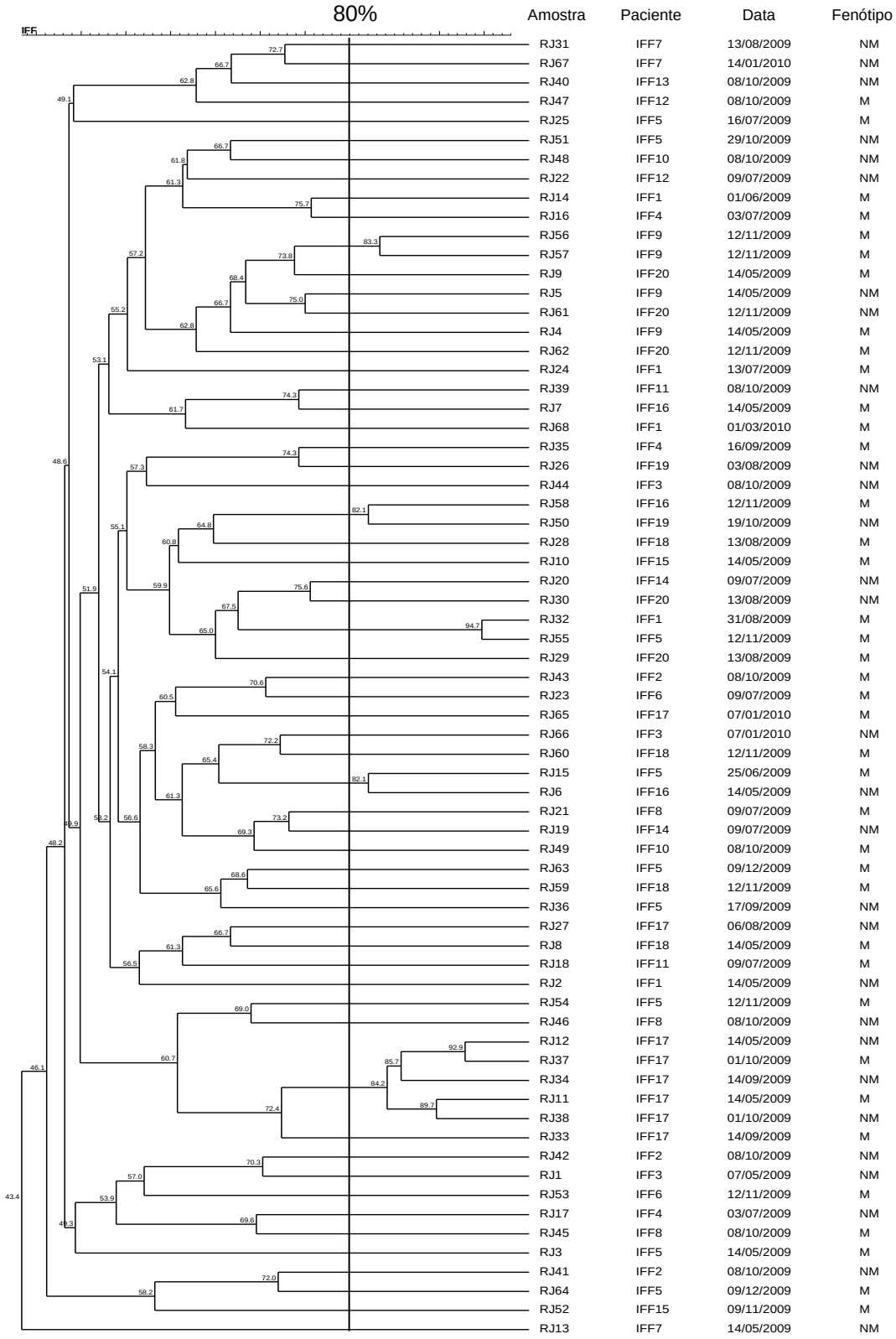
Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
HCPA11	11	38	1	
		43	1	
		44	1	
		45	1	
		32	1	
		47	1	
		48	1	
		33	1	
		49	2	
		50	1	
HCPA12	23	51	1	
		52	1	
		21	1	
		53	1	
		54	1	
		55	6	8
		56	2	3
		57	1	
		58	1	
		59	1	
		60	1	
		61	1	
		62	1	
		63	1	
		64	1	
		65	1	
		66	1	
HCPA13	13	67	1	
		68	1	
		69	1	
		70	1	
		71	1	
		72	2	4
		73	1	
		25	1	
		74	1	
		75	1	
		76	1	
		77	1	
HCPA14	1	78	1	
HCPA15	2	79	1	
		14	1	
HCPA16	7	80	1	
		81	1	
		82	1	
		83	1	
		84	1	
		85	1	
		86	1	
HCPA17	2	87	1	
		88	1	
HCPA18	4	89	1	
		90	2	2
		35	1	
HCPA19	6	91	1	
		83	1	
		92	1	
		63	2	

Tabela 11 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (conclusão)

Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
		93	1	
		94	1	
		95	1	
HCPA20	5	87	1	
		75	1	
		96	1	

Fonte: Ferreira, 2013

Figura 7 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *Spe*I das 68 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Instituto Fernandes Figueira



Fonte: Ferreira, 2013

Tabela 12 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Instituto Fernandes Figueira (continua)

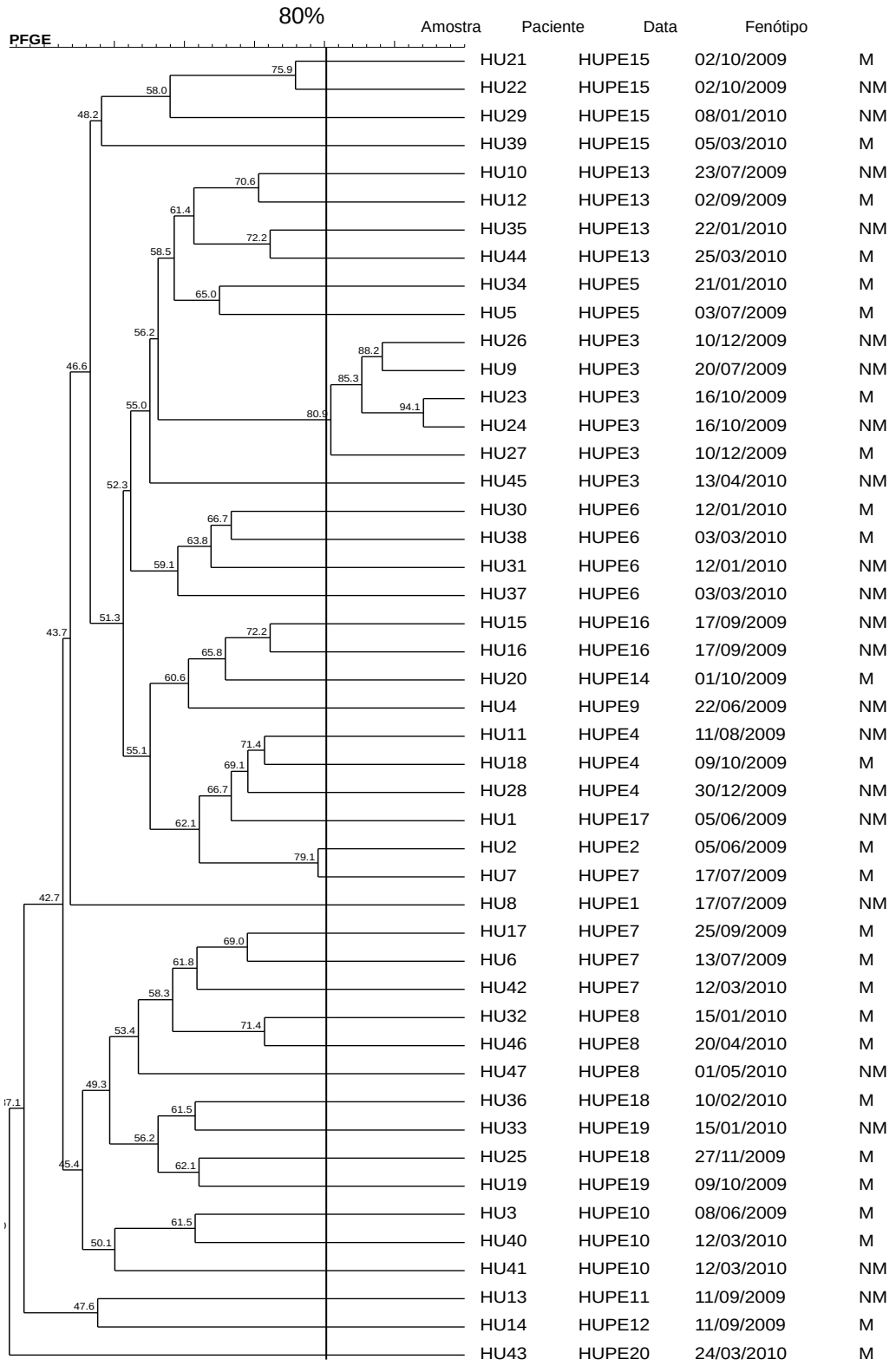
Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
IFF1	5	1	1	
		2	1	
		3	1	
		4	1	
		5	1	
IFF2	3	6	1	
		7	1	
		8	1	
IFF3	3	9	1	
		10	1	
		11	1	
IFF4	3	12	1	
		13	1	
		14	1	
IFF5	9	15	1	
		16	1	
		17	1	
		18	1	
		19	1	
		20	1	
		1	1	
		21	1	
		22	1	
IFF6	2	23	1	
		24	1	
IFF7	3	25	1	
		26	1	
		27	1	
IFF8	3	28	1	
		29	1	
		30	1	
IFF9	4	31	1	
		32	1	
		33	2	
IFF10	2	34	1	
		35	1	
IFF11	2	36	1	
		37	1	
IFF12	2	38	1	
		39	1	
IFF13	1	40	1	

Tabela 12 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Instituto Fernandes Figueira (conclusão)

Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
IFF14	2	41	1	
		42	1	
IFF15	2	43	1	
		44	1	
IFF16	3	16	1	
		45	1	
		46	1	
IFF17	8	47	5	5
		48	1	
		49	1	
		50	1	
IFF18	4	51	1	
		52	1	
		53	1	
		54	1	
IFF19	2	55	1	
		46	1	
IFF20	5	56	1	
		57	1	
		58	1	
		59	1	
		60	1	

Fonte: Ferreira, 2013

Figura 8 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *Spe*I das 47 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital Universitário Pedro Ernesto



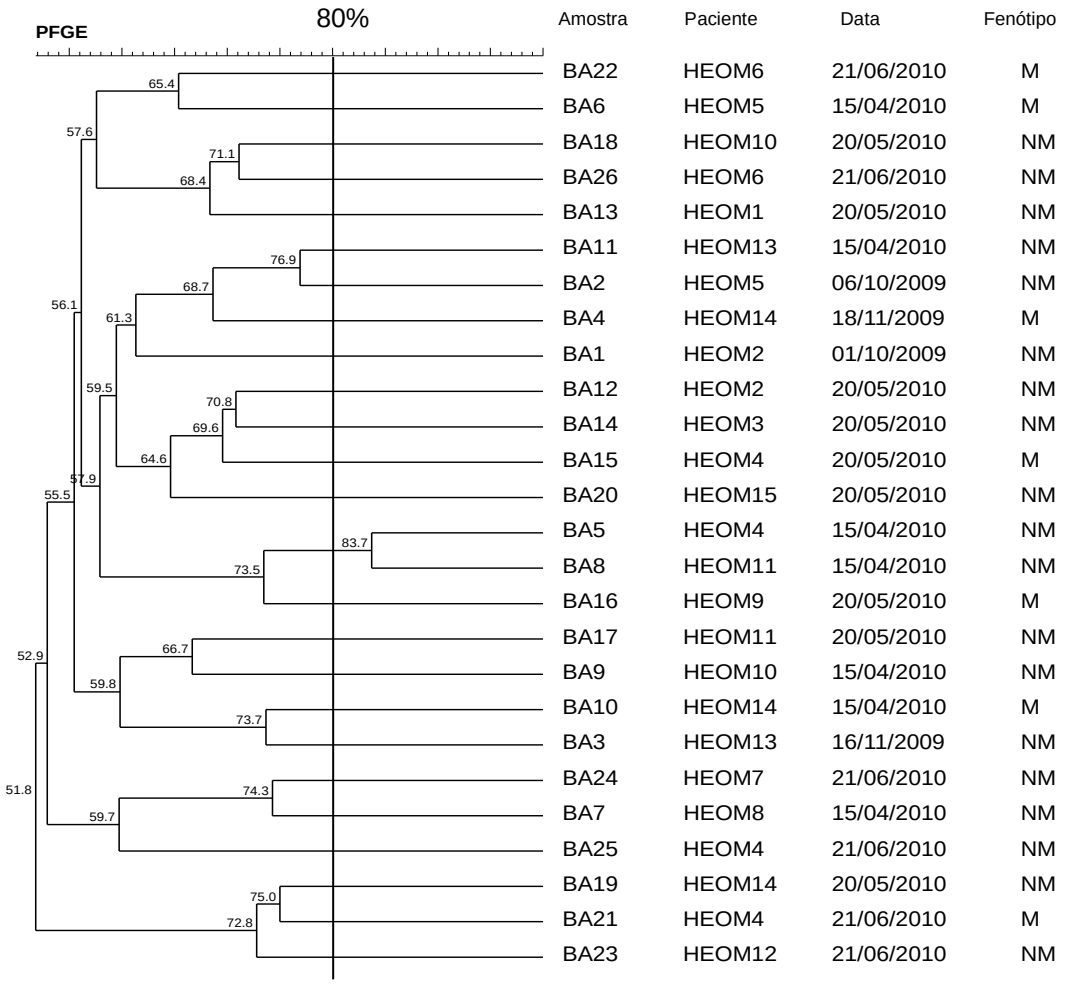
Fonte: Ferreira, 2013

Tabela 13 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 20 pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto

Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
HUPE1	1	1	1	
HUPE2	1	2	1	
HUPE3	6	3	5	5
		4	1	
HUPE4	3	5	1	
		6	1	
		7	1	
HUPE5	2	8	1	
		9	1	
HUPE6	4	10	1	
		11	1	
		12	1	
		13	1	
HUPE7	4	14	1	
		15	1	
		16	1	
		17	1	
HUPE8	3	18	1	
		19	1	
		20	1	
HUPE9	1	21	1	
HUPE10	3	22	1	
		23	1	
		24	1	
HUPE11	1	25	1	
HUPE12	1	26	1	
HUPE13	4	27	1	
		28	1	
		29	1	
		30	1	
HUPE14	1	31	1	
HUPE15	4	32	1	
		33	1	
		34	1	
		35	1	
HUPE16	2	36	1	
		37	1	
HUPE17	1	38	1	
HUPE18	2	39	1	
		40	1	
HUPE19	2	41	1	
		42	1	
HUPE20	1	43	1	

Fonte: Ferreira, 2013

Figura 9 - Dendrograma resultante da análise automatizada pelo método UPGMA, mostrando os coeficientes de similaridade, obtidos por eletroforese de campo pulsado, após digestão do DNA por *Spe*I das 26 amostras de *P. aeruginosa* obtidas no Hospital Especializado Octávio Mangabeira



Amostra	Paciente	Data	Fenótipo
BA22	HEOM6	21/06/2010	M
BA6	HEOM5	15/04/2010	M
BA18	HEOM10	20/05/2010	NM
BA26	HEOM6	21/06/2010	NM
BA13	HEOM1	20/05/2010	NM
BA11	HEOM13	15/04/2010	NM
BA2	HEOM5	06/10/2009	NM
BA4	HEOM14	18/11/2009	M
BA1	HEOM2	01/10/2009	NM
BA12	HEOM2	20/05/2010	NM
BA14	HEOM3	20/05/2010	NM
BA15	HEOM4	20/05/2010	M
BA20	HEOM15	20/05/2010	NM
BA5	HEOM4	15/04/2010	NM
BA8	HEOM11	15/04/2010	NM
BA16	HEOM9	20/05/2010	M
BA17	HEOM11	20/05/2010	NM
BA9	HEOM10	15/04/2010	NM
BA10	HEOM14	15/04/2010	M
BA3	HEOM13	16/11/2009	NM
BA24	HEOM7	21/06/2010	NM
BA7	HEOM8	15/04/2010	NM
BA25	HEOM4	21/06/2010	NM
BA19	HEOM14	20/05/2010	NM
BA21	HEOM4	21/06/2010	M
BA23	HEOM12	21/06/2010	NM

Fonte: Ferreira, 2013

Todos os dendrogramas foram construídos com os seguintes parâmetros: coeficiente de similaridade – Dice, otimização - 1% e tolerância - 1%

Tabela 14 - Distribuição dos clones de *P. aeruginosa* entre os 15 pacientes do Hospital Especializado Octávio Mangabeira

Paciente	Nº de amostras	Genótipo	Nº de amostras com o mesmo genótipo	Persistência do genótipo (meses)
HEOM1	1	1	1	
HEOM2	2	2 3	1 1	
HEOM3	1	4	1	
HEOM4[a]	4	5 6 7 8	1 1 1 1	
HEOM5	2	9 10	1 1	
HEOM6	2	11 12	1 1	
HEOM7	1	13	1	
HEOM8	1	14	1	
HEOM9	1	15	1	
HEOM10	2	16 17	1 1	
HEOM11[a]	2	5 18	1 1	
HEOM12	1	19	1	
HEOM13	2	20 21	1 1	
HEOM14	3	22 23 24	1 1 1	
HEOM15	1	25	1	

Legenda: [a] Pacientes irmãos.

Fonte: Ferreira, 2013

Neste trabalho verificamos a ocorrência de clones compartilhados por dois pacientes em 16 situações, das quais, 12 no HCPA – RS, três no IFF – RJ e uma no HEOM – BA. Todos os pacientes incluídos nesta análise não apresentavam relação de parentesco, exceto no HEOM – BA, onde os dois pacientes que compartilharam o mesmo clone (HEOM4 e HEOM11) eram irmãos (Tabela 15).

No HCPA – RS os pacientes HCPA12 e HCPA19 apresentaram três amostras com o mesmo perfil clonal, em todos os outros casos apenas duas amostras foram compartilhadas. O intervalo de isolamento entre os clones variou de um dia a nove meses. Houve uma grande diversidade no perfil de resistência intraclonal, exceto nos clones que exibiram susceptibilidade a todos os antimicrobianos. No IFF – RJ o intervalo de isolamento variou de um até três meses e todas as amostras apresentaram perfis de resistência distintos. Enquanto no HEOM – BA as amostras pertencentes ao mesmo clone obtidas dos pacientes irmãos foram isoldas na mesma data e apresentaram o mesmo perfil de resistência (Tabela 15).

Tabela 15 - Características dos clones de *P. aeruginosa* compartilhados por pacientes relacionados e não relacionados

Clone	Centro	Paciente	Amostra	Data de isolamento	Fenótipo de resistência
15	HCPA	HCPA3	RS81	13/01/2010	-
		HCPA10	RS111	26/03/2010	AMI-CAZ-CEP-CIP-GEN-IMP-MER-PTZ
33	HCPA	HCPA7	RS23	08/07/2009	AMI-GEN
		HCPA11	RS65	26/11/2009	-
87	HCPA	HCPA20	RS51	10/10/2009	CAZ-CEP-CIP-IMP
		HCPA17	RS63	12/11/2009	GEN
25	HCPA	HCPA13	RS105	23/03/2010	-
		HCPA4	RS123	28/04/2010	AMI-CAZ-CEP-IMP-MER-PTZ
63	HCPA	HCPA19	RS71	04/01/2010	AMI
		HCPA12	RS95	08/02/2010	AMI-CIP-IMP
		HCPA19	RS78	05/01/2010	-
21	HCPA	HCPA4	RS14	08/06/2009	IMP
		HCPA12	RS16	12/06/2009	CAZ-CEP-IMP-MER-PTZ
38	HCPA	HCPA11	RS6	04/06/2009	-
		HCPA8	RS110	26/03/2010	CIP
35	HCPA	HCPA18	RS126	28/04/2010	-
		HCPA7	RS128	03/05/2010	AMI-CIP-GEN
32	HCPA	HCPA7	RS97	08/02/2010	-
		HCPA11	RS102	18/02/2010	-
75	HCPA	HCPA13	RS108	22/03/2010	-
		HCPA20	RS109	23/03/2010	-
14	HCPA	HCPA15	RS4	28/05/2009	-
		HCPA3	RS60	06/11/2009	AMI-CIP-GEN-TOB
83	HCPA	HCPA19	RS25	08/07/2009	IMP
		HCPA16	RS72	13/01/2010	AMI-CEP-CIP-GEN-IMP-MER
46	IFF	IFF19	RJ50	19/10/2009	AMI-GEN-TOB
		IFF16	RJ58	12/11/2009	-
1	IFF	IFF1	RJ32	31/08/2009	-
		IFF5	RJ55	12/11/2009	AMI-CAZ-CEP-GEN-IMP-MER-PTZ-TOB
16	IFF	IFF5	RJ15	25/06/2009	CAZ-CEP-PTZ
		IFF16	RJ6	14/05/2009	-
5	HEOM	HEOM4[a]	BA5	15/04/2010	CEP-IMP-PTZ
		HEOM11[a]	BA8	15/04/2010	CEP-IMP-PTZ

Legenda : AMI – Amicacina; GEN – Gentamicina; CEP – Cefepime; TOB – Tobramicina; IMP – Imipenem; CIP - Ciprofloxacina; PTZ – Piperacilina/Tazobactam; CAZ – Ceftazidima; MER – Meropenem ; IFF – Instituto Fernandes Figueira – RJ ; HCPA – Hospital das Clínicas de Porto Alegre – RS ; HEOM – Hospital Especializado Octávio Mangabeira – BA; [a] Pacientes irmãos.
Fonte: Ferreira, 2013

3.6 Sequenciamento dos genes *mucA* e *lasR*

As amostras de *P.aeruginosa* de três pacientes, HCPA4, HUPE3 e IFF17, que apresentaram isolados com o mesmo genótipo (clones 20, 47 e 3, respectivamente) na maior parte do período do estudo foram submetidas ao sequenciamento dos genes *mucA* e *lasR*, sendo 13 amostras de um paciente atendido no HCPA - RS, além de seis e cinco amostras de pacientes atendidos no IFF - RJ e no HUPE - RJ, respectivamente, perfazendo um total de 24 amostras. A Tabela 12 mostra a comparação com a cepa padrão PAO1, indicando que 14 (58%) das 24 amostras exibiram mutações em pelo menos um dos genes analisados (*lasR* ou *mucA*). O gene *mucA* foi o que apresentou o maior número de amostras com mutações, 13 (54%) das 24 amostras, porém duas dessas amostras apresentaram apenas mutações silenciosas, determinando um códon que não altera o aminoácido. Outras sete amostras exibiram mutações silenciosas concomitantemente com mutações que codificam um códon de parada. Foi identificado o mesmo tipo de inserção de dois pares de bases em duas amostras acarretando em mutações do tipo *frameshift* que levam a inativação do gene (Tabela 16).

Na análise do gene *lasR* verificou-se que 8 (33%) amostras apresentaram mutações, duas delas com mutações silenciosas. Em quatro (16%) amostras ocorreram substituições simples indicando uma provável perda de função da proteína. Uma inserção de três pares de bases foi visualizada em duas amostras, acarretando em mutações do tipo *frameshift* (Tabela 16).

Na análise por pacientes observamos que cerca de 85% das amostras do paciente do HCPA - RS apresentaram mutações em pelo menos um dos genes. Nos pacientes do IFF - RJ e do HUPE - RJ os índices foram de 33% e 20%, respectivamente (Tabela 16).

Ao relacionarmos os fenótipos NM e M com a presença de mutações constatamos que nove (69%) das treze amostras M apresentaram mutações no gene *mucA*, porém uma delas com mutação silenciosa, enquanto quatro (36%) das 11 NM exibiram mutações neste gene, duas com mutações silenciosas. Já para o gene *lasR*, quatro (30%) das 13 amostras M apresentaram mutações e quatro (36%) amostras NM demonstraram mutações neste gene.

Tabela 16 - Mutações nos genes *mucA* e *lasR* em 24 amostras de *P. aeruginosa*

Paciente	Amostra	Centro de atendimento	Data de isolamento	Morfotipo	Mutações no gene *lasR*	Mutações no gene *mucA*
HCPA4	9	HCPA	05/06/2009	M	n	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	10		05/06/2009	M	n	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	13		08/06/2009	M	C475T: silenciosa	A342G:sienciosa; C367T: Gln123 cp
	18		16/06/2009	M	C314A: Ala105Asp	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	55		16/10/2009	M	n	n
	61		06/11/2009	NM	n	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	62		08/11/2009	M	n	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	86		15/01/2010	M	inserção CAG em 162: frameshift	inserção AC em 481: frameshift
	87		15/01/2010	NM	inserção CAG em 162: frameshift	inserção AC em 481: frameshift
	103		09/03/2010	NM	C462T: silenciosa	A342G:silenciosa
	104		09/03/2010	M	n	n
	117		22/04/2010	M	n	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	122		28/04/2010	NM	C314A: Ala105Asp	A342G:silenciosa
IFF17	11	IFF	14/05/2009	M	n	n
	12		14/05/2009	NM	n	n
	33		14/09/2009	M	n	A342G:silenciosa
	34		14/09/2009	NM	n	n
	37		01/10/2009	M	G326T: Gly109Val	A342G:silenciosa; C367T: Gln123 cp
	38		01/10/2009	NM	n	n
HUPE3	9	HUPE	20/07/2009	NM	n	n
	23		16/10/2009	M	n	n
	24		16/10/2009	NM	n	n
	26		10/12/2009	NM	n	n
	45		13/04/2010	NM	C646T: Arg216Trp	n

Legenda: HCPA – Hospital das Clínicas de Porto Alegre; IFF – Instituto Fernandes Figueira, HUPE – Hospital Universitário Pedro Ernesto; NM – Não mucóide; M – Mucóide; n – nenhuma.

4 DISCUSSÃO

A FC é a doença genética mais comum no ocidente, sendo caracterizada por mutações no gene *cftr* que provocam alterações no transporte de eletrólitos em diversos órgãos. No epitélio respiratório isto acarreta na produção de uma espessa camada de muco desidratado, o que interfere com o “clearance” mucociliar e cria um ambiente favorável à colonização de diversos patógenos (Boucher, 2007; Ashish *et al.*, 2011).

A microbiota do trato respiratório destes pacientes é composta por múltiplas espécies bacterianas coexistindo, contudo a *P. aeruginosa* destaca-se como o patógeno mais importante, já que cerca de 70% dos indivíduos adultos são colonizados e as infecções pulmonares causadas por este agente são a principal causa de morbidade e mortalidade neste grupo de indivíduos (Koch, 2002; Hogardt & Heesemann, 2010).

Diversos trabalhos pelo mundo têm abordado aspectos como a resistência a antimicrobianos, virulência e epidemiologia das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* na FC (Pitt *et al*.,2003, Manno *et al*., 2005, Mena *et al*., 2008, Bragonzi *et al*., 2009), porém no Brasil, onde há cerca de 3200 pacientes com FC (http//www.abram.org.br acesso em janeiro de 2013), são poucos os estudos acerca destes assuntos e todos apresentam caráter local (Silbert, Barth & Sader, 2001; Leão *et al*., 2010; Stehling, Leite & Silveira, 2010).

Este trabalho destaca-se por ser o primeiro em nosso país com uma abordagem prospectiva e multicêntrica, pois foram selecionadas, entre maio de 2009 e junho de 2011, amostras de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes com FC com pelo menos dois anos de infecção pulmonar crônica atendidos em quatro centros de referência (HCPA-RS, HEOM-BA, HUPE-RJ e IFF-RJ) localizados em três regiões distintas (Sul, Nordeste e Sudeste). A infecção crônica foi definida em consenso pelas equipes médicas dos centros como a ocorrência de pelo menos três culturas positivas para *P. aeruginosa* no período de um ano, com intervalo de pelo menos um mês entre elas.

Inicialmente foram selecionados 20 pacientes em cada centro, porém no HEOM - BA não foi possível alcançar este número, pois apenas 15 pacientes atenderam aos critérios estabelecidos. A partir dos 75 pacientes foram obtidas 274

amostras, das quais 133 do HCPA - RS, 68 do IFF - RJ, 47 do HUPE - RJ e 26 do HEOM - BA. No HEOM - BA, o pequeno número de amostras é reflexo do menor número de pacientes, mas também pode estar relacionado a condições socioeconômicas da população se comparada a outras regiões, o que interfere com a regularidade do acompanhamento médico destes indivíduos. Já no HCPA - RS, o número elevado de amostras provavelmente resulta das melhores condições sociais da população gaúcha e também de uma quantidade maior de exacerbações nos pacientes incluídos no estudo.

A *P. aeruginosa* é sabidamente uma bactéria com distribuição ubíqua e por muitos anos a hipótese prevalente foi a de que o ambiente era a principal fonte de infecção para os pacientes com FC. Durante as fases iniciais da infecção, esta seria marcada pelo isolamento intermitente de diferentes clones do trato respiratório do paciente até o estabelecimento da infecção crônica, na qual o mesmo clone passaria a ser detectado frequentemente nos espécimes clínicos (Cramer, Wiehlmann & Tummler, 2010). Contudo, a cerca de duas décadas diversos trabalhos tem demonstrado a ocorrência da transmissão cruzada entre pacientes sem relação familiar na Europa, América do Norte e Austrália. Foram descritos alguns clones altamente transmissíveis (LES, Manchester, Clone C, Midlands e AES) capazes de substituir o clone original em pacientes crônicos (Romling *et al*., 1994; Cheng *et al*, 1996; Jones *et al*., 2001; Scott & Pitt, 2004).

Ao analisarmos o polimorfismo genético das 274 amostras não verificamos a existência de nenhum “cluster” de amostras relacionadas incluindo pacientes de centros diferentes, o que difere substancialmente dos dados obtidos por Scott & Pitt (2004), que em 1225 amostras obtidas de 31 centros na Inglaterra e no País de Gales verificaram a ocorrência de um mesmo clone em até 15 centros diferentes.

Van Mansfeld e colaboradores (2009) analisaram 443 amostras obtidas de 265 pacientes com FC atendidos em dois centros da Holanda e constataram a ocorrência de um mesmo clone em 20% dos pacientes. Em outro estudo semelhante, Fluge e colaboradores (2001) executaram a tipagem molecular de 71 amostras obtidas de 60 pacientes atendidos em diversos centros da Noruega e identificaram um “cluster” com amostras semelhantes em 45% dos pacientes.

Todavia, existem trabalhos que relatam um cenário diferente na epidemiologia das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* em pacientes com FC. Speert e colaboradores (2001) e Vosahlikova e colaboradores (2007) apresentaram

resultados semelhantes analisando amostras do Canadá e da República Tcheca, respectivamente. A tipagem molecular de amostras obtidas de vários centros dos dois países revelou uma grande diversidade genotípica e a ausência de transmissão cruzada de clones entre os pacientes. Em um estudo recente, Cramer e colaboradores (2012) analisaram amostras de 35 pacientes atendidos em Hanover, Alemanha, desde a década de 1980 e não identificaram nenhum clone prevalente até o ano de 2010. Os mesmos autores sugerem que a conduta frente às infecções por *P. aeruginosa*, principalmente no âmbito da antibioticoterapia adotada e do controle de infecções, é a principal responsável por estes dados epidemiológicos.

No Brasil, um país de imensas dimensões territoriais, o quadro da epidemiologia molecular destas infecções apresenta informações bastante limitadas já que os poucos trabalhos com esta abordagem mantiveram-se restritos a inclusão de pacientes de um ou dois centros sempre localizados na mesma cidade. Esta realidade reitera a importância do presente trabalho como um passo inicial na construção de dados nacionais que possam servir de referência para futuras comparações.

Na análise epidemiológica individual de cada instituição verificamos que também não houve clones prevalentes em nenhum dos quatro centros. No HCPA - RS a ocorrência de pares de pacientes sem relação familiar compartilhando um mesmo clone se repetiu 11 vezes. Dados semelhantes foram encontrados anteriormente por Silbert, Barth & Sader (2001), quando 97 amostras obtidas de 43 pacientes atendidos no HCPA - RS foram submetidas à tipagem molecular e constatou-se que apenas um par de pacientes sem relação familiar compartilhou amostras com o mesmo perfil clonal, permitindo concluir que a transmissão cruzada não era comum naquela população e este cenário não sofreu alterações significativas.

Leão incluiu em seu estudo 179 amostras isoladas de 20 pacientes atendidos no IFF - RJ e no HUPE - RJ entre 2002 e 2006. A tipagem molecular por RAPD revelou que apesar de não haver um clone disseminado a presença de amostras com mais de 80% de similaridade foi verificada em até sete pacientes distintos. Dados semelhantes não foram encontrados em nosso trabalho, já que no IFF - RJ apenas pares de pacientes compartilharam um mesmo clone e no HUPE - RJ esta situação não ocorreu. Esta discrepância pode estar associada à metodologia utilizada em cada um dos estudos, pois a técnica de PFGE está estabelecida na

literatura como o padrão ouro para este tipo de análise, e sem dúvida apresenta características discriminatórias mais eficazes.

O pequeno número de amostras obtidas no HEOM - BA não possibilita conclusões absolutas acerca da epidemiologia das infecções por *P. aeruginosa* nos pacientes com FC deste local, porém é imprescindível destacar a ocorrência de um mesmo perfil clonal sendo compartilhado por dois irmãos, um evento previsto na literatura, já que o contato prolongado entre os indivíduos possivelmente favorece a transmissão cruzada deste patógeno.

A ausência de clones disseminados dentro ou entre os diferentes centros suscita a hipótese de que em nossa população a principal fonte de aquisição das amostras de *P. aeruginosa* é o ambiente. Entretanto, esta circunstância não afasta a necessidade de um contínuo monitoramento da epidemiologia molecular destas infecções.

Dados da literatura internacional têm demonstrado que o estabelecimento da infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* está associado à manutenção de um único clone no trato respiratório dos pacientes e diversos estudos longitudinais vêm comprovando este cenário (Burns *et al*., 2001; Cramer, Wiehlmann & Tummler, 2010; Tramper-Stranders *et al*., 2011). Van Daele e colaboradores (2005) acompanharam 76 pacientes atendidos em um centro de reabilitação na Bélgica e constataram que 64% carreavam apenas um clone. Mais recentemente, Sobral e colaboradores (2012) analisaram 83 amostras de *P. aeruginosa* obtidas de oito pacientes atendidos em um centro da França ao longo de oito anos e verificaram que cada paciente manteve o mesmo clone por todo o estudo.

Nossos dados apontam para um cenário bastante distinto, já que em nossa população verificamos que dos 75 pacientes incluídos, apenas quatro (5%) mantiveram a infecção pelo mesmo clone na maior parte do estudo, enquanto todos os outros apresentaram dois ou mais clones diferentes. Apesar de se tratar de um resultado inesperado, dados semelhantes podem ser encontrados na literatura. No Brasil, Silbert, Barth & Sader (2001) haviam relatado que cinco de 23 pacientes apresentaram infecção por múltiplos clones no período de 13 meses, porém os autores não selecionaram indivíduos com infecção crônica. Cramer e colaboradores (2012) acompanharam 12 pacientes atendidos em Copenhagen, Dinamarca desde a década de 1970 até 1999 e constataram que apenas um paciente manteve o mesmo clone ao longo do estudo, enquanto os outros onze pacientes foram vítimas da co-

colonização por múltiplos clones. Estes dados sugerem que mesmo em pacientes com infecção pulmonar crônica, o clone original pode ser substituído por outros mais bem adaptados, o que pode estar relacionado à faixa etária da população analisada e ao tempo de infecção crônica de cada indivíduo.

Na espécie humana, as vias aéreas representam um ambiente altamente compartimentalizado, configurando diferentes habitats, o que no paciente com FC é potencializado pelas diferenças na resposta inflamatória resultantes dos focos distintos de infecção. Estes micro-habitats impõem uma pressão seletiva evidenciada através da adaptação genética e da heterogeneidade fenotípica observada em amostras de *P. aeruginosa* obtidas destes pacientes (Folkesson *et al*., 2012).

Uma das alterações mais comumente descritas é a conversão para o fenótipo M, que é caracterizada pela hiperprodução do exopolissacarídeo alginato e é geralmente aceita como um marcador padrão para o estabelecimento da infecção crônica. A mudança para o fenótipo M é resultado principalmente de mutações que levam a perda da função do gene *mucA* no operon para biossíntese de alginato (Hogardt & Heesemann, 2010).

A hiperprodução de alginato protege a bactéria de condições ambientais adversas, como dessecação, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, fagocitose e alta osmolaridade, contudo o fenótipo M é raramente encontrado em outras infecções por *P. aeruginosa* e em amostras ambientais, portanto é possível concluir que se trata de um processo de adaptação ao ambiente pulmonar do paciente com FC (Yang, Jelsbak & Molln, 2011).

Em nosso trabalho verificamos que o número de amostras M só foi maior que o de NM em dois dos quatro centros estudados (IFF - RJ e HUPE - RJ), além disso, na maioria dos pacientes (62,6%) constatamos a ocorrência dos dois fenótipos ao longo do período de análise, estes dados sugerem que, apesar dos nossos pacientes apresentarem infecção crônica, diferentemente do que é preconizado, esta foi marcada pela presença intermitente de ambos os fenótipos.

Apesar das vantagens adaptativas do fenótipo M, o isolamento simultâneo dos dois fenótipos em pacientes com infecção crônica tem sido descrito rotineiramente. Jelsbak e colaboradores (2007) analisaram 122 amostras de *P. aeruginosa* obtidas de sete pacientes da Dinamarca com infecção pulmonar crônica por mais de 20 anos identificando em dois pacientes uma colonização por um longo

período de tempo apenas por amostras NM, além disso, em outros três pacientes eles isolaram de forma consistente amostras dos dois fenótipos. De acordo com os autores, cepas M e NM ocupariam nichos diferentes no ambiente pulmonar dos pacientes com FC, o que possibilitaria a coexistência de ambas.

Em um trabalho bastante relevante, Li e colaboradores (2005) acompanharam de forma prospectiva 56 pacientes atendidos em dois centros dos Estados Unidos desde o nascimento até os 16 anos de idade, entre 1985 e 2004. Os autores identificaram em sua população que a primeira cepa de *P. aeruginosa* NM era adquirida com a idade média de um ano enquanto a cepa M era primariamente diagnosticada na idade média de 13 anos. Além disso, constataram que o período de transição entre o aparecimento das duas cepas era relativamente longo, 10,9 anos e que em pacientes sob antibioticoterapia contra a *P. aeruginosa*, este tempo poderia ser ainda maior.

Os 20 pacientes atendidos no HCPA - RS incluídos em nosso estudo apresentaram uma idade bastante heterogênea (entre dois e 30 anos), já os pacientes do HEOM - BA podem ser incluídos no intervalo de transição entre os fenótipos NM e M, estes dois fatos podem justificar a ocorrência de mais amostras NM nos dois centros citados.

Atualmente sabe-se que o fator anti-sigma MucA não atua apenas da regulação da expressão do alginato, diversos trabalhos tem descrito sua participação indireta no controle da expressão de alguns fatores de virulência como flagelo, pili e o sistema de secreção do tipo III além do seu envolvimento na resposta ao estresses osmótico e oxidativo. Este fato seria consequência da sua ligação ao fator sigma AlgT, portanto mutações no gene *mucA* também tem sido associadas a uma atenuação da virulência e a um aumento da proteção ao estresses citados acima, alterações frequentemente identificadas na infecção pulmonar crônica em FC (Wu *et al*., Rau *et al*., 2010, Folkesson *et al*., 2012).

Tart e colaboradores (2005) demonstraram que em amostras de *P. aeruginosa* a expressão de genes ligados à síntese de flagelo é inversamente proporcional a hiperprodução de alginato, já que o fator AlgT atuaria de forma oposta na regulação destas duas vias, este fato favorece a adaptação da bactéria ao ambiente pulmonar, pois a flagelina é sabidamente um agente imunizante e a redução da sua produção promove uma diminuição na resposta imune do hospedeiro.

A fim de analisar a frequência de mutações no gene *mucA* em nossa amostragem nós selecionamos três pacientes que mantiveram um mesmo clone ao longo do estudo e de um total de 24 amostras constatamos que 13 (54%) apresentaram alterações no gene. Oito (61,5%) destas amostras exibiram mutações que levam a formação precoce de um códon de parada. Pulcrano e colaboradores (2012) sugerem que o tamanho do fator MucA tem um papel preponderante na sua função, pois a ocorrência de códons de parada que levam a interrupção prematura da proteína alterariam o domínio de ligação desta com o fator AlgT. Estes dados indicam que em nossa amostragem as mutações no gene *mucA* também representam um papel importante na adaptação das amostras de *P. aeruginosa* ao pulmão do FC.

A ocorrência de mutações no gene *mucA* é o mecanismo mais frequente na conversão para o fenótipo M, porém, não o único. As proteínas MucB e MucD também regulam negativamente o fator AlgT, portanto mutações em seus respectivos genes podem promover a mudança de morfotipo em *P. aeruginosa* (Wood & Ohman, 2006). Ciofu e colaboradores (2008), em um trabalho que incluiu 115 pacientes com FC da Escandinávia, identificaram que 7% das amostras M apresentaram o gene *mucA* intacto, indicando que outro loci estaria envolvido nesta conversão. Em outro estudo semelhante, Yoon e colaboradores (2006) analisaram amostras de pacientes com FC do Canadá e dos Estados Unidos e constataram a mesma situação em 13% dos isolados. Nossos dados indicam que 38% das amostras M cujo gene *mucA* foi sequenciado apresentavam-no intacto, sugerindo a existência de mutações em outros genes ligados a produção do alginato, este fenômeno mostrou-se muito mais frequente em nossa população do que em outros locais do mundo.

Sabe-se que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a reversão para o fenótipo não mucóide não é um fenômeno incomum e pode ser resultado do reparo das mutações no gene *mucA* ou de mutações secundárias em outros genes envolvidos no operon de biossíntese do alginato (Hogardt & Heesemann, 2010). De fato, diversos trabalhos com pacientes com FC cronicamente infectados têm apontado para a presença de amostras com fenótipo NM cujo gene *mucA* apresenta mutações, o que sugere uma reversão do fenótipo M ao longo do tempo. No mesmo trabalho citado anteriormente, Ciofu e colaboradores (2008) descreveram a ocorrência de mutações no gene *mucA* em 71 (69%) das 103 amostras NM analisadas.

Nosso trabalho mostrou que quatro (36%) das 11 amostras NM submetidas ao sequenciamento apresentaram alguma alteração no gene *mucA*. Dados bastante parecidos foram encontrados por Feliziani e colaboradores (2010) ao analisarem 38 amostras de *P. aeruginosa* de 26 pacientes com FC atendidos em dois centros da Argentina e demonstrarem a existência de mutações no mesmo gene em 37,5% das amostras NM.

As vias aéreas do paciente com FC são um ecossistema complexo e altamente dinâmico, com diferentes ambientes que sofrem alterações ao longo do tempo, portanto a reversão do fenótipo M pode indicar uma adaptação a este cenário, já que a bactéria usa uma grande quantidade de energia para a produção de alginato e na ausência de uma pressão seletiva para este fenótipo ele deixa de ser vantajoso (Yang *et al*., 2011).

Outro fenótipo constantemente encontrado em amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com infecção pulmonar crônica é a alteração do sistema *quorum sensing*. Este fenótipo normalmente é resultado de mutações no gene *lasR*. O sistema *quorum sensing* compreende um gene I, responsável por codificar uma enzima capaz de sintetizar uma proteína homônima e o gene R, responsável pela produção do receptor. No sistema Las a proteína LasI se liga ao receptor LasR e este complexo é capaz de atuar como fator de transcrição regulando negativamente ou positivamente a expressão de outros genes. Na *P. aeruginosa* cerca de 10% dos genes tem sua expressão regulada por este sistema (Dekimpe & Déziel, 2009; Winstanley & Fothergill, 2009).

Dentre os genes regulados positivamente pelo sistema Las estão diversos fatores de virulência como elastase, protease alcalina, fosfolipase C e piocianina (Girard & Bloemberg, 2008), diante disto, diversos autores propuseram que a ocorrência de mutações no gene *lasR* trariam como principal vantagem para as amostras de infecção crônica uma atenuação da virulência, sendo portanto, selecionadas no ambiente pulmonar deteriorado do paciente com FC (D'Argenio & Miller, 2004; Schaber *et al*., 2004; Heurlier, Dénervaud & Haas, 2006).

Atualmente, alguns trabalhos tem revelado que esta atenuação da virulência não é o principal ganho adaptativo das amostras com mutações em *lasR*. Bjarnsholt e colaboradores (2010) analisaram 207 amostras de *P. aeruginosa* de 121 pacientes com infecção crônica e constataram que a maior parte manteve e expressão dos fatores de virulência mesmo na existência de mutações no gene *mucA*. Os autores

revelaram que o outro sistema de *quorum sensing* em *P. aeruginosa* (Rhl) se manteve funcional nestas amostras e concluíram que este sistema também é capaz de regular a expressão dos genes ligados à virulência, mantendo sua produção ativada. De fato, em *P. aeruginosa* existem ao menos três vias principais de *quorum sensing*, Las, Rhl e PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) e a hierarquia destes sistemas tem sido debatida constantemente sem que haja conclusões definitivas.

O sistema Las regula também genes envolvidos em diversas vias metabólicas, D'Argenio e colaboradores (2007) investigaram possíveis vantagens metabólicas conferidas por alterações neste gene e identificaram um aumento da versatilidade nutricional em *P. aeruginosa*, já que as amostras mutantes exibiram a capacidade de usar diferentes compostos como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Estas amostras apresentaram uma maior taxa de crescimento na presença de diversos aminoácidos, condição extremamente comum no ambiente pulmonar do paciente com FC em decorrência da intensa resposta inflamatória. Além disso, os mesmos autores constataram nas amostras mutantes uma maior tolerância a ceftazidima, resultado do aumento da atividade de uma beta-lactamase. Estes dados em conjunto sugerem que as alterações nas vias metabólicas podem ser o principal alvo da pressão seletiva.

Em nossas amostras verificamos que oito (33%) das 24 exibiram mutações em *lasR* e os três pacientes apresentaram pelo menos uma amostras com mutação. Dois trabalhos recentes apresentaram resultados semelhantes, Feliziani e colaboradores (2010) verificaram a existência de mutações no gene *lasR* em 39% das 38 amostras estudadas e Hoffman e colaboradores (2010) identificaram 31% de amostras mutantes em um trabalho que incluiu 166 *P. aeruginosa* obtidas de 58 pacientes com FC. Nossos dados indicam que há uma seleção das amostras com mutações em *lasR* nas vias respiratórias do paciente com FC, porém esta não é uma alteração essencial em nossa amostragem.

Apesar de pertencerem a apenas três perfis clonais distintos, as 24 amostras exibiram uma grande diversidade genotípica no resultado do sequenciamento dos dois genes (*mucA* e *lasR*). Foram identificadas três mutações distintas no gene *mucA* e 7 no gene *lasR*. Este é um fenômeno descrito na literatura, Smith e colaboradores (2006) executaram o sequenciamento do genoma completo de duas amostras classificadas como o mesmo clone e obtidas de um mesmo paciente em momentos diferentes, a primeira aos seis meses de vida e a segunda aos 96 e

verificaram a ocorrência de mutações em 68 genes, incluindo genes de virulência, resistência e *quorum sensing*.

Wilder e colaboradores (2009) analisaram isolados sequenciais de dois pacientes com infecção crônica. Foram incluídas 18 amostras de cada paciente e a tipagem molecular demonstrou que ambos eram colonizados por um clone exclusivo, entretanto a análise de vários fatores de virulência revelou uma grande variedade fenotípica e o sequenciamento de alguns genes (*lasR*, *lasI*, *rhlR* e *rhlI*) mostrou que também havia uma grande diversidade genotípica entre as amostras. Mais recentemente, Chung e colaboradores (2012) avaliaram pares de amostras coetâneas de três pacientes com infecção pulmonar crônica quanto à diversidade genética. O polimorfismo entre as duas amostras de um mesmo paciente variou entre um e 344 nucleotídeos enquanto a variação do número de inserções e deleções foi de oito a 93. Além disso, em dois pacientes apenas uma das amostras apresentou a integração de um profago, indicando uma composição distinta do genoma acessório dentro do mesmo clone.

A diversidade intraclonal tem sido descrita como uma adaptação a heterogeneidade de ambientes encontrados nas vias aéreas do paciente com FC, os autores propõem que diferentes linhagens bacterianas podem evoluir a partir de um ancestral comum em um processo denominado irradiação adaptativa. Esta microvariação genética não pode ser detectada pelos métodos de tipagem usuais com PFGE e MLST (Chung *et al*., 2012) portanto essas amostras continuam sendo agrupadas dentro de um mesmo perfil clonal. Em nossa amostragem verificamos uma grande diversidade intraclonal tanto no caráter fenotípico quanto no genotípico, corroborando a existência de diversas subpopulações no ambiente pulmonar e a ideia de que cada uma está submetida a uma pressão seletiva diferente.

A abordagem multidisciplinar em pacientes com FC tem sido responsável por um substancial aumento da expectativa de vida nestes indivíduos, todavia, como a maioria dos pacientes sucumbe à infecção pulmonar, a terapia antimicrobiana representa o melhor avanço na sobrevida deste grupo, já que diminui a densidade bacteriana permitindo uma melhora da função pulmonar e uma diminuição das internações hospitalares (Lyczak *et al*., 2002; Ratjen *et al*., 2009; Hauser *et al*., 2011).

Diversos trabalhos têm demonstrado que durante a fase inicial da infecção, na qual a *P. aeruginosa* é isolada de forma intermitente do pulmão dos pacientes com

FC a terapia antimicrobiana é capaz de amenizar os efeitos e até mesmo promover a erradicação do patógeno, adiando o estabelecimento da infecção crônica (Lee, 2009; Ratjen *et al*., 2010). Frederiksen e colaboradores (1997) já haviam comprovado esta hipótese ao compararem 48 pacientes com FC em tratamento com colistina inalatória e ciprofloxacina oral a um grupo controle de 42 pacientes com FC sem antibioticoterapia. Após três anos e meio de acompanhamento eles perceberam que 19 (72%) pacientes do grupo controle tinham evoluído para a infecção crônica, enquanto apenas sete (16%) dos que estavam sob tratamento apresentaram esta condição. Mais recentemente Taccetti e colaboradores (2005) revelaram em seu estudo que após iniciarem a antibioticoterapia em 58 pacientes com FC recentemente infectados por *P. aeruginosa* a erradicação foi atingida em 81% dos casos.

Apesar do consenso sobre os benefícios que a terapia antimicrobiana é capaz de trazer aos pacientes com FC na fase inicial da infecção, não há uma estratégia definitiva em relação ao adequado para a intervenção terapêutica e ao melhor esquema a se adotar. Essas decisões variam de paciente para paciente e são normalmente empíricas, baseadas na idade, na presença de outros micro-organismos e na severidade da doença pulmonar do indivíduo (Langton Hewer & Smyth, 2009; Taccetii *et al*.,2012).

Por outro lado, uma vez estabelecida à infecção crônica por *P. aeruginosa* é praticamente impossível erradicar esta bactéria das vias aéreas do paciente com FC. Hoiby (2006) descreveu que em um paciente de 42 anos, o qual havia sido submetido a 114 ciclos de 15 dias de antibioticoterapia com tobramicina e um β-lactâmico intravenosos ao longo de 28 anos, manteve-se infectado por uma amostra com fenótipo M. Devido ao elevado uso de antibióticos nos pacientes com FC e ao prolongado tempo que esta bactéria habita as vias respiratórias nestes indivíduos, sendo, portanto exposta continuamente as drogas, a ocorrência de resistência aos antimicrobianos é um fenômeno comum (Pitt *et al*., 2003; Johansen *et al*., 2004; Lister *et al*., 2009).

Em pacientes com FC, já foram descritas amostras de *P. aeruginosa* resistentes a todas as classes de antimicrobianos usados na clínica (Livermore, 2002). A fim de analisar este fenômeno em nossa população submetemos todas as 274 amostras ao teste de susceptibilidade a nove agentes corriqueiramente usados nas infecções pulmonares. A análise geral revelou que os dois antimicrobianos com

maior índice de amostras não susceptíveis (26%) foram AMI e GEN, enquanto os menores percentuais foram o do MER (14%) e da CAZ (15%). Rao e colaboradores (2012) analisaram o perfil de susceptibilidade em 127 amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC da Irlanda do Norte e também identificaram AMI e GEN como os agentes com as maiores taxas de amostras não susceptíveis. Já Manno e colaboradores (2005) determinaram o perfil de susceptibilidade de 1315 amostras obtidas de 224 pacientes da Itália e também identificaram a CAZ como o agente antimicrobiano mais eficiente em sua população, 86% das amostras sensíveis. Nossos resultados foram bastante semelhantes aos de Garcia e colaboradores (2004), que obtiveram 90 amostras de 76 pacientes com FC atendidos na Espanha e encontraram as maiores taxas de resistência para AMI e GEN e a segunda menor para CAZ.

O caráter multicêntrico deste trabalho nos permitiu uma valiosa comparação dos perfis de susceptibilidade entre os centros, revelando um cenário ainda não explorado no Brasil. Os dados obtidos indicam haver consideráveis diferenças acerca da resistência entre os centros. No HCPA - RS todos os antimicrobianos apresentaram taxas de resistência (plena e intermediária) acima de 20%, exceto a TOB (17%), que foi considerada a mais eficaz, entretanto no IFF - RJ a TOB foi o antimicrobiano com maior percentual de resistência (32,4%). O IFF - RJ atende apenas pacientes até os 18 anos de idade, faixa etária na qual a terapia com TOB inalatória é rotineiramente usada na tentativa da erradicação da bactéria, este fato pode justificar a diferença para o HCPA - RS, onde são atendidos pacientes de todas as idades, o que implica em uma variedade maior de esquemas terapêuticos.

Também no IFF - RJ identificamos a menor taxa de resistência em nosso estudo, 1,5% das amostras resistentes a CIP, porém no outro centro localizado na cidade do Rio de Janeiro (HUPE - RJ), a CIP foi o antimicrobiano menos eficiente, com 14,9% das amostras resistentes. No HUPE - RJ são atendidos somente pacientes acima de 18 anos, o que se traduz normalmente como um estágio mais avançado da infecção crônica e a adoção de uma antibioticoterapia diferente em relação aos pacientes do IFF - RJ, o que pode, portanto justificar este contraste.

A avaliação dos perfis de resistência no HEOM - BA nos revelou um achado até o momento inédito na literatura. Neste centro a maior taxa de resistência (42,3%) foi para o antimicrobiano PTZ. Estes dados apontam para a necessidade de uma

futura investigação dos possíveis mecanismos de resistência relacionados a este fenótipo em *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC

Ao agruparmos as amostras que exibiram resistência a pelo menos um antimicrobiano em diferentes perfis verificamos que o mais comum foi a resistência concomitante aos três aminoglicosídeos, este perfil foi identificado em 11 amostras do IFF - RJ e do HUPE - RJ, o segundo perfil mais comum foi a resistência simultânea a GEN e TOB, exibida por sete amostras do IFF - RJ. Os aminoglicosídeos estão entre as classes de antimicrobianos mais comumente usados no tratamento das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* em pacientes com FC, portanto a ocorrência de resistência a este grupo de drogas é um fenômeno bastante frequente (MacLeod *et al*., 2000; Hoiby, 2011).

Em nosso trabalho não houve um perfil de resistência comum aos quatro centros de referência. Em suma, nossos dados revelaram a existência de expressivas especificidades regionais na esfera da resistência aos antimicrobianos, essas variações podem ser resultado das diferentes prescrições adotadas em cada centro ou até mesmo da individualização do esquema terapêutico em relação a cada paciente, o que definiria níveis distintos de seleção.

Um fator que pode influenciar significativamente o perfil de resistência das amostras de *P. aeruginosa* obtidas de indivíduos FC é a formação de biofilme. Bactérias crescidas em biofilme são consideravelmente mais resistentes aos antimicrobianos, porém os testes de susceptibilidade para esta forma de crescimento não fazem parte da rotina dos laboratórios especializados em FC, o que pode justificar a ausência de associação entre os dados de sensibilidade obtidos no laboratório e resposta clínica relatada em alguns pacientes (Smith *et al*., 2003; Harmsen *et al*., 2010; Hoiby *et al*., 2010; Hengzhuang *et al*., 2012). Em um trabalho anterior nosso grupo analisou 40 amostras obtidas de 20 pacientes atendidos no HUPE - RJ e no IFF - RJ e demonstrou um aumento significativo das concentrações inibitórias mínimas para cinco antimicrobianos (AMI, CAZ, CIP, GEN e TOB) quando as amostras estavam crescidas em biofilme (Ferreira *et al*., 2010)

Outra abordagem bastante relevante no âmbito da susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa* da FC é a comparação entre as taxas de resistência dos dois fenótipos (NM e M). Apesar de haver diferenças, não existe um consenso quanto ao morfotipo caracteristicamente mais resistente. Shawar e colaboradores (1999) analisaram 1240 amostras obtidas de 508 pacientes

e verificaram que para todos os antimicrobianos testados (AMI, CAZ, CIP, GEN e TOB), o fenótipo NM apresentou maiores taxas de resistência, porém não foi aplicado um teste estatístico para avaliar a significância destas diferenças. Resultados semelhantes foram encontrados por Burns e colaboradores (2000), porém comparando um número maior de antimicrobianos (doze). Posteriormente, Ciofu e colaboradores (2001) comparam os perfis de susceptibilidade de 42 pares de amostras NM e M, demonstrando que as cepas NM foram significativamente mais resistentes para os antibióticos CAZ, CIP, MER e TOB.

Por outro lado, em um estudo citado anteriormente (Silbert, Barth & Sader, 2001), os autores obtiveram dados diferentes, revelando que as amostras M apresentaram maiores índices de resistência para CAZ, IMP, MER, PTZ, CEP e CIP, contudo, apenas para os últimos dois agentes a diferença se mostrou significativa. Em outro trabalho, Manno e colaboradores (2005) demonstraram que as amostras M foram significativamente mais resistentes do que as NM para CIP e os dois aminoglicosídeos testados (AMI e TOB). A controvérsia na literatura se torna mais evidente ao citarmos que Christenson e colaboradores (2000) analisaram o perfil de resistência de 67 amostras de *P. aeruginosa* e não identificaram diferenças na comparação entre os dois fenótipos.

Neste trabalho as amostras NM se apresentaram significativamente mais resistentes a CIP, GEN e TOB do que as M, que por sua vez exibiram maior resistência a CAZ, IMP e PTZ. Alguns autores sugerem que as amostras de fenótipo NM tendem a ser mais resistentes, já que como não estão protegidas pelo alginato, estariam, portanto, mais expostas aos antimicrobianos (Ciofu *et al*., 2001). Em contrapartida, outros autores propõem que os testes laboratoriais não mimetizam as reais condições de crescimento das amostras M no ambiente pulmonar, sendo incapazes de aferir seu verdadeiro perfil de resistência (Saiman *et al*., 1999). Nossos dados não permitem conclusões quanto a qual fenótipo exibe maior resistência, exemplificando as divergências encontradas na literatura.

Atualmente, um fenótipo bastante preocupante encontrado em *P. aeruginosa* é a produção de carbapenemases, já que estas enzimas são capazes de fornecer resistência não só aos carbapenens, mas a outros β-lactâmicos (Lister *et al*., 2009). Na FC, os agentes β-lactâmicos são frequentemente utilizados na tentativa de erradicação da *P. aeruginosa* do ambiente pulmonar e no tratamento das exacerbações (Sordé *et al*., 2011).

A prevalência de diferentes carbapenemases tem aumentado em todo o mundo e em *P. aeruginosa* destacam-se as enzimas do tipo MBL, que foram identificadas pela primeira vez neste patógeno em 1991 (Watanabe *et al*.,1991), mas desde então amostras com este fenótipo têm sido encontradas em quase todas as regiões do planeta, inclusive no Brasil (Lee *et al*., 2004; Peleg *et al*., 2004; Fritsche *et al*., 2005; Wolter *et al*., 2009).

O primeiro relato de amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL na FC data de 2008 em Portugal, foram isoladas oito amostras de uma paciente com 13 anos de idade e todas apresentavam resistência aos β-lactâmicos. A análise molecular revelou a presença do gene bla_{VIM-2} em um integron de classe 1 (Cardoso *et al*., 2008). Recentemente, Pollini e colaboradores (2011) reportaram a presença do gene bla_{IMP-13} em 18 amostras obtidas de uma mesma paciente na Itália. Nos dois estudos os pacientes apresentavam infecção crônica por clones produtores de MBL, que já haviam sido isolados anteriormente em quadros infecciosos de pacientes sem FC nos dois países (Cardoso *et al*., 2002; Rossolini *et al*., 2008; Santella *et al*., 2010).

Outro aspecto bastante significativo é o fato de que os genes responsáveis por codificar estas enzimas estão localizados em elementos geneticamente móveis, o que possibilita sua disseminação (Walsh *et al*., 2005). Portanto, apesar de haver poucos relatos de MBL em amostras de indivíduos FC, o monitoramento deste genótipo é uma medida importante tanto no contexto epidemiológico quanto no da resistência. Em nosso trabalho selecionamos as 54 amostras que exibiram resistência (plena ou intermediária) a pelo menos um dos carbapenens testados e averiguamos a presença de genes de MBL.

Apesar de haver uma grande variedade de métodos fenotípicos para detecção de MBL, a inexistência de um teste padrão somada ao baixo número de amostras com fenótipo de resistência compatível nos levou a optar pela utilização da técnica molecular para analisar a presença dos genes correspondentes as MBL mais frequentes em *P. aeruginosa* no Brasil. Nenhuma de nossas amostras apresentou produto de amplificação correspondente aos genes avaliados, corroborando o fato de ainda não haver relatos de *P. aeruginosa* produtoras de MBL em indivíduos FC no nosso país.

As carbapenemases do tipo KPC emergiram recentemente como outro fenótipo de resistência bastante relevante. Até então restritas as Enterobactérias

(Tzouvelekis *et al*., 2012), as enzimas KPC foram identificadas pela primeira vez fora desta família no ano de 2007, quando Villegas e colaboradores isolaram três amostras de *P. aeruginosa* portadoras do gene bla_{KPC-2} na Colômbia. Posteriormente, amostras de *P. aeruginosa* produtoras de KPC foram encontradas em Trinidad e Tobago (Alpaka *et al*., 2009), Porto Rico (Wolter *et al*., 2009), Estados Unidos (Poirel *et al*., 2010) e China (Ge *et al*., 2011).

Recentemente houve relatos de amostras com este fenótipo na Argentina e no Brasil, indicando sua disseminação pelas Américas (Jácome *et al*., 2012; Santella *et al*., 2012). Além disso, dois trabalhos publicados em 2012 relataram a ocorrência de amostras de *P. aeruginosa* carreando simultaneamente enzimas do tipo KPC e MBL, na Colômbia e em Porto Rico (Correa *et al*., 2012; Martínez *et al*., 2012). Apesar de ainda não haver relatos da presença deste fenótipo em amostras de indivíduos FC, nosso grupo identificou quatro *Escherichia coli* produtoras de KPC em pacientes atendidos em diferentes unidades do HUPE - RJ (Carvalho-Assef *et al*., 2010), um dos centros de atendimento aos pacientes com FC. Este achado associado ao fato do gene bla_{kpc} estar presente em elementos geneticamente móveis, o que possibilita a sua disseminação entre diferentes gêneros bacterianos nos motivou a investigar a presença deste gene em nossa amostragem.

As 54 amostras citadas anteriormente também foram submetidas à detecção molecular do gene bla_{KPC}, porém nenhuma delas apresentou resultado positivo. Estes dados, até o momento não afastam a necessidade de um contínuo monitoramento destes mecanismos de resistência em amostras isoladas de indivíduos FC.

A multirresistência é um fenômeno comum em *P. aeruginosa*, pois essa bactéria apresenta um vasto arsenal de mecanismos de resistência a diversos agentes, que inclui enzimas que inativam os antimicrobianos, bombas de efluxo e alterações na permeabilidade do envoltório celular. A multirresistência é normalmente resultado da combinação destes diferentes mecanismos ou da ação potente de um deles (Zavascki *et al*., 2010).

Em indivíduos FC a ocorrência deste fenótipo limita as opções terapêuticas para o combate das infecções e normalmente resulta em falha do tratamento, o que está associado a um maior número de exacerbações, declínio da função pulmonar e consequentemente, maior risco de morte (Lechtzin *et al*., 2006; Sordé *et al*., 2011). Mayer-Hamblett e colaboradores (2012) analisaram o efeito da antibioticoterapia em

282 indivíduos FC com cultura positiva para *P. aeruginosa* nos Estados Unidos e constataram que o pequeno grupo no qual a terapia de erradicação não obteve sucesso (37 pacientes) apresentava maiores riscos de exacerbações.

Também nos Estados Unidos, Emerson e colaboradores (2010) compararam o perfil de resistência de 656 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de 253 pacientes atendidos em 33 centros de referência com dados obtidos há 13 anos e identificaram um aumento substancial no percentual de amostras multirresistentes (de 11,6% para 17%). Em nosso estudo, verificamos a ocorrência do fenótipo de multirresistência em 46 (16,7%) amostras, sendo a maior parte delas (n=35, 76%) oriundas do HCPA - RS. Dados bastante semelhantes foram encontrados em 127 amostras da Irlanda do Norte, onde o percentual de bactérias com este fenótipo foi de 15% (Rao *et al*., 2012).

Ao investigarmos a distribuição das amostras multirresistentes pelos pacientes percebemos que 15 (20%) deles apresentavam pelo menos uma amostra com este fenótipo. Ren e colaboradores (2012) pesquisaram a presença destas amostras em 4349 pacientes cronicamente infectados por *P. aeruginosa* e identificaram-nas em 25,5% dos indivíduos. Por outro lado, Merlo e colaboradores (2007), ao executarem a mesma análise em 4293 pacientes revelaram valores bem menores, já que apenas 7,9% apresentaram amostras com este perfil. Dados tão discrepantes podem ser justificados pela utilização de diferentes critérios na classificação das amostras multirresistentes. No primeiro estudo foram incluídas amostras resistentes a GEN e outro aminoglicosídeo, além de um β-lactâmico, enquanto no segundo trabalho o critério adotado foi à resistência a pelo menos dois dos seguintes agentes: CIP, MER e TOB.

A terapia combinada tem sido recomendada como tentativa de impedir o aparecimento da resistência e propiciar uma ação sinérgica dos agentes utilizados, reduzindo a concentração necessária para seu efeito máximo (Foweraker *et al*., 2009), portanto em nosso trabalho adotamos a resistência simultânea a representantes de pelo menos três classes de antimicrobianos como critério por entendermos que esta definição engloba amostras que representam de forma mais significativa uma possibilidade de falha terapêutica.

Além disso, é importante ressaltar que foi descrita na literatura uma notável associação entre cepas transmissíveis e elevados níveis de resistência aos antimicrobianos (Salunkhe *et al*., 2005). Recentemente, Luna e colaboradores

(2013) identificaram a presença de uma cepa endêmica multirresistente (Houston-1) em 32 (45%) dos 71 pacientes incluídos em seu estudo. Diante disto, é possível supor que a inexistência de clones disseminados entre ou em cada um dos centros do nosso trabalho contribuiu para as baixas taxas de multirresistência encontradas.

A versatilidade da *P. aeruginosa* associada à heterogeneidade e ao dinamismo do ambiente pulmonar nos indivíduos com FC nos impede de generalizar o cenário epidemiológico e de resistência observado em nosso trabalho, porém este estudo destaca-se por seu ineditismo ao ser o primeiro no país com caráter prospectivo e multicêntrico, representando um significativo ganho de conhecimento para a FC no âmbito nacional, o que pode proporcionar benefícios aos pacientes e a comunidade cientifica nacional.

CONCLUSÕES

- Não foram observados percentuais de resistência acima de 30% para nenhum dos antimicrobianos, considerando a totalidade das amostras. Os antimicrobianos menos eficientes foram os aminoglicosídeos e CEP e o mais eficaz foi CAZ.

- Houve diferenças dos perfis de resistência entre os centros, índices de resistência superiores a 30% foram encontrados no Hospital das Clínicas de Porto Alegre para AMI, CEP e GEN, no Instituto Fernandes Figueira para TOB e no Hospital Especializado Octávio Mangabeira para PTZ, enquanto no Hospital Universitário Pedro Ernesto os percentuais de resistência não ultrapassaram 15% para todos os antimicrobianos. O que possivelmente reflete as características da população atendida em cada um dos centros, assim como, as estratégias terapêuticas adotadas.

- Houve variações em relação a resistência aos antimicrobianos considerando os fenótipos NM e M e os centros de referência. No Hospital das Clínicas de Porto Alegre o fenótipo NM foi significativamente mais resistente a CIP e TOB, enquanto o M foi mais resistente aos beta-lactâmicos e PTZ. No Instituto Fernandes Figueira as amostras NM foram mais resistentes a GEN e TOB. Nos outros centros de referência nenhuma diferença foi considerada significativa.

- Todos os centros exibiram poucas amostras classificadas como multirresistentes, exceto o Hospital das Clínicas de Porto Alegre, que apresentou um índice de 26,2% das amostras com este fenótipo. Estes dados sugerem que a inexistência de clones disseminados entre ou em cada um dos centros contribuiu para as baixas taxas de multirresistência.

- As amostras testadas não apresentaram os genes pesquisados (*bla*$_{imp}$, *bla*$_{spm}$, *bla*$_{vim}$ e *bla*$_{kpc}$), indicando que estes não são mecanismos de resistência presentes em nesta amostragem.

- Foi detectada uma grande diversidade genotípica (224 perfis clonais) e não houve clones disseminados entre os centros ou dentro dos mesmos, sugerindo que a transmissão de cepas não é um evento comum em nossa população. Além disso, a manutenção de clones foi observada em poucos pacientes a despeito de todos serem classificados como cronicamente infectados.

- A pesquisa de mutações nos genes *lasR* e *mucA*, condição apontada como uma marcador da infecção crônica revelou que mais de metade das amostras testadas apresentaram mutações em pelo menos um dos genes, o que nos leva a concluir que este também é um evento de adaptação importante em nestas amostras.

REFERÊNCIAS

Adodi A, Sciacca A, Campanile F, Messina C, Barchitta M, Sciacca S, Stefani S. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis in Sicily: genome macrorestriction analysis and rapid PCR-ribotyping. New Microbiol. 2000; 23:319-27.

Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre MC, Quinn JP, Villegas MV. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. J Clin Microbiol. 2009;47(8):2670-71.

Alvarez AE, Ribeiro AF, Hesselm G, Bertuzzo CS Ribeiro JD. Cystic fibrosis at Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. J Pediatr. 2004;80:371-79.

Arakawa Y, Shibata K, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H. Convenient test for screening metallo-β-lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 2000; 38:40-3.

Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. BMJ 1995;310:1571-72.

Ashish A, Shaw M, McShane J, Ledson MJ, Walshaw, MJ. Health-related quality of life in cystic fibrosis patients infected with transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains: cohort study. J R Soc Med Sh Rep. 2012;3:12.

Bagge, N., Schuster, M. Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. & Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β-lactamases and alginate production. Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48:1175-87.

Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2001;14:547-60.

Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. Curr Opin Pulm Med. 2000;6:545-50.

Bethesda, MD Hoboth, C., R. Hoffmann, A. Eichner, C. Henke, S. Schmoldt, A. Imhof, J. Heesemann, and M. Hogardt. Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 2009;200:118–30.

Bjarnsholt T, Jenses PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol. 2009;44:547-58.

Bjarnsholt T, Jensen PØ, Jakobsen TH, Phipps R, Nielsen AK, Rybtke MT, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Høiby N, Ciofu O; Scandinavian Cystic Fibrosis Study

Consortium. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. PLoS One. 2010;5(4):e10115.

Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. Annu Rev Med. 2007;58:150-57.

Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di SC, Doring G, Tummler B. *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. Am J Resp Crit Care Med. 2009;180:138-45.

Burns JL, Saiman L. *Burkholderia cepacia* infections in cystic fibrosis. Pediatr Infect Dis J. 1999;18:155-56.

Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshall SA, Jones RN Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2000;38:1818-22.

Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. J Infect Dis. 2001;183:444–52.

Bush K. New β-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001;32:1085-9.

Bush K. & Jacoby GA Update functional classification of β-lactamases Antimicrob Agents Chemoter. 2010;54;969-76.

Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T. Detection of SPM and IMP metallo-β-lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. Braz J Infect Dis. 2011;15(5):478-81.

Cardoso O, Leitão R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe LV. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. Microb Drug Resist. 2002;8(2):93-7.

Cardoso O, Alves AF, Leitão R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(4):375-79.

Carvalho APD, Albano RM, Oliveira DN, Cidade DAP, Teixeira LM, Marques EA. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. Microbiol Drug Resist Mechan Epidemiol Dis. 2006;2(12):103-8.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt JF, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, enconding a new subclass of metallo-β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:4654-61.

Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(3):1225-7.

Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. Lancet. 1996;348:639-42.

Christenson JC, Korgenski EK, Daly JA. In vitro activity of meropenem, imipenem, cefepime and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother. 2000;45(6):899-901.

Chung JC, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, Bruce KD, Smith GP, Welch M. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. Bacteriol. 2012;194(18):4857-66.

Ciofu O, Fussing V, Bagge N, Koch C, Hoiby N. Characterization of paired mucoid/non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, beta-lactamase activity and RiboPrinting. J Antimicrob Chemother. 2001;48:391-6.

Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, Høiby N; Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. Microbiol. 2008;154:103-13.

Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Hoiby N. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutations with heterogeneous genetic back-grounds emerge in *muc*A and/ or *las*R mutants. Microbiol. 2010;1566:1108-19.

Coenye T, Gillis M, Vandamme P. *Pseudomonas* antimicrobica Attafuah and Bradbury 1990 is a junior synonym of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi. 1993. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;6:2135-9.

Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol. 2001;39(10):3427-36.

Coenye T, Goris J, Spilker T *et al*. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. J Clin Microbiol. 2002;40:2062-9.

Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. J Hosp Infect. 2006; 63 (Suppl. 1):S1-S44.

Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, Ruiz SJ, Recalde M, Rosso F, Quinn JP, Villegas MV. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(10):5422-3.

Cramer N, Wiehlmann L, Tümmler B. Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Int J Med Microbiol. 2010;300:526-33.

Cramer N, Wiehlmann L, Ciofu O, Tamm S, Hoiby N, Tümmler B. Molecular epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in cystic fibrosis. PLOS one 2012;7(11):1-8.

Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry. Annual Data Report 2011. [acesso em 2 de fevereiro de 2013]. Disponível em http://www.cff.org/UploadedFiles/research ClinicalResearch/2011-Patient-Registry.pdf

Cystic Fibrosis Mutation Database [homepage na internet]. Toronto: Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto. [última atualização em 25 de abril de 2011; acesso em 2 de fevereiro de 2013]. Disponível em: http://www.genet.sickkids.on.ca/.

D'Argenio DA, Miller SI. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. Microbiol. 2004;150(Pt 8):2497-502.

D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR. Growth phenotypes os *Pseudomonas aeruginosa las*R mutants adapted to the airways of cystic fribosis patients. Mol Microbiol. 2007; 64:512-33.

D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Leão RS, da Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, Marques EA. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68(3):337-8.

Dekimpe V, Déziel E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. Microbiol. 2009;155(Pt 3):712-23.

Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Clin. Epidemiol. 1995;48:1041–9.

Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS; Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. J Cyst Fibros. 2012;11(6):461-79.

Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 2002;416:740-3.

Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo CC, Quentin C. Nosocomial Outbreak Due to a Multiresistant Strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: Efficacy of Cefepime-Amikacin Therapy and Analyses of β-lactam Resistance. J Clin Microbiol. 2001;39:2072-8.

Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. Pediatr Pulmonol. 2010;45(4):363-70.

Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, *et al*. Mucoidy, Quorum Sensing, Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections. PLoS One 2010;5:e12669.

Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas *aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. PLoS One. 2010;5(9).

Finnan S, Morrissey JP, O' Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J Clin Microbiol. 2004;42:5783-92.

Fluge G, Ojeniyi B, Hoiby N, Digranes A, Ciofu O, Hunstad E, Haanaes OC, Storrosten O-T. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Norwegian cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2001;7:238-43.

Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. 2012;10(12):841-51.

Foweraker JE. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. Br Med Bull. 2009;89:93-110.

Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(11):4809-15.

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

Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis. 2005;41 Suppl 4:S276-8.

García AD, Ibarra A, Rodriguez FC, Casal M. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from patients with cystic fibrosis. Rev Esp Quimioter. 2004;17:332-5.

Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. J Antimicrob Chemother. 2011;66(5):1184-6.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:918-51.
Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 1991;4:35-51.

Girard G, Bloemberg GV. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. Future Microbiol. 2008;3(1):97-106.

Gladman G, P Connor J, Williams RF, David TJ. Controlled study of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 1992;67:192–5.

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell. 1997;88:553-60.

Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML *et al*. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. Thorax. 2004;59:955-9.

Govan JRW, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. Future Microbiol. 2007;2:153-64.

Haagensen JA, Høiby N, Molin S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. Infec Immun. 2007;75:2214-24.

Hancok RE, Speert DP. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa; mechanisms and impact on treatment. Drug Res Updates. 2000;3:247-55.

Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;59(3):253-68.

Hauser AR, Jain M, Bar=Meir M & McColley SA. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 2011;24:29-70.

Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. J Cyst Fibrosis. 2005;4:3-5.

Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics/ pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(5):2683-90.

Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek Mr. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. J Bacteriol. 2001;183:5395-401.

Heurlier K, Denervaud V & Haas D. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa* . Int J Med Microbiol. 2006;296:93-102.

HoffmanLR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL. *Pseudomonas aeruginosa las*R mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. J Cyst Fibros. 2009;8:66-70.

Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. 2010;300:557-562.

Hoiby, N. Prospects for the prevention and control of pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. Paediatr. Drugs 2000;2:451–63.

Hoiby N. *P. aeruginosa* in cystic fibrosis patients resists host defenses, antibiotics. Microbe 2006;1(12):571-7.

Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(4):322-32.

Høiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. BMC Med. 2011;4(9):32.

Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(9):4990.

Jeannot K, Poirel L, Robert-Nicoud M, Cholley P, Nordmann P, Plésiat P. IMP-29, a novel IMP-type metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(4):2187-90.

Jeffrey B, Lyczak BJ, Carolyn L, Cannon LC, Gerald B. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2002;15:194-222.

Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagensen JAJ, Hoiby N, Molin S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. Infec. Immun. 2007;75:2214-2224.

Jensen ET, Giwecman B, Ojenyi B, Bangsborg JM, Hansen A, Koch C, Fiehn NE, Høiby N. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment. J Hosp Infec. 1997;36:117-22.

Johansen, H. K., and N. Hoiby. Seasonal onset of initial colonization and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. Thorax 1992;47:109–11.

Johansen HK, Nørregaard L, Gøtzsche PC, Pressler T, Koch C, Høiby N. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: a marker of therapeutic success?--A 30-year cohort study of survival in Danish CF patients after onset of chronic *P. aeruginosa* lung infection. Pediatr Pulmonol. 2004;37(5):427-32.

Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Weeb AK. Spread of mutirresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. Lancet. 2001;358:557-8.

Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G *et al*. Population dynamics of persistent Staphylococcus aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. J Clin Microbiol. 2003;41:4424-7.

Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Manual of Clinical Microbiology (Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A.et al. Eds.), 2001. Vol. 1 , pp. 517-525. ASM Press, Washington, D.C, USA.

Koch C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung. Pediatr Pulmonol. 2002;34:232-6.

Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, Christofidou M. Spread of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Clones in a University Hospital. J Clin Microbiol. 2013;51(2):665-8.

Langton Hewer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2009;7;(4):CD004197.

Leao RS, Carvalho-Assef APD, Ferreira AG, Folescu TW, Barth AL, Pitt TL, Marques EA Comparison of the worldwide transmissible *Pseudomonas aeruginosa* with isolates from Brazilian cystic fibrosis patients. Braz J Microbiol. 2010;41:1079-81.

Leão RS, Pereira RH, Folescy TW, Albano RM, Santos EA, *et al.* KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis*.* J Cyst Fibros. 2011;10(2):140-2.

Lechtzin N, John M, Irizarry R, Merlo C, Diette GB, Boyle MP. Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Respiration. 2006;73(1):27–33.

Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Anderson JB, Hoiby N, Molin S. Heterogeneity of biofilm formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbol. 2005;43:5247-55.

Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-β-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(2):168-72.

Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO, Yong D, Chong Y; KONSAR group. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas spp.* in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. Yonsei Med J. 2009;50(3):335-9.

Lee TW. Eradication of early *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis. Chron Respir Dis. 2009;6(2):99-107.
Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents. 2005;25:11-25.

Li Puma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2010;23:299-323.

Li XZ, Barre N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-OprM Multidrug Efflux System on Expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN Multidrug Efflux Systems in *Pseudomonas aeruginosa* . *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46:885-93.

Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. JAMA. 2005;293(5):581-8.

Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):582-610.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : Our worst nightmare*?* Clin Infect Dis.2002; 34:634-40.

Look DC, Stoll LL, Romig SA, Humlicek A, Britigan BE, Denning GM. Pyocyanin and its precursor phenazine-1-carboxylic acid increase IL-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in human airway epithelial cells by oxidant-dependent mechanisms. J Immunol. 2005; 22:4017-23.

Luna RA, Millecker LA, Webb CR, Mason SK, Whaley EM, Starke JR, Hiatt PW, Versalovic J. Molecular Epidemiological Surveillance of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Pediatric Population of Patients with Cystic Fibrosis and Determination of Risk Factors for Infection with the Houston-1 Strain. J Clin Microbiol. 2013.

Lyczak BJ, Cannon LC, Pier BG. Lung infections associated with cystic firosis. Clin Microbiol Rev. 2002;15:194-222.

Macfarlane L, Leavy A, McCaughan J. *et al*. Successful decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients with cystic fibrosis (CF) using a three-step protocol. J Hosp Infect. 2007;65:231-6.

MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirk JE, Miller GH, Burns JL, Garber RL. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. J Infect Dis. 2000;181(3):1180-4.

Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. Infect Immun. 1994;62:596–605.

Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Joseph SL, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patient with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1996;34:1129-35.

Manno G, Cruciani M, Romano L, Scapolan S, Mentasti M, Lorini R, Minicucci L. Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. Int J Antimicrob Ag. 2005;25:193-7.

Martínez T, Vázquez GJ, Aquino EE, Ramírez-Ronda R, Robledo IE. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harbouring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. Int J Antimicrob Agents. 2012;39(6):542-3.

Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, Katz K, Kibsey P, Kuhn M, Mounchili A, Simor A, Taylor G, Thomas E, Turgeon N, Mulvey MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). J Antimicrob Chemother. 2012;67(6):1359-67.

May TB, Shinabarged D, Mahara JR. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* : a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev. 1991;4:191-206.

Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL *et al*. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175:822-8.

Mayer-Hamblett N, Kronmal RA, Gibson RL, Rosenfeld M, Retsch-Bogart G, Treggiari MM, Burns JL, Khan U, Ramsey BW; EPIC Investigators. Initial *Pseudomonas aeruginosa* treatment failure is associated with exacerbations in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2012;47(2):125-34.

McCallum SJ, Corkill J, Gallagher M, Ledson MJ, Hart CA, Walshaw MJ. Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonized by *Pseudomonas aeruginosa* . Lancet. 2001;358:558-60.

Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hipermutation. J. Bacteriol. 2008;190:7910-7917.

Merlo CA, Boyle MP, Diener-West M, Marshall BC, Goss CH, Lechtzin N. Incidence and risk factors for multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Chest. 2007;132(2):562-8.

Middleton, B., H. C. Rodgers, M. Camara, A. J. Knox, P. Williams, and A. Hardman. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. FEMS Microbiol. Lett. 2002;207:1–7.

Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi, R, Lee, et al. Simple microdilution test for detection of metalo-β-lactamase porduction in *Pseudomonas aeruginosa* . J Clin Microbiol. 2002;40:4388-90.

Moore JE, Shaw A, Howard JL, Dooley JS, Elborn JS. Infection control and the significance of sputum and other respiratory secretions from adults patients with cystic fibrosis. Ann Clin Microbiol Antimocrob. 2004;2:3-8.

Moss R B. Cystic fibrosis: pathogenesis, pulmonary infection and treatment. Clin Infect Dis. 1995;21:839-51.

Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- β-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:582-7.

Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. J Bacteriol. 2001;183:1047–57.

Normark HB, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Internal Medicine 2002;252:91-106.

Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. 1999.37:1661-9.

Panagea S, Winstanley C, Walshaw ML, Ledson MJ, Hart CA. Enviromental contamination with na epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in a Liverpool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. J Hosp Infect. 2005;59:102-7.

Pasteran F, Faccone D, Gomez S, De Bunder S, Spinelli F, Rapoport M, Petroni A, Galas M, Corso A; *Pseudomonas aeruginosa* KPC Group. Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. J Antimicrob Chemother. 2012;67(5):1291-3.

Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax. 1992;47:6-13.

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. Clin Infect Dis. 2005;41(11):1549-56.

Pellegrino FL, Teixeira LM, CarvalhoMd Mda G, Aranha Nouér S, Pinto De Oliveira M, Mello Sampaio JM, D' Avilla Freitas A, Ferreira AL, Amorim Ed Ede L, Riley LW,

Moreira BM. Occurence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 2005;40:2420-4.

Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- -lactamase detection: Comparative evalution of double-disk synergy versus combined disk. J Clin Microbiol. 2008;46:2028-37.

Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Goldberg JB. How mutant CFTR may contribute to *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996;154:175-82.

Pitt TL, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. Thorax 2003;58:794-6.

Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. Emerg Infect Dis. 2000;6:84-5.

Poirel L, nordmann P, Lagrutta E. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 2010;54:3072.

Pollini S, Fiscarelli E, Mugnaioli C, Di Pilato V, Ricciotti G, Neri AS, Rossolini GM. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo-β-lactamase-producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype. Clin Microbiol Infect. 2011;17(8):1272-5.

Pournaras S, Köck R, Mossialos D, Mellmann A, Sakellaris V, Stathopoulos C, Friedrich AW, Tsakris A. Detection of a phylogenetically distinct IMP-type metallo-β-lactamase, IMP-35, in a CC235 *Pseudomonas aeruginosa* from the Dutch-German border region (Euregio). J Antimicrob Chemother. 2013

Pulcrano G, Iula DV, Raia V, Rossano F, Catania MR. Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on algU gene expression. New Microbiol. 2012;35(3):295-305.

Rao P, McCaughan J, McCalmont M, Goldsmith CE, Hall V, Millar BC, McCann MA, Downey DG, Rendall JC, Elborn JS, Moore JE. Comparison of antibiotic susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF) with invasive *Pseudomonas aeruginosa* from non-CF patients. J Cyst Fibros. 2012;11(4):349-52.

Ratjen F, Brockhaus F, Angyalosi G. Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a review. J Cyst Fibros. 2009;8(6):361-9.

Ratjen F, Munck A, Kho P, Angyalosi G; ELITE Study Group. Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial. Thorax. 2010;65(4):286-91.

Rau MH, Hansen SK, Johansen HK, Thomsen LE, Workman CT, Nielsen KF, Jelsbak L, Høiby N, Yang L, Molin S. Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. Environ Microbiol. 2010;12(6):1643-58.

Ren CL, Konstan MW, Yegin A, Rasouliyan L, Trzaskoma B, Morgan WJ, Regelmann W; for The Scientific Advisory Group, Investigators, and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung function decline in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2012;11(4):293-9.

Renders N, Miling U, Verbrugh H, Van Belkum A. Comparative Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments. J Clin Microbiol. 1996;34:3190–5.

Renders N, Verbrugh EH, Belkum AV. Dynamics of bacterial colonization in respiratory tract of patients with cystic fibrosis. Infect Genet Evol. 2001; Vol 1,29-39.

Rieber H, Frontzek A, von Baum H, Pfeifer Y. 27. Emergence of metallo-β-lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine-Westphalia, Germany. Antimicrob Chemother. 2012;67(4):1043-5.
Riordan JR. CFTR functions and Prospects for therapy. Annu Rev Biochem. 2007;77:15.1-15.26.

Roman F, Canton R, Perez-Vazquez M *et al*. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. J Clin Microbiol. 2004;42:1450-9.

Römling U, Fiedler B, Bosshammer J, Grothues D, von der Hardt H, Tümmler B. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1994;170:1616-21.

Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, Mugnaioli C, Pini B, De Luca F, Perilli M, Pollini S, Spalla M, Amicosante G, Toniolo A, Pagani L. First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):4023-9.

Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Curr Opin Microb. 2007;10:644-8.

Sader HS, Huynh HK, Jones RN. Contemporary in vitro synergy rates for aztreonam conbined with newer fluoroquinolones and beta-lactams tested against gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;47:547-50.

Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1209-23.

Saiman L, Burns JL, Whittier S, Krzewinski J, Marshall SA, Jones RN. Evaluation of reference dilution test methods for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1999;37:2987-91.

Saiman L, Siegel J. The Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Suppl. Am J Infect Control 2003;31:S1-62.

Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17:57-71.

Saiman L, Garber E. Infection control in cystic fibrosis: barriers to implementation and ideas for improvement. Curr Opin Pulm Med. 2010;In press .

Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR, Giske CG. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):346-52.

Sanlunkhe P, Smart CH, Morgan JÁ, Panagea S, Walshaw Mj, Hart CA, Geffers R, Tummler B & Winstanley C. A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resitence, J Bacteriol 2005;187: 4908-20.

Santella G, Pollini S, Docquier JD, Mereuta AI, Gutkind G, Rossolini GM, Radice M. Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging in sequence type 621. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4342-3.

Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, Gutkind G, Radice M. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. Infect Genet Evol. 2012;12(8):2003-5.

Santos F° L, Santos IB, Assis AML, Xavier DE, Menezes LC. Tipagem molecular de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo β-lactamases isoladas em João Pessoa /PB. Rev. Bras Anal Clin. 2003;35:127-31.

Schaber, J. A., N. L. Carty, N. A.McDonald, E. D. Graham, R. Cheluvappa, J. A. Griswold, and A. N. Hamood. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* . J Med Microbiol. 2004;53:841–53.

Schuster, M., and E. P. Greenberg. A network of networks: *quorum-sensing* gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa* . Int J Med Microbiol. 2006;296:73–81.

Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. Physiol. Rev. 1999;79:S145-66.

Scott FF, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. J Med Microbiol 2004;53:609-15.

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanebe N, Okazadi M, Myoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a Citrobacter freundii clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52: 4194-7.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Sener B, Koseoglu O, Ozcelik U, Kocagoz T, Gunalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. Int J Med Microbiol. 2001;291: 387–93.

Sermet-Gaudelus I, Castanet M, Restsch-Bogart G, Aris RM. Update on cystic fibrosis-related bone disease: a special focus on children. Paediatr Respir Rev.2009; 10:134-42.

Shawar RM, MacLeod DL, Garber RL, Burns JL, Stapp JR, Clausen CR, Tanaka SK. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents. Chemother. 1999;43(12):2877-80.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol. 2003;41:5407-13.

Shreve MR, Butler S, Kaplowitz HJ, Rabin HR, Stokes S, Light M, Warren E. Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1999;37:753-7.

Sibley CD, Rabin H, Surette M. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease**.** Future Microbiol. 2006:1:53-61.

Silbert S, Barth AF, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2001;39(11):3976-81.

Simmonds NJ. Cystic fibrosis in the 21st century. Repir. Med. 2010;24:85-96.
Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio A et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the aiways of cystic fibrosis patients. PNAS. 2006;103:8487-92.

Smith AL, Fiel SB, Mayer-Hamblett N, Ramsey B, Burns JL. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. Chest. 2003;123(5):1495-502.

Smyth A, Walters S. Prophylatic antibiotics for cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2003;CD001912.

Sobral D, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Vu-Thien H, Hormigos K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Munck A, Vergnaud G, Pourcel C. A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of

Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(9):2247-56.

Sordé R, Pahissa A, Rello J. Management of refractory *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Infect Drug Resist. 2011;4:31-41.

Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166:982–93.

Starner TD, Shrout JD, Parsek MR. Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation end Diminish established biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:137-45.

Stehling EG, Leite DS, Silveira WD. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. Braz J Infect Dis. 2010;14(5):462-7.

Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. Infect Immun. 1998;66:2521–8.

Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, Buzzetti R, Costantini D, Trevisan F, Zavataro L, Campana S; Italian Group for P aeruginosa Eradication in Cystic Fibrosis. Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols. Thorax. 2012;67(10):853-9.

Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. Eur Respir J. 2005;26(3):458-61.

Tart AH, Wolfgang MC, Wozniak DJ. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. J Bacteriol. 2005;187(23):7955-62.

Taylor-Robinson D, Whitehead M, Diderichsen F, Olesen HV, Pressler T, Smyth RL, Diggle P. Understanding the natural progression in %FEV1 decline in patients with cystic fibrosis: a longitudinal study. Thorax. 2012;67(10):860-6.

Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, AlNassafi K, et al. Phenotipic charcterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2007;45:1697-704.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al. Molecular characterization of SPM-1 a novel metallo- β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobiol surveillance programme. J Antimicrob Chemother. 2002;50:673-9.

Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Molin S, Yang L, Hansen SK, Rau MH, Ciofu O, Johansen HK, Wolfs TFW. Initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates Clin Microbiol Infect. 2011;18(6):567-74.
Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):682-707.

Van Daele SG, Franckx H, Verhelst R, Schelstraete P, Haerynck F, Van Simaey L, Claeys G, Vaneechoutte M, de Baets F. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis rehabilitation centre. Eur Respir J. 2005;25(3):474-81.

Van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, van Berkhout FT, Wolfs T, van der Ent C, Bonten M. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. J Clin Microbiol. 2009;47(12):4096–101.

Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M *et al*. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1997;47:1188-200.

Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. Syst Appl Microbiol. 2011;34(2):87-95.

Vanlaere E, Lipuma JJ, Baldwin A. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58:1580-90.

Vergison A, Denis O, Deplano A. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother. 2007; 59:893-9.

Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, J. N. Kattan, J. A. Lopez, and J. P. Quinn, for the Colombian Nosocomial ResistanceStudy Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1553-5.

Vinion-Dubiel AD, Spilker T, Dean CR, Monteil H, Lipuma JJ, Goldberg JB. Correlation of wbiI genotype, serotype, and isolate source within species of the Burkholderia cepacia complex. J Clin Microbiol. 2004;42:4121-6.

Vosahlikova S, Drevinek P, Cinek O, Pohunek P, Maixnerova M, Urbaskova P, van den Reijden TJK, Dijkshoorn L, Nemec A. High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic. Res Microbiol. 2007;158:324-9.

Voynow JA, Fischer BM, Zheng S. Proteases and cystic fibrosis. Intern J Biochem Cell Biol. 2008;40:1238-45.

Voynow JA, Scanlin TF. Cystic fibrosis. In: Panitch HB, editor. Pediatric pulmonology, the requisites in pediatrics. Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005;116-30.
Vrankrijker AMM, Brimicome RW, Wolfs TFW, Heijerman HGM, Mansfeld R van. Clinical impact of a highly prevalent *Pseudomonas aeruginosa* clone in Dutch cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infection 2010;17:380-5.

Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing* regulons: effects of growth phase and environment. J Bacteriol. 2003;185:2080–95.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann T. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005;18:306-25.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(1):147-51.

Watson ME, Burns JL, Smith AL. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in mutS are found in cystic fibrosis sputum. Microbiol. 2004;150:2947-58.

Wilder CN, Allada G, Schuster M. Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. Infect. Immun. 2009;77(12):5631-5639.

Winstanley C & Fothergill JL. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. FEMS Microbiol Lett 2009;209:1-9.

Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, Goering RV, Hanson ND. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(4):1660-4.

Wood LF, Ohman DE. Independent regulation of MucD, an HtrA-like protease in *Pseudomonas aeruginosa*, and the role of its proteolytic motif in alginate gene regulation. J Bacteriol. 2006;188(8):3134-7.

Wu W, Badrane H, Arora S, Baker H V, Jin S. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2004;186: 7575–85.

Yagci A, Yagci A, Sener B, Suziki Y, Ahmed K. S. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to humam phryngeal epithelial cells. New Microbiol. 2007;30:167-71.

Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant Klebsiella penumoniae carryng blaIMP-8 in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol. 2001;39;4433-9.

Yang L, Jelsbak L, Marvig RL, Damkiær S, Workman CT, Rau MH, Hansen SK, Folkesson A, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Sommer MO, Molin S. Evolutionary

dynamics of bacteria in a human host environment. Proc Natl Acad Sci. 2011;108(18):7481-6.
Yang L, Jelsbak L, Molin S. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. Environ Microbiol. 2011;13(7):1682-9.

Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-goup metallo-β-lactamase (MBL), AIM-1, emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Autralia. Presented at:47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL, USA, 17-20 September 2007 (Abstract C1-593).

Yong DK, Lee JH, Shin HB, Rosoolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-β-lactamase producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. J Clin Microbiol. 2002;40:3798-801.

Yoon SS, Coakley R, Lau GW, Lymar SV, Gaston B, Karabulut AC, Hennigan RF, Hwang SH, Buettner G, Schurr MJ, Mortensen JE, Burns JL, Speert D, Boucher RC, Hassett DJ. Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. J Clin Invest. 2006;116(2):436-46.

Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(1):71-93.
Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock REW, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2921-7.

ANEXO – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Aut. Alex Guerra Ferreira
Orient. Profª. Elizabeth de Andrade Marques

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2574-CEP/HUPE – CAAE: 0037.0.228.000-10) "HIPERMUTABILIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA EM PSEUDOMONAS AERUGINOSA ASSOCIADAS A INFECÇÕES PULMONARES CRÔNICAS EM PACIENTES COM FIBROSE CISTICA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUPE/UERJ

Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br