



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ana Cláudia Moro Lima dos Santos

**Influência dos fatores clínicos e microbiológicos na
evolução das peritonites por Bacilos Gram-negativos
não fermentadores em diálise peritoneal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof^o Adj. Pasqual Barretti

Coorientadora: Prof^a Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu

Fevereiro de 2018

Ana Cláudia Moro Lima dos Santos

**Influência dos fatores clínicos e microbiológicos na
evolução das peritonites por Bacilos Gram-negativos
não fermentadores em diálise peritoneal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof^o Adj. Pasqual Barretti

Coorientadora: Prof^a Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu

Fevereiro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Ana Cláudia Moro Lima dos.

Influência dos fatores clínicos e microbiológicos na evolução das peritonites por Bacilos Gram-negativos não fermentadores em diálise peritoneal. / Ana Cláudia Moro Lima dos Santos. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Pasqual Barretti
Coorientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Capes: 21202010

1. Diálise peritoneal. 2. Peritonite. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. *Acinetobacter baumannii*. 5. Drogas - Resistência.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; diálise peritoneal; peritonite; resistência antimicrobiana.

Ana Cláudia Moro Lima dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof^o Adj. Pasqual Barretti

Coorientadora: Prof^a Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Comissão examinadora

Prof^o Adj. Pasqual Barretti

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dr^a Vanessa Burgugi Banin

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dr^o Carlos Henrique Camargo

Instituto Adolfo Lutz

Botucatu, fevereiro de 2018



Dedicatória

Ao milagre recebido de Deus: minha filha Ana Lara.



Agradecimentos

A Deus, por sua ajuda e proteção, guiando-me o caminho para alcançar o que para mim era inimaginável.

À minha mãe Iolanda, por todo o alicerce familiar necessário ao desenvolvimento de um ser humano, baseado nos valores morais e éticos, pelo grande esforço e dedicação incondicional para me propiciar a oportunidade de ter e ser o que hoje sou.

Aos meus familiares, com dedicação especial ao meu pai, por estarem sempre presentes em minha vida.

À minha filha Ana Lara, simplesmente por existir e a partir daí, ser a razão do nosso viver.

Em especial ao meu esposo João Paulo, por todo amor, essencial apoio, incentivo e compreensão por minha ausência em alguns momentos no decorrer desta jornada, o que faz desta, uma vitória conjunta.

À minha querida amiga Lígia Abraão, companheira de vida, exemplo de perseverança, sem seu incentivo e apresentação, não seria possível vivenciar o momento presente.

À minha co-orientadora Prof.^a Adj. Maria de Lourdes R.S. Cunha, incrível pessoa e profissional, por me receber com tanto carinho e confiança e ter me dado a oportunidade desenvolver esse trabalho, sempre atenta e disposta a tudo que necessitei; por seu intermédio tive a o privilégio de trabalhar com meu orientador.

Ao meu orientador Prof.^o Dr.^o Pasqual Barretti, por todos os ensinamentos e paciência com minhas limitações, que apesar de tantas atribuições, se fez sempre presente com todo seu brilhantismo e expertise, e mesmo com sua grandeza não nos faz sentirmos pequenos.

Aos queridos colegas do Laboratório de Bacteriologia: Ayrir, Danilo, Camila, Priscila, Luíza e Natália, por todo companheirismo, amizade e colaboração oferecida durante todas as etapas concluídas. Em especial à Thaís, de amiga à irmã, esteve presente em todos os momentos, em quem muitas vezes me apoiou e espelhei, por todo cuidado e carinho. Pessoas que levarei para toda a vida.

À esta Universidade, direção, administração e colaboradores, pois através do trabalho desempenhado, me foi aberto uma janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo – 2013/21379-8) pelo apoio financeiro referente aos insumos utilizados e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES, pela bolsa oferecida durante o mestrado.

E, finalmente a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho, o meu sincero muito obrigada !!



unesp

Epígrafe

*“Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada
responsabilidade humana.”*

Albert Einstein

Resumo

Peritonite por bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) é complicação importante da diálise peritoneal (DP), com curso clínico grave e elevada taxa de falência do método. Fatores associados à virulência, resistência antimicrobiana, formação de biofilme, entre outros, têm sido relatados, mas o limitado conjunto de evidências não permite concluir sobre os fatores responsáveis pelo pior curso clínico dessas infecções. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das características microbiológicas, das condições clínicas do paciente e do tratamento na evolução de peritonites por BGNNF, ocorridas num único centro, em período de 18 anos. A sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, produção de biofilme, além da análise do perfil clonal das bactérias pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado foram realizadas em todos os isolados bacterianos. Foram pesquisados genotipicamente, em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, a presença de marcadores de virulência (alginato, exoenzima S, fosfolipases C, exotoxina A, protease alcalina, elastase e ramnolipídeos). Associações entre as características microbiológicas do paciente e tratamento com a taxa de resolução da peritonite foram estudadas. A espécie mais frequente foi *Pseudomonas aeruginosa* (45,59%), seguida por isolados do complexo *Acinetobacter baumannii* (17,65%). O estudo dos fatores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa* revelou a presença de fatores de virulência em 100% dos casos, exceto exoenzima S (58,33%) e fosfolipase C não hemolítica (87,5%). Houve elevada proporção de BGNNF resistentes aos antimicrobianos testados, em particular à amicacina (36,73%) e à ciprofloxacina (44,9%), sendo que a sensibilidade aos betalactâmicos esteve acima de 70%. Observou-se elevada proporção de isolados produtores de biofilme (73,08%). Os resultados da tipagem por PFGE revelaram um perfil policlonal para a maioria dos isolados, entretanto para isolados do complexo *Acinetobacter baumannii* a análise revelou um *cluster*, entre 2000-2008, com perfil de multiresistência aos antimicrobianos, sugerindo fonte hospitalar. A evolução dos episódios mostrou reduzida taxa de cura (35,29%). A sensibilidade à amicacina e cefepime, se associaram de modo independente à maior chance de cura, enquanto a presença concomitante de infecção do óstio de saída do cateter de DP foi preditor independente de não resolução do episódio. Não se observaram associações entre

fatores de virulência, produção de biofilme e características do paciente e tratamento com o desfecho dos episódios. Em conclusão, peritonites em DP, por BGNNF, são infecções com reduzida taxa de cura; a resistência bacteriana é fator associado à menor chance de resolução e peritonite por bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. podem representar infecção grave, potencialmente de origem hospitalar, o que deve fazer redobrar os cuidados quanto ao seu manejo clínico.

Palavras-chave: diálise peritoneal, peritonite, fatores de virulência, resistência antimicrobiana, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

Abstract

Peritonitis due to non-fermentative Gram-negative bacilli (NFGNB) is a serious complication of peritoneal dialysis (PD), with a severe clinical course and high technique failure rate. Factors as bacterial virulence, antimicrobial resistance, biofilm formation, among others, have been reported, but the limited amount of evidence does not allow to conclude on the factors responsible for the worst clinical course of these infections. The objective of this study was to evaluate the influence of the microbiological characteristics, patients conditions, and treatment on evolution of peritonitis episodes at a single center in an 18 - year period. In vitro susceptibility, biofilm production, and clonal profile analysis of bacteria by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were performed in all isolates. The presence of virulence markers (alginate, exoenzyme S, phospholipases C, exotoxin A, alkaline protease, elastase, and rhamnolipids) was genotyped in bacterial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. From the data referring to the patient and causal agent, associations between the microbiological, patient characteristics, and treatment on the resolution rate of peritonitis were analyzed. The most frequent species was *Pseudomonas aeruginosa* (45.59%), followed by *Acinetobacter baumannii* complex (17.65%). The study of the virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* revealed the presence of virulence factors in 100% of the cases, except for exoenzyme S (58.33%) and hemolytic phospholipase C (87.5%). There was a high proportion of antimicrobial resistant, in particular to amikacin (36.73%) and ciprofloxacin (44.9%), with sensitivity to beta-lactam above 70%. A high (73.08%) proportion of biofilm producing isolates was observed. The results of the PFGE typing revealed a polyclonal profile for most of the isolates; however, for the *Acinetobacter baumannii* complex species the analysis revealed a cluster at interval from 2000 to 2008, with antimicrobial multi resistance profile, suggest that peritonitis by this agent had a hospital source. The evolution of the episodes showed a reduced resolution rate (35.29%). The susceptibility to amikacin and to cefepime were independently associated with a higher odds of resolution, while the concomitant presence of PD catheter exit site infection was an independent predictor of non-resolution. In conclusion, peritonitis due to NFGNB in PD are infections with reduced resolution rate; bacterial resistance is an independent predictor of lower odds of resolution. Peritonitis by *Acinetobacter* spp. can represent serious

infection, potentially of nosocomial origin, which should make reinforce the care regarding its clinical management.

Key words: peritoneal dialysis, peritonitis, virulence factors, antimicrobial resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*

Lista de Figuras

Figura 1 - Número total de pacientes e episódios de peritonite da Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas de Botucatu no período de junho de 1997 a dezembro de 2015.	35
Figura 2 - Perfil dos BGNNF provenientes de culturas de efluente peritoneal de pacientes tratados por DP na Unidade de Diálise do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; entre junho de 1997 e dezembro de 2015.	36
Figura 3 - Sensibilidade Antimicrobiana dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Achromobacter</i> spp. e <i>Burkholderia gladioli</i> de culturas de efluente peritoneal de pacientes tratados por DP na Unidade de Diálise do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; entre junho de 1997 e dezembro de 2015.....	37
Figura 4 - Visualização da produção de biofilme de alguns isolados em placa de poliestireno	39
Figura 5 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, AppliedMaths) dos perfis PFGE – <i>Spel</i> de <i>P.aeruginosa</i> isoladas de peritonite em pacientes tratados por diálise peritoneal.	40
Figura 6 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, AppliedMaths) dos perfis PFGE – <i>Apal</i> de <i>A. baumannii</i> isolados de peritonite em pacientes tratados por diálise peritoneal	41
Figura 7 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, AppliedMaths) dos perfis PFGE – <i>Apal</i> de <i>A. haemolyticus</i> isolados de peritonite em pacientes tratados por diálise.	41

Lista de Quadros

Quadro 1 - Iniciadores para amplificação dos genes codificadores dos fatores de virulência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Quadro 2 - Caracterização da virulência e do perfil antimicrobiano dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> agrupados em clusters.	40
Quadro 3 - Caracterização do perfil antimicrobiano e produção de biofilme dos isolados do complexo <i>A. baumannii</i> agrupados em um cluster.	41

Lista de Tabela

Tabela 1: Frequência e percentagem de isolados sensíveis <i>in vitro</i> para os diferentes bastonetes Gram negativos não fermentadores.	38
Tabela 2: Características de 63 pacientes em diálise peritoneal à época do 1º episódio de peritonite por BGNNF	42
Tabela 3: Fatores associados ao desfecho cura em 68 episódios de peritonite por BGNNF em pacientes em diálise peritoneal. Análise univariada.	46
Tabela 4: Fatores associados ao desfecho cura em 68 episódios de peritonite por BGNNF em pacientes em diálise peritoneal. Análise multivariada.	47

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Gerais	26
3.2 Específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Métodos microbiológicos.....	28
4.1.1 Cultura e armazenagem	28
4.1.2 Identificação	28
4.1.3 Avaliação do perfil de virulência das amostras de <i>P.aeruginosa</i>	29
4.1.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de E-test.....	30
4.1.5 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	31
4.1.6 Produção de Biofilme	32
4.2 Dados clínicos e demográficos	32
4.3 Associações clínico-microbiológicas.....	33
4.3.1 Influência das características microbiológicas na evolução e complicações das peritonites por BGNNF	33
4.3.2 Influência das características do paciente e do tratamento antimicrobiano na evolução e complicações das peritonites por BGNNF.....	33
4.3.3 Métodos estatísticos	33
5. ASPECTOS ÉTICOS	34
6. RESULTADOS	34
6.1 Dados microbiológicos	34
6.1.1 Descrição da amostra	34
6.1.2 Identificação dos BGNNF.....	35
6.1.4 Sensibilidade bacteriana <i>in vitro</i> por E-test:	36
6.1.5 Produção de biofilme	38
6.1.7 Perfil de virulência dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	39
6.1.8 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	39
6.2 Dados clínicos e demográficos	42
6.2.1 Características dos pacientes estudados	42

6.2.2 Caracterização do tipo de episódio.....	42
6.2.3 Apresentação clínica	42
6.2.4 Tratamento antimicrobiano empírico.....	43
6.2.5 Evolução clínica das peritonites	43
6.2.6 Fatores associados ao agente causal, ao paciente e ao tratamento, na evolução das peritonites.	43
6.2.6.1 Etiologia das peritonites e evolução clínica.	43
6.2.6.2 Resistência bacteriana e evolução das peritonites.	44
6.2.6.3 Produção de biofilme e evolução das peritonites.....	44
6.2.6.5 Marcadores de virulência de <i>P. aeruginosa</i> e evolução das peritonites	44
6.2.6.6 Fatores associados ao paciente, episódio de peritonite e tratamento na evolução das infecções	45
6.2.6.7 Análise multivariada: Fatores associados ao desfecho cura para episódios de peritonite por BGNNF	45
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é considerada um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Causada principalmente pelo diabetes mellitus, hipertensão arterial e doenças glomerulares primárias, tem prevalência estimada, em adultos com mais de 20 anos de 10,4% em homens e 11,8% em mulheres.^{1,2}

Sua evolução para DRC de estágio terminal (DRct) representa sério desfecho de saúde com alto custo econômico e social, que requer terapia de reposição renal dialítica (hemodiálise e diálise peritoneal) ou transplante para manutenção da vida, acometendo todos os âmbitos da saúde desses indivíduos.³⁻⁵

Com aumento progressivo da incidência e prevalência nos países desenvolvidos, a DRct é em grande componente nos custos dos sistemas de saúde, com crescimento anual em programas de diálise variando de 6 a 12% nas últimas duas décadas e com aumento prospectivo, especialmente nos países em desenvolvimento.⁶ Em termos globais, cerca de 2,6 milhões de pessoas receberam diálise em 2010, um número que deverá aumentar para 5,4 milhões até 2030.⁷

No Brasil, o Censo Brasileiro de Diálise de 2016 mostrou, no período de 1999 a 2016, aumento de 1,5 vezes no número de clínicas de diálise e de 2,9 vezes no número total de pacientes, sendo que em 2016 havia 757 unidades de diálise e 122.825 pacientes submetidos a procedimento dialítico; destes mais de 90% tratados por hemodiálise (HD) e cerca de 8% por diálise peritoneal (DP).⁸

A DP foi introduzida como método de substituição da função renal, em pacientes cronicamente urêmicos, por Popovich e Moncrief, entre 1976 e 1978,^{9,10} A primeira modalidade descrita e amplamente utilizada até os dias atuais foi a DP ambulatorial contínua (DPAC),¹⁰ seguida pela diálise peritoneal automatizada (DPA) proposta por Dias-Buxo et al¹¹, no início dos anos 80.

Na DPAC, o procedimento é realizado manualmente, sendo que o paciente ou cuidador realizam quatro a cinco trocas de diálise diariamente, a intervalos de cerca de seis horas. Na DPA, uma máquina cicladora é programada para realizar a infusão

e drenagem da solução de diálise, sendo que a maior parte do procedimento é realizado no período noturno.¹²

O grande desenvolvimento tecnológico relacionado aos materiais utilizados, dispositivos de conexão e equipamentos, ao lado dos avanços na profilaxia antimicrobiana, aumentou substancialmente a segurança das técnicas de DP, sendo que essa modalidade passou a ser empregada rotineiramente nos pacientes cronicamente dialisados. Vários estudos ao longo das últimas duas décadas mostraram que os resultados clínicos e a sobrevida dos pacientes em DP são semelhante aos tratados por HD.^{13,14}

O desenvolvimento e os resultados clínicos da diálise peritoneal (DP), historicamente, têm sido comprometidos pelas peritonites, que se mantêm como a principal complicação da DP.¹⁵ Revisão sobre as peritonites na América Latina mostrou ser esta complicação causa frequente de hospitalização e, invariavelmente, a causa mais comum de falência da técnica de DP, nessa região.¹⁶ Ainda relacionado a falência da técnica, Davenport,¹⁵ em estudo que auditou várias unidades de Diálise, em Londres, mostrou que a peritonite foi a causa mais comum para tal ocorrência. Dados da coorte brasileira BRAZ PD, com mais de 7000 pacientes incidentes, mostraram que após o óbito, as peritonites são a principal causa de saída do paciente do método de DP, o que corresponde a cerca de 23% dos casos.¹⁷ Frequência semelhante foi encontrada por Guali et al,¹⁸ em estudo realizado com pacientes australianos do registro ANZDATA, no qual a peritonite causou falência da técnica de DP em 29% dos casos, também contribuindo para maior morbidade e mortalidade dos pacientes. Embora se considere que menos de 5% dos episódios de peritonite resultem em óbito, a peritonite é associada, com frequência à mortalidade dos pacientes em DP. Boudville et al,¹⁹ analisando dados do registro ANZDATA, relataram que entre os pacientes que foram transferidos para a hemodiálise em decorrência de peritonite, 19% evoluíram para óbito nos primeiros 30 dias. Resultados da coorte BRAZ-PD, recentemente publicados, mostraram que a peritonite foi preditor independente de morte cardiovascular ocorrida após pelo menos 30 dias do episódio infeccioso e que a frequência de peritonite foi fortemente associada com aumento do risco desse evento.²⁰

As peritonites em DP são causadas, na maior parte dos episódios, por cocos Gram positivos, em particular pelos Estafilococos coagulase-negativa (ECN) e pelo *Staphylococcus aureus*, relatado como o agente etiológico mais frequente no Brasil.²¹ Nos últimos anos, entretanto, os cocos Gram-positivos, em especial, o *S. aureus*, tem perdido as primeiras posições como agente causal das peritonites em DP.^{16,22} Além dos avanços nas técnicas de conexão, o uso rotineiro da mupirocina no local de saída do cateter peritoneal, possivelmente tem contribuído para essa condição.²³

Por sua vez, a proporção de peritonites causadas por bastonetes Gram-negativos (BGN) tem se mostrado crescente,^{18,24-26} sendo que alguns autores têm relatado que os BGN são as etiologias mais frequentes das infecções peritoneais em DP.^{16,22}

Além disso, peritonites por BGN são muitas vezes mais graves e associadas a piores desfechos que aquelas causadas por cocos Gram-positivos, em particular os ECN.²⁷⁻²⁹

Kim et al²⁷ relataram que as taxas de remoção de cateter de diálise e a mortalidade associada à peritonite foram significativamente maiores nas peritonites por BGN em comparação com as peritonites por Gram-positivos. Além da perda de cateter, Prasad et al³⁰ encontraram diferença significativa em relação a internação hospitalar em peritonite por Gram-negativos, sendo as taxas maiores do que na peritonite por Gram-positivos.

As razões para o curso clínico desfavorável das peritonites por BGN não foram completamente elucidadas, pois a maior parte dos estudos publicados tratam-se de relatos e série de casos,²⁵ mas alguns fatores podem ser contributivos. Entre eles se destacam a virulência inerente à espécie de BGN e a resistência bacteriana.

Entre os BGN, o grupo composto pelos BGN não fermentadores (BGNNF), em particular as espécies de *Pseudomonas*, são importantes causas de peritonite grave, com elevada frequência de perda do cateter de diálise e falência na técnica.³¹ Das 248 espécies de *Pseudomonas* descritas,³² a *Pseudomonas aeruginosa* é a mais estudada e de maior importância clínica, sendo bactéria oportunista, que pode colonizar vários tecidos, devido principalmente à presença de fímbria, estrutura responsável pela motilidade celular, quimiotaxia e mediação das interações superficiais iniciais.³³⁻³⁵

Exoenzimas amplificam a capacidade de invasão tecidual, sendo secretadas pelos sistemas de secreção proteica do Tipo II ao Tipo IV, localizados nos operons *xcp* e *hxc*,³⁶ essas são produzidas pelo periplasma bacteriano e agem no meio extracelular para facilitar o processo invasivo e proliferativo. Entre os principais produtos relacionados a este processo temos a exotoxina A, inibidora da síntese de proteínas eucarióticas;^{33,34,37} exoenzima S, substância apoptótica, causadora de necrose e morte de células imunes do hospedeiro;³⁸ elastase, degradante de colágeno e barreiras físicas do hospedeiro, e também inibidora da quimiotaxia dos monócitos;³⁹ protease alcalina, que inativa o complemento, a fagocitose dos neutrófilos e degrada a fibronectina; alginato, fator protetor das defesas imunitárias,⁴⁰ responsável pela estabilidade estrutural, formação de biofilmes⁴¹ e também resistência aos antibióticos.⁴²

Também o BGNNF do gênero *Acinetobacter* tem sido relevante entre os BGN causadores de peritonites em DP. Na série de Lye et al⁴³ entre 200 episódios de peritonite, aqueles causados por *Acinetobacter* spp. representaram 10,7% dos casos, sendo o BGN mais prevalente. Entre 59 espécies genômicas descritas,⁴⁴ quatro espécies fenotipicamente semelhantes, que pertencem ao complexo o *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* são responsáveis pela maior parte das infecções adquiridas na comunidade ou em ambiente hospitalar. Estas espécies têm habilidade de resistir à dessecação e a desinfetantes, colonizar a pele e formar biofilmes, sendo adaptadas para colonizar cateteres. O desenvolvimento alarmante de resistência aos antibióticos, bem como o surgimento de *Acinetobacter* multirresistente a fármacos (MDRA) e *Acinetobacter* resistente a carbapenem (CRA) tem sido uma preocupação crescente⁴⁵ Estudos sobre a peritonite relacionada à DP por *Acinetobacter* também tem sido escassos,^{46,47} assim um enfoque maior sobre as características do paciente, os resultados do tratamento e os preditores de um prognóstico desfavorável serão de grande importância na era do aumento das infecções por MDRA.

A formação de biofilme, condição comum a vários tipos de microrganismos, torna-os várias vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos.⁴⁸ Estudos mostraram que essa resistência aos antimicrobianos pode ser devido à penetração limitada destes, ou à atividade metabólica mais lenta, pois algumas partes do biofilme são difíceis de atingir. Alguns antibióticos tiveram sua atividade reduzida em

ambientes anaeróbios, o que também contribui para a resistência do biofilme, devido à disponibilidade de oxigênio ser reduzida nos níveis mais profundos.⁴⁹

A concentração inibitória mínima (MIC) é o método padrão para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos; no entanto, o MIC pode ter valor limitado na determinação da verdadeira sensibilidade na presença de biofilme, o que pode explicar, pelo menos em parte, o mau resultado encontrado para alguns BGNNF causadores de peritonite em DP, apesar da antibioticoterapia ser considerada eficaz, pelos testes-padrão de sensibilidade. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, realizados em laboratórios clínicos de rotina para a escolha do tratamento antimicrobiano, continuam sendo realizados com as células planctônicas, o que dificulta a avaliação da eficácia do antimicrobiano testado, já que no paciente essas bactérias estão protegidas no biofilme e a resposta não será a mesma da obtida nos testes.⁵⁰

Moskowitz et al⁵⁰ mostraram, em 94 isolados de *P. aeruginosa*, provenientes de um Hospital Infantil Regional de Seattle, que as concentrações inibitórias de biofilme (BICs) foram muito maiores que as correspondentes as MICs convencionalmente determinadas para os antibióticos betalactâmicos, sendo que algumas concentrações precisavam ser 64 vezes maiores do que as determinadas pelo MICs para obter-se uma antibioticoterapia eficaz. Ainda que discrepâncias entre a sensibilidade avaliada pelo MIC e a observada em ensaios que consideraram o biofilme tenham sido descritas para espécies de *Pseudomonas*^{50,51} a influência da produção do biofilme na evolução das peritonites em DP causadas por BGNNF não foi previamente avaliada.

A resistência de BGNNF aos antibióticos comumente recomendados é potencialmente uma das principais causas do resultado clínico desfavorável das peritonites por esses agentes.⁵² Notadamente, em nosso centro, aumento da prevalência da resistência dos BGNNF, isolados de episódios de peritonite, aos antibióticos rotineiramente prescritos para o tratamento dessas infecções foi observado ao longo dos anos⁵³

Entre as classes de antimicrobianos, as recomendadas para o tratamento das peritonites por BGNNF são aminoglicosídeos, quinolonas, e β -lactâmicos, sendo destaque nesta classe as cefalosporinas e carbapenêmicos.⁵⁴

Os aminoglicosídeos contêm em sua estrutura grupos amino ou hidroxila, e quando modificados nestes agrupamentos perdem a habilidade de se ligar ao ribossomo e, conseqüentemente, inibir a síntese proteica bacteriana. A modificação ocorre principalmente por enzimas, produzidas pelos isolados bacterianos. Atualmente, mais de 50 enzimas modificadoras já foram descritas e classificadas como N-acetiltransferases, O-adeniltransferases e O-fosfotransferases. Os genes responsáveis por esta resistência encontram-se geralmente em plasmídios ou transposons.⁵⁵

As quinolonas inibem a ação da DNA girase e topoisomerase IV, impedindo a replicação do DNA bacteriano. A resistência às quinolonas está associada a alguns mecanismos de resistência como alteração de permeabilidade, hiperexpressão de bombas de efluxo, alterações do sítio de ação (topoisomerasas), resistência mediada por plasmídeos e alteração enzimática da molécula do antimicrobiano.⁵⁶

Os β -lactâmicos possuem em comum no seu núcleo estrutural o anel β -lactâmico, o qual confere atividade bactericida. Conforme a característica da cadeia lateral define-se seu espectro de ação e suas propriedades farmacológicas. O mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos resulta em parte da sua habilidade de interferir com a síntese do peptidoglicano, responsável pela integridade da parede bacteriana. Pertencem a este grupo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams.^{57,58} Pesquisas evidenciam quatro mecanismos de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos,⁵⁹ como a alteração do sítio de ação dos antimicrobianos ou das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), não tão comum em Gram-negativo, alteração da permeabilidade da membrana celular, efluxo ativo e inativação enzimática, principalmente por produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)⁶⁰ e carbapenemases.⁶¹

Uma característica marcante dos bacilos Gram-negativos é a capacidade de acumularem resistência cruzada aos antimicrobianos, desencadeada pela co-resistência, ou seja, pela presença de diversos mecanismos de resistência em um único microrganismo, acarretando resistência aos múltiplos fármacos, o que promove a circulação de cepas multirresistentes.⁵⁹

A genotipagem de cepas tem sido cada vez mais importante, a fim de verificar se os organismos envolvidos em determinadas doenças, surtos hospitalares ou em

eventos de transmissão cruzada, como resistência a antimicrobianos, possuem possível relação clonal.⁶² A ferramenta de tipagem molecular mais comum em países desenvolvidos é a técnica de PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis).⁶³ Uma grande vantagem do PFGE é a possibilidade de grandes fragmentos de DNA serem separados, com até 1.000.000 de pares de base, ao contrário do convencional gel de agarose. O cromossomo bacteriano é, portanto, sujeito à análise, oferecendo ao método PFGE o poder para discriminar claramente as cepas e demonstrar a relação genética entre os isolados com alta reprodutibilidade.⁶² É possível que alguns clones bacterianos sejam mais propensos que outros a determinar doença de maior gravidade.⁶³

Ainda que condições gerais ligadas ao microrganismo tenham sido previamente estudadas quanto ao risco de peritonites, somente um pequeno número de estudos relacionados aos preditores clínicos têm relatado a influência das condições clínicas e demográficas nos desfechos clínicos de um episódio de peritonite em DP,⁶⁴⁻⁶⁶ particularmente naqueles causados por BGNNF. O uso de dois agentes antimicrobianos favoreceu o resultado terapêutico nas peritonites por espécies de *Pseudomonas*,⁶⁷ sendo que resultado semelhante, porém com significância estatística limítrofe foi observado nas peritonites por enterobactérias.⁶⁸ Na série de Szeto et al⁶⁸ a presença de infecção do local de saída do cateter peritoneal e o uso recente de antibióticos foram associados com pior resposta terapêutica, enquanto que Jarvis et al⁶⁹ relataram que a idade influenciou negativamente a probabilidade de cura da peritonite.

O presente estudo pretendeu avaliar, em pacientes tratados por DP, a influência de fatores associados ao agente causal, ao paciente e ao tratamento, na evolução das peritonites por BGNNF.

2. JUSTIFICATIVA

Peritonites por BGNNF são complicação grave da DP, sendo que percentagem significativa dessas infecções apresenta curso clínico de grande gravidade e taxa de falência do método maior que as causadas pelos cocos Gram-positivos, em particular os ECN. Ainda que fatores associados às bactérias, como as do gênero

Pseudomonas, como a resistência bacteriana, tenham sido relatados como responsáveis pelo curso clínico menos favorável dessas infecções, o limitado conjunto de evidências disponível não permite afirmar ao certo os fatores associados ao curso clínico e prognóstico dessas infecções. A análise conjunta de fatores associados ao agente causal, ao paciente e ao tratamento das infecções peritoneais por BGNNF em um mesmo conjunto de episódios de peritonites, ocorridos em um mesmo centro de Diálise, pode potencialmente contribuir para a identificação dos determinantes da evolução dessas infecções, e deste modo estas informações podem servir como ferramentas úteis para a adoção de estratégias específicas e mais intensivas para o manejo clínico dessas peritonites.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Estudar episódios de peritonite por BGNNF ocorridos em pacientes tratados por DP, em único centro universitário, em um período de 18 anos e avaliar a influência das características microbiológicas do agente causal, das condições clínicas do paciente e do tratamento antimicrobiano no quadro clínico e evolução dessas infecções.

3.2 Específicos

Em isolados de peritonites em DP, causadas por bastonetes Gram-negativos não fermentadores:

3.2.1 Pesquisar genotipicamente a presença de marcadores de virulência em *P. aeruginosa*;

3.2.2 Determinar a sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos;

3.2.3 Determinar fenotipicamente a produção de biofilme;

3.2.4 Analisar o perfil clonal das bactérias mais prevalentes, pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE);

3.2.5 Estabelecer associações entre as características microbiológicas do agente causal com a evolução clínica e as complicações da peritonite;

3.2.6 Estabelecer associações entre as características demográficas e clínicas dos pacientes e do tratamento antimicrobiano na evolução clínica e as complicações da peritonite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados microbiológicos e clínicos dos episódios de peritonite bacteriana ocorridos entre junho de 1997 a dezembro de 2015, em pacientes portadores de doença renal crônica, tratados por DP, na Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, causados por BGNNF foram revisados. Foram incluídos no estudo os casos com amostras viáveis para realização dos testes laboratoriais e excluídos os casos que apresentaram dados incompletos nos registros clínicos e prontuários médicos.

De acordo com as diretrizes da International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD),⁵⁴ as seguintes definições foram utilizadas:

Peritonite: ocorrência de efluente peritoneal turvo e acompanhado de elevação da celularidade peritoneal no efluente da diálise, com mais de 100 células/mm³ e predomínio (pelo menos 50%) de polimorfonucleares.

Recidiva: episódio de reaparecimento dos sinais e sintomas de peritonite, no decorrer dos primeiros 28 dias depois de cessado o tratamento antimicrobiano, com crescimento em cultura do mesmo agente microbiano isolado anteriormente.

Repetição: episódio de peritonite ocorrido após 28 dias do término do tratamento antimicrobiano, com crescimento em cultura do mesmo agente microbiano identificado anteriormente.

Recorrência: episódio de peritonite ocorrido dentre os primeiros 28 dias do término do tratamento antimicrobiano, com crescimento em cultura de agente microbiano diferente do identificado anteriormente.

Cura: o desaparecimento dos sinais e sintomas de peritonite, até o 5º dia de tratamento, sem alteração do protocolo terapêutico inicial.

Refratariedade: ausência de melhora clínica e redução celularidade após 5 dias de tratamento adequado, guiado por teste de sensibilidade *in vitro*.

Óbito relacionado à peritonite: óbito em um paciente com peritonite ativa ou internado com peritonite, ou ocorrido dentro de duas semanas após o início do episódio.

4.1 Métodos microbiológicos

4.1.1 Cultura e armazenagem

Após o diagnóstico clínico de peritonite, conforme as recomendações da ISPD (49,50) 50 ml de efluente peritoneal da última bolsa trocada pelo paciente, foram assepticamente coletados e imediatamente encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas – Setor de Microbiologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O efluente foi centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm, sendo o precipitado ressuspenso em 10 ml de solução salina estéril, e injetado em frascos para processamento automatizado (BACTEC, BD). Após a identificação dos microrganismos isolados do líquido peritoneal, os mesmos foram encaminhados para o Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, onde foram armazenados a -70°C na Coleção de Culturas. Para o presente estudo, as amostras estocadas foram reisoladas em placas de ágar MacConkey (Oxoid), para confirmação da pureza e viabilidade.

4.1.2 Identificação

Obedecendo as etapas de identificação microbiológica as colônias foram submetidas à coloração de Gram objetivando sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação das características das colônias, as amostras foram identificadas por testes bioquímicos convencionais, conforme descrito por Bouvet e Grimont⁷⁰ e Henry & Speert.⁷¹

A identificação bioquímica foi confirmada por espectrometria de massas. As cepas foram antes cultivadas em ágar sangue por 24 h à 37°C e inoculadas na placa de análise com um loop descartável 1 µl. As preparações foram cobertas com 1 µl de solução matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético) e desidratada ao ar por 2 min à temperatura ambiente. O preparo da placa descartável foi realizado com o software VITEK® MS Preparation Station para vincular as informações da amostra ao espectrofotômetro VITEK® MS, utilizando as placas alvo FlexiMass MALDI de uso único. Os espectros de massa foram gerados com um espectrômetro de massa VITEK® MS Axima® Assurance (bioMérieux), em modo linear positivo, a uma frequência de 50 Hz, com uma tensão de aceleração de 20 kV e um tempo de atraso de extração de 200 ns. Para cada espectro 500 disparos em passos de 5 disparos de diferentes posições do alvo (modo automático) foram coletados pelo espectrômetro de massas operando em conjunto com o software Acquisition Station (VITEK® MS versão 1.0.0). Os espectros de massa medidos variaram de 2.000 a 20.000 Da. Para cada amostra bacteriana, as impressões digitais de massa foram processadas pelo mecanismo de computação e pelo algoritmo Advanced Spectra Classifier (ASC) associado ao sistema VITEK MS, que identifica automaticamente o microrganismo comparando as características do espectro obtido (presença e ausência de picos específicos) com o espectro típico de cada espécie reivindicada.⁷²

4.1.3 Avaliação do perfil de virulência das amostras de *P. aeruginosa*

A avaliação do perfil de virulência foi realizada apenas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual as amostras foram avaliadas quanto a presença dos genes que codificam o alginato (algD), elastase (lasB), fosfolipase C hemolítica (plcH), fosfolipase C não hemolítica (plcN), exoenzima S (exoS) e exotoxina A (toxA). O protocolo, para cada reação de PCR e respectivos primers (Quadro 1), foi executado conforme descrito por Lanotte et al⁷³. As amplificações foram realizadas usando-se os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 1,50 min, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos

amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% corados com Syber safe utilizando luz UV para visualização das bandas.

Quadro 1 - Iniciadores para amplificação dos genes codificadores dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*.

Fator de virulência	Gene	Iniciador	Seqüência (5'-3')	Produto pb
Alginato	<i>algD</i>	<i>algD1</i>	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT	1310
		<i>algD2</i>	CTACCAGCAGATGCCCTCGGG	
Exoenzima S (citotoxina)	<i>exoS</i>	<i>exoS1</i>	CTTGAAGGGACTCGACAAGG	504
		<i>exoS2</i>	TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT	
Fosfolipase C hemolítica	<i>plcH</i>	<i>plcH1</i>	GAAGCCATGGGCTACTTCAA	307
		<i>plcH2</i>	AGAGTGACGAGGAGCGGTAG	
Fosfolipase C não hemolítica	<i>plcN</i>	<i>plcN1</i>	GTTATCGCAACCAGCCCTAC	466
		<i>plcN2</i>	AGGTGGAACACCTGGAACAC	
Exotoxina A	<i>toxA</i>	<i>toxA1</i>	GGTAACCAGCTCAGCCACAT	352
		<i>toxA2</i>	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	
Protease alcalina	<i>para</i>	<i>aprA1</i>	ACCCTGTCCTATTCGTTCC	140
		<i>aprA2</i>	GATTGCAGCGACAACCTGG	
Elastase	<i>lasB</i>	<i>lasB1</i>	GGAATGAACGAAGCGTTCTC	300
		<i>lasB2</i>	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	
Ramnolipídeos	<i>rhlAB</i>	<i>rhlAB1</i> <i>rhlAB2</i>	TCATGGAATTGTCACAACCGC ATACGGCAAATCATGGCAAC	151

4.1.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de E-test

A sensibilidade in vitro das amostras de microrganismos estudadas foi testada para os antimicrobianos: amicacina, ciprofloxacina, cefepime, imipenem e ceftazidima. Para tanto, foi determinada a CIM dessas drogas, através do E-test. O procedimento utilizou tira de plástico inerte com gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado. Os parâmetros técnicos envolvidos na realização do E-test foram: meio de cultura de Mueller-Hinton, inóculo com concentração final semelhante à turvação correspondente a escala 0,5 de MacFarland e incubação a 35°C por 24 h conforme as recomendações do fabricante.

4.1.5 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE das amostras foi feito segundo o protocolo de Gautom.⁷⁴

As amostras foram colocadas em caldo BHI onde cresceram por 24h. Em um microtubo previamente pesado, 1ml da amostra crescida foi centrifugada à 13.000 rpm por 1min. Depois de desprezado o sobrenadante, o microtubo foi novamente pesado e foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) mais a diferença entre o peso final e inicial em ml. Lisozima (10 mg / ml de solução stock) e proteinase K (20 mg / ml de solução stock) foram adicionados para uma concentração final de 1 mg / ml. As suspensões bacterianas foram incubadas a 37°C durante 10 a 15 min. Agarose low melt foi preparada em água com concentração final de 1,2% e mantida a 55°C em um banho d'água. Após a incubação da lisozima-proteinase K, 7ml de dodecilsulfato de sódio a 20% e 140 ml de 1,2% dessa agarose foram misturados com cada suspensão bacteriana. Esta mistura de bactéria-agarose foi imediatamente adicionado aos moldes de plug (Bio-Rad Laboratories). Os plugues foram colocados para solidificar por 5 a 10 min a 4°C e, em seguida, transferidos para tubos de 2 ml de fundo redondo contendo 1,5 ml de Tampão ESP (EDTA 0,5 M, pH 9,0; lauril sarcosina de sódio a 1%; 1 mg de proteinase K por ml). Eles foram incubados a 55°C por 2 h. Após a conclusão da proteólise, os tampões foram transferidos para tubos de 50 ml contendo 8 a 10 ml de água destilada estéril, pré-aquecida (50 ° C) e incubada por 10 min a 50°C com mistura suave sob agitação. Subsequentemente, quatro lavagens de 50°C foram realizadas em banho-maria 15 min cada com 8 a 10 ml de tampão TE pré-aquecido (50 ° C) (10mM Tris, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0). Os plugues foram então arrefecidos à temperatura ambiente em tampão TE. Para a digestão com endonuclease de restrição, duas fatias de cada plug foram incubadas a 37 ° C por 3 h com 30 U de enzima Apal ou SpeI, em 100 ml do tampão de enzima de restrição apropriado. Um gel de agarose à 1% foi preparado com TBE 0,5X onde os plugues foram colocados e cobertos com agarose low melt. A corrida foi feita à 6V/cm e 14°C por 21h, com tempos de pulso de 5 a 35s. Após a eletroforese, os géis foram corados por 20 min em 500 ml de água destilada estéril contendo 50 ml de brometo de etídio (10 mg / ml) e descorados em três lavagens de 30 min cada em 1 litro de água destilada. Os géis foram observados sob iluminação UV e fotografados. Os perfis

de DNA gerados por PFGE foram inseridos no software BioNumerics, versão 3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) para análise.

4.1.6 Produção de Biofilme

As amostras foram crescidas em TSB a 37°C por aproximadamente 18 horas. Para avaliar a capacidade das amostras em aderir a superfícies abióticas, foram empregadas placas de poliestireno com 24 orifícios. Em cada orifício foi adicionado 1mL de DMEM e aproximadamente 50 µL da suspensão bacteriana (correspondendo aproximadamente 10⁸ UFC/ml), e também inoculado um orifício apenas com e meio de cultura para ser utilizado como padrão de leitura ou branco. As placas inoculadas foram incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas. Após o período de incubação as placas foram lavadas com PBS por 4 vezes com o intuito de remover as bactérias não aderentes. Bactérias aderidas a superfície abiótica, foram então fixadas com formalina (2%). Após 20 minutos de fixação a formalina foi removida e as preparações lavadas novamente 4 vezes com água. Em seguida as preparações foram coradas com uma solução de cristal violeta (1%) por aproximadamente 20 minutos. Após esse período, as preparações foram lavadas por 3 vezes com água com o intuito de remover o excesso de corante. Após um período de secagem, o corante foi solubilizado com metanol (por aproximadamente 10 minutos), e a DO600 determinada.⁷⁵ O score utilizado para classificação de produção de biofilme foi dividido em quatro categorias: cepa não produtora (quando a DO da cepa foi menor que a DO do branco), fraca (DO da cepa entre a DO do branco e 2x a DO do mesmo), média (DO da cepa entre 2x DO do branco e 4x a DO do branco) e forte (DO da amostra maior que 4x a DO do branco).

4.2 Dados clínicos e demográficos

A partir dos prontuários médicos e registros clínicos da Unidade de Diálise, foram preenchidos protocolos com informações relativas a: (1) episódio de peritonite: data, tipo de episódio (nova infecção, recorrência, repetição), apresentação clínica, tratamento, evolução (cura, recidiva, remoção do cateter peritoneal), complicações (hipotensão, hospitalização e óbito); (2) presença de diabetes melito; (3) dados

demográficos: idade, sexo (masculino ou feminino), raça (branca ou não branca), tempo de tratamento dialítico (em meses); (4) método de diálise [DP ambulatorial contínua (CAPD) ou DP automatizada(DPA)].

4.3 Associações clínico-microbiológicas

4.3.1 Influência das características microbiológicas na evolução e complicações das peritonites por BGNNF

As características microbiológicas (espécie, produção dos fatores de virulência; produção biofilme, resistência bacteriana e genotipagem por PFGE) dos BGNNF foram estudadas quanto à associação com as variáveis de evolução clínica e complicações dos episódios de peritonite.

4.3.2 Influência das características do paciente e do tratamento antimicrobiano na evolução e complicações das peritonites por BGNNF

As características dos pacientes, demográficas (idade, sexo, cor da pele [branca ou não branca], tempo de tratamento dialítico até a peritonite [meses], tipo de DP [CAPD ou DPA]), e clínicas (tipo de episódio [nova infecção, recorrência, repetição], presença de diabetes) e do tratamento antimicrobiano (classe, monoterapia ou associação de drogas), foram estudadas quanto à associação com a evolução clínica dos episódios de peritonite.

4.3.3 Métodos estatísticos

Para comparação entre frequências foi utilizado o teste do Qui Quadrado ou o teste exato de Fisher, de acordo com as características da amostra. Devido ao grande número de fatores que fazem parte do presente estudo e ao fato de tratar-se de estudo observacional, foi adotado um modelo de regressão que incorporou o efeito de todos os fatores (de interesse ou de controle) na evolução da infecção. Para tanto, a evolução foi classificada em dois resultados (desfechos): cura e não-cura (refratariedade, remoção do cateter peritoneal antes do 5º dia, óbito e recidiva).

Inicialmente, foi realizada análise de regressão logística univariada e, a seguir, incluídos no modelo múltiplo aquelas com valor de $p < 0,20$. Para análise o modelo múltiplo de regressão logística com procedimento de variáveis escalonada (*stepwise*). Em caso de duas variáveis com colinearidade, uma foi excluída do modelo de regressão. Significância estatística foi definida como a ocorrência de um valor de $p < 0,05$.

5. ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com número do CAAE 64736017.2.0000.5411.

6. RESULTADOS

6.1 Dados microbiológicos

6.1.1 Descrição da amostra

A partir dos critérios de inclusão e de exclusão, foi estudado um total de 68 isolados de BGNNF obtidos de culturas de efluente peritoneal de pacientes tratados por DP na Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, que apresentaram peritonite bacteriana. A amostra se refere ao período compreendido entre junho de 1997 e dezembro de 2015 e foi oriunda de 63 pacientes. No período estudado houve 726 episódios de peritonites em 542 pacientes na unidade mencionada; destes, 194 (26,7%) foram causados por bastonetes Gram negativos, entre os quais houve 70 casos por BGNNF.

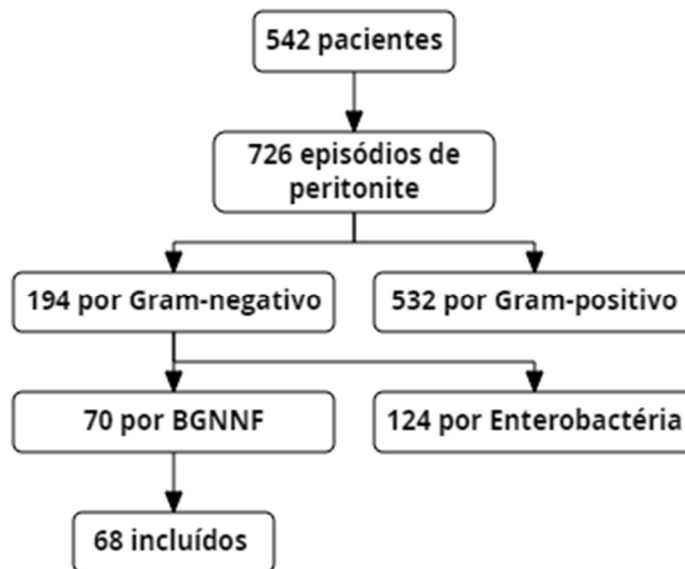


Figura 1: Número total de pacientes e episódios de peritonite da Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas de Botucatu no período de junho de 1997 a dezembro de 2015.

6.1.2 Identificação dos BGNNF

Dos 68 isolados do grupo BGNNF, 35 (51,47%) corresponderam a bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., a saber: *P. aeruginosa*, em 31 casos (45,59%); *Pseudomonas pútida* em 3 casos (4,41%), e *Pseudomonas fluorescens* em 1 caso (1,47%). Germes do gênero *Acinetobacter* spp. foram responsáveis por 21 peritonites (30,88%), sendo o isolado mais frequente o complexo *A. baumannii*, 12 casos (17,65%); seguido pelo *Acinetobacter haemolyticus*, 5 casos (7,35%), *Acinetobacter lwoffii*, 2 casos (2,94%) e *Acinetobacter ursingii*, 2 casos (2,94%). Dos 12 episódios causados por outros BGNNF, 6 episódios (7,35%) foram causados pelas espécies do gênero *Burkholderia* spp., com 5 episódios por germes do complexo *Burkholderia cepacia* (5,88%) e um caso por *Burkholderia gladioli* (1,47%). Bactérias do gênero *Achromobacter* spp. ocorreram em 5 episódios (7,35%), sendo 3 casos por *Achromobacter denitrificans* (4,41%) e 2 por *Achromobacter xylosoxidans* (2,94%) e por fim um caso por *Stenotrophomona maltophilia* (1,47%) (**Figura 1**).

Do total de episódios de peritonites incluídos no estudo, os ensaios microbiológicos foram realizados com amostras de 52 episódios apenas, pois não foi possível a recuperação das demais cepas.

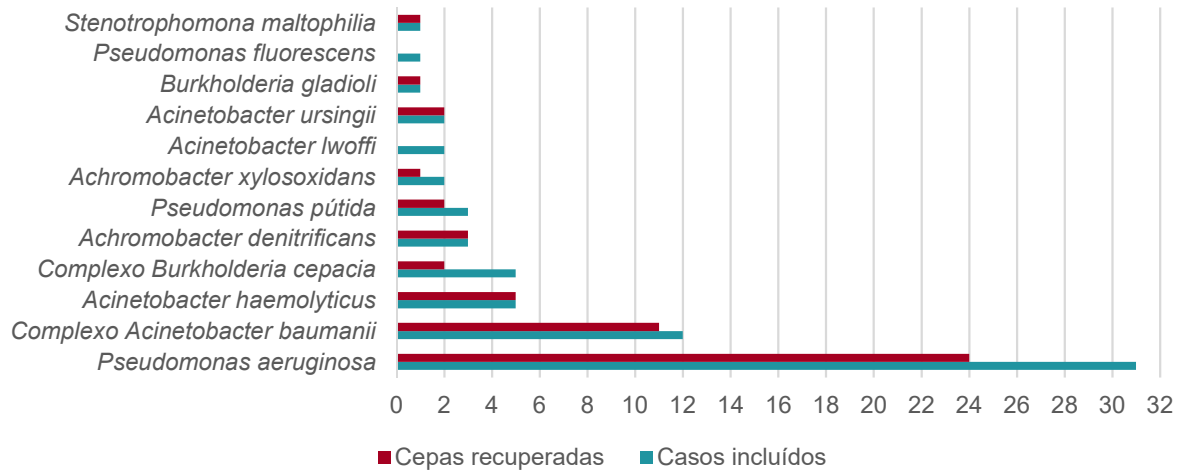


Figura 2 - Perfil dos BGNNF provenientes de culturas de efluente peritoneal de pacientes tratados por DP na Unidade de Diálise do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; entre junho de 1997 e dezembro de 2015.

6.1.4 Sensibilidade bacteriana *in vitro* por E-test:

Dos 68 casos por BGNNF, 52 foram testados, quanto à sensibilidade *in vitro*. Ceftazidima foi testada para todas as amostras, já a amicacina, ciprofloxacina, cefepime e imipenem foram testados para todas as amostras, exceto para os isolados do complexo *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomona maltophilia*.

Das 49 amostras testadas para todos os antibióticos, do gênero *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Achromobacter* spp. e um isolado da espécie *Burkholderia gladioli* obtivemos os seguintes resultados: para a amicacina observaram-se 14 casos de resistência e quatro de sensibilidade intermediária, com 31 sensíveis (63,27%); para o cefepime houve 10 isolados resistentes, sete com sensibilidade intermediária e 32 sensíveis (65,31%); para a ciprofloxacina, 16 resistentes, seis com sensibilidade intermediária e 27 sensíveis (55,10%), para o imipenem houve seis isolados resistentes, dois com sensibilidade intermediária e 41 sensíveis (83,67%); enquanto houve onze casos de resistência a ceftazidima, dois com sensibilidade intermediária e 36 sensíveis (73,47%); (**Figura 2**). Para os isolados do complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*, foi testado apenas a ceftazidima e houve sensibilidade nos três isolados testados (100%).

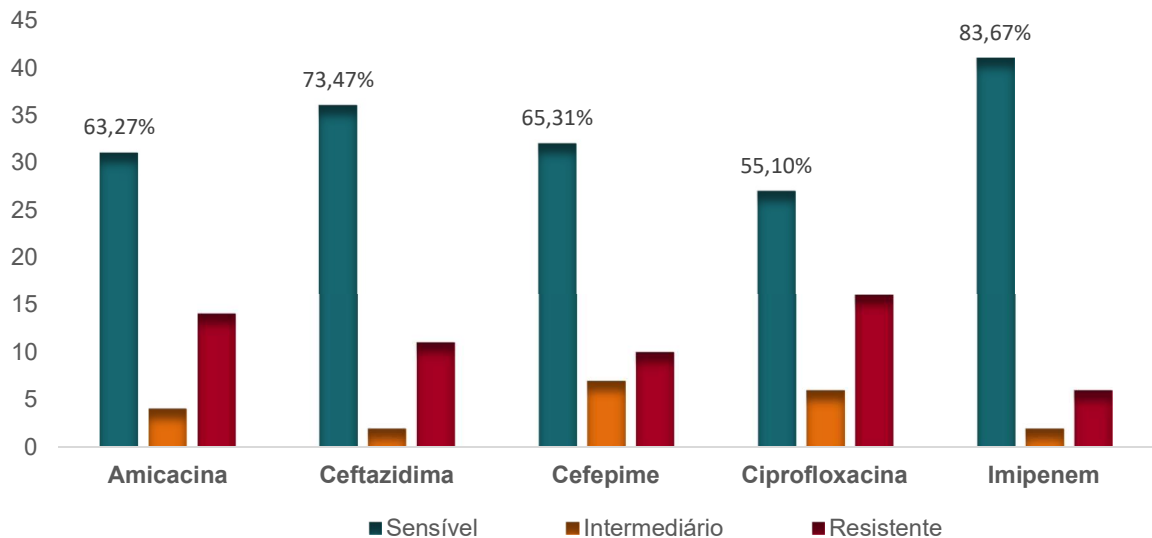


Figura 3 – Sensibilidade Antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Achromobacter* spp. e *Burkholderia gladioli* de culturas de efluente peritoneal de pacientes tratados por DP na Unidade de Diálise do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; entre junho de 1997 e dezembro de 2015.

A porcentagem de sensíveis foi significativamente maior para o imipenem que para a Amicacina ($p=0,02$) e Ciprofloxacina ($p=0,002$), não diferindo dos demais antimicrobianos. Houve tendência à maior porcentagem de sensíveis para a ceftazidima relação à ciprofloxacina ($p=0,057$).

A **Tabela 1** expressa a frequência e porcentagem de isolados sensíveis in vitro para os diferentes BGNNF, na qual pode-se observar que as *Pseudomonas* spp. apresentaram maior porcentagem de sensíveis à Amicacina, comparando-se ao *Acinetobacter* spp. ($p=0,0003$) e *Achromobacter* spp. ($p=0,03$), também maior sensibilidade à ceftazidima ($p=0$), à ciprofloxacina ($p=0,006$) e ao cefepime ($p=0,009$) que os *Acinetobacter* spp., e ainda maior sensibilidade ao cefepime ($p=0,04$) do que os *Achromobacter* spp.. As bactérias do gênero *Achromobacter* spp. tiveram maior taxa de sensibilidade à ceftazidima que as do gênero *Acinetobacter* spp. ($p=0,01$). Os diferentes BGNNF não diferiram quanto à sensibilidade ao imipenem.

Tabela 1 - Frequência e percentagem de isolados sensíveis *in vitro* para os diferentes bastonetes Gram negativos não fermentadores.

	AM	%	CF	%	CP	%	IM	%	CZ	%	Total	
<i>Pseudomonas</i> spp.	1997 F 2001	7	100,0	6	85,7	7	100,0	7	100,0	7	100,0	7
	2001 F 2004	3	100,0	2	66,7	3	100,0	2	66,7	3	100,0	3
	2004 F 2007	5	62,5	3	37,5	5	62,5	5	62,5	6	75,0	8
	2007 F 2010	3	75,0	3	75,0	3	75,0	3	75,0	4	100,0	4
	2010 F 2013	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1
	2013 H 2015	3	100,0	2	66,7	2	66,7	3	100,0	3	100,0	3
Total	22	84,6^{1,2}	17	65,4¹	21	80,8^{1,2}	21	80,8	24	92,3¹	26	
<i>Acinetobacter</i> spp.	1997 F 2001	2	50,0	2	50,0	3	75,0	4	100,0	3	75,0	4
	2001 F 2004	1	25,0	1	25,0	2	50,0	4	100,0	1	25,0	4
	2004 F 2007	2	66,7	1	33,3	0	0,0	2	66,7	0	0,0	3
	2007 F 2010	1	20,0	2	40,0	3	60,0	4	80,0	3	60,0	5
	2010 F 2013	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
	2013 H 2015	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1
Total	5	27,8	4	22,2	7	38,9	13	72,2	5	27,8	18	
<i>Achromobacter</i> spp.	1997 F 2001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2001 F 2004	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2004 F 2007	1	100,0	1	100,0	1	50,0	1	100,0	1	100,0	1
	2007 F 2010	0	0,0	1	33,3	0	0,0	3	100,0	3	100,0	3
	2010 F 2013	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2013 H 2015	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	1	25,0	2	50,0	1	25,0	4	100,0	4	100,0¹	4	

* AM: amicacina, CF: ciprofloxacina, CP: cefepime, IM: imipenem e CZ: ceftazidima

1= p<0,05 vs *Acinetobacter* spp.; 2: p<0,05 vs *Achromobacter* spp.

6.1.5 Produção de biofilme

A determinação da produção de biofilme foi possível em 52 amostras, destas 38 (73,08%) foram produtores de biofilme.

A produção de biofilme foi classificada em forte, média ou fraca, de acordo com a densidade óptica obtida. Houve 19 fortes produtores, 8 médios e 11 fracos produtores.

Em relação as espécies foram produtoras de biofilme 91,6% das *P. aeruginosa*, e dois isolados de *Pseudomonas putida* foram produtoras; 64,3% dos isolados do complexo *A. baumannii*, 100% dos *A. haemolyticus*, 50% dos *A. ursingii*; 33,3% dos *Achromobacter denitrificans* foram produtores e um isolado de *Achromobacter*

xylosoxidans foi produtor. Dos dois isolados do complexo *B.cepacia* 100% produziram e um isolado de *B. gladioli* e um de *S. maltophilia* foram produtores.

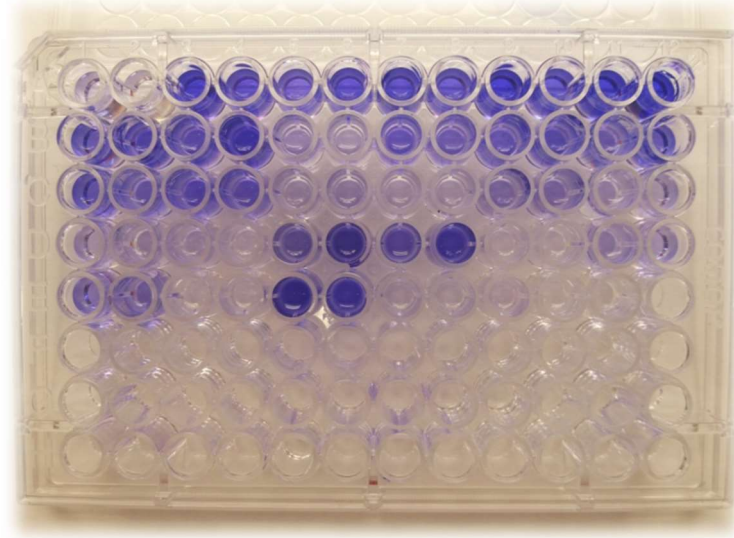


Figura 4 – Visualização da produção de biofilme de alguns isolados em placa de poliestireno

6.1.7 Perfil de virulência dos isolados de *P. aeruginosa*

De um total de 32 isolados de *P. aeruginosa*, a determinação genotípica de marcadores de virulência foi possível em 24 casos. Destes, 24 (100%) foram positivos para o gene do alginato D, 14 (58,33%) para a exoenzima S, 24 (100%) para a fosfolipase C hemolítica, 21 (87,5%) para a fosfolipase C não hemolítica, 24 (100%) para a exotoxina A, 24 (100%) para a protease alcalina, 24 (100%) para a elastase e 25 (100%) para ramnolipídeos.

6.1.8 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A análise do perfil clonal de *P. aeruginosa* (**Figura 5**) revelou um perfil policlonal. Embora tenha sido observada a formação de três clusters (A, B, e C), todos eles agruparam somente dois isolados. Entretanto, merece destaque o cluster B que revelou similaridade de 86,4% entre a amostra S-4506 isolada em 2009 e a amostra S-1257017 isolada em 2015. As características de virulência e perfil de sensibilidade

aos antimicrobianos das amostras agrupadas em clusters estão dispostas no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Caracterização da virulência e do perfil antimicrobiano dos isolados de *P. aeruginosa* agrupados em clusters.

Clusters	Similaridade	Amostras	Ano	Perfil Antimicrobiano*		Produção de Biofilme	Genes de Virulência**
				Sensível	Resistente		
A	93,30%	S-1063	2006	IM	AM, CZ, CP, e CF	Forte	<i>algD, exoS, plcH, plcN, toxA, aprA, lasB, e rhlAB</i>
		S-3920	2006		AM, CZ, CP, CF e IM	Forte	
B	86,40%	S-1257017	2015	AM, CZ, CP, CF e IM		Moderado	
		S-4506	2009	AM, CZ, CP, CF e IM		Forte	
C	82,90%	S-1518	2006	AM, CZ e CP	CF e IM	Moderado	
		S-6344	2006	CZ, CP e IM	CF e AM	Moderado	

*AM: amicacina, CZ: ceftazidima, CP: cefepime, CF: ciprofloxacina e IM: imipenem

** *algD*: alginato, *exoS*: exoenzima S, *plcH*: fosfolipase C hemolítica, *plcN*: fosfolipase C não hemolítica, *toxA*: exotoxina A, *aprA*: protease alcalina, *lasB*: elastase e *rhlAB*: ramnolipídeos

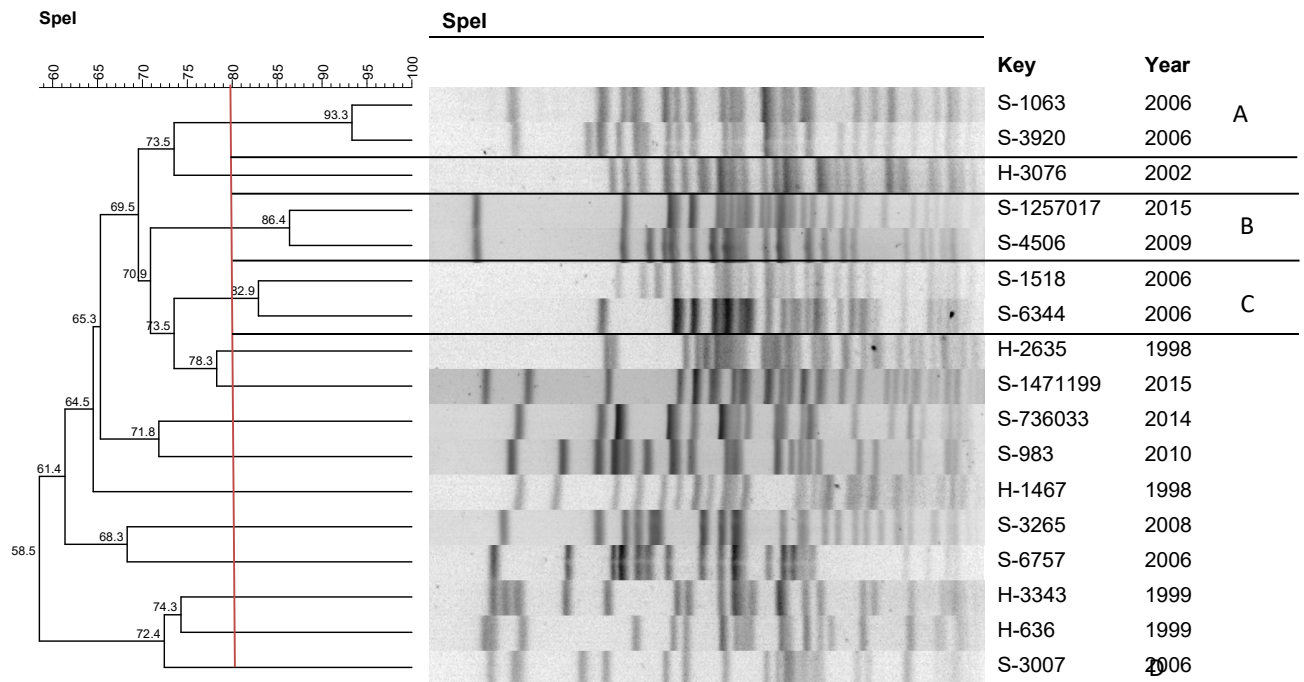


Figura 5 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, AppliedMaths) dos perfis PFGE – *Spel* de *P.aeruginosa* isoladas de peritonite em pacientes tratados por diálise peritoneal.

O PFGE revelou um clone importante de *A. baumannii* com o agrupamento de cinco amostras isoladas de 2000 a 2008 e com 82,1% de similaridade (Figura 6). A análise das características dessas amostras apresentadas na **Quadro 3** revela um perfil multirresistente desse clone.

Quadro 3 - Caracterização do perfil antimicrobiano e produção de biofilme dos isolados de *A. baumannii* agrupados em um cluster.

Clusters	Similaridade	Amostras	Ano	Perfil Antimicrobiano*		Produção de Biofilme
				Sensível	Resistente	
A	82,1%	S-1961	2000	IM	AM, CZ, CP, e CF	Fraco
		S-2008	2001	IM	AM, CZ, CP, e CF	Fraco
		S-1682	2002	IM	AM, CZ, CP, e CF	Não Produtor
		S-3108	2002	IM e CP	AM, CZ e CF	Fraco
		S-3040	2008	IM e CP	AM, CZ e CF	Não Produtor

*AM: amicacina, CZ: ceftazidima, CP: cefepime, CF: ciprofloxacina e IM: imipenem

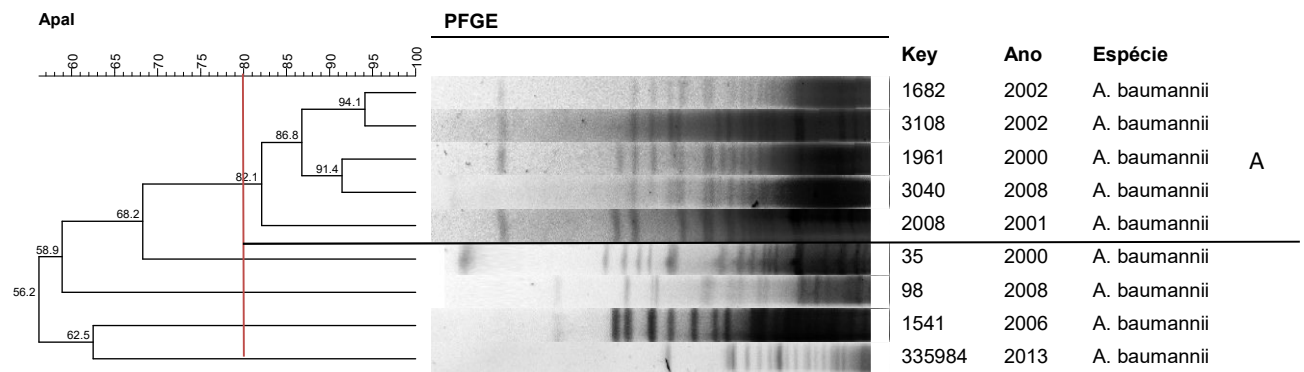


Figura 6 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, AppliedMaths) dos perfis PFGE – *Apal* do complexo *A. baumannii* isolados de peritonite em pacientes tratados por diálise peritoneal

A análise do PFGE dos únicos três isolados de *A. haemolyticus* revelou um perfil policlonal (**Figura 7**).



Figura 7 - Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, AppliedMaths) dos perfis PFGE – *Apal* de *A. haemolyticus* isolados de peritonite em pacientes tratados por diálise.

6.2 Dados clínicos e demográficos

6.2.1 Características dos pacientes estudados

As características clínicas e demográficas dos 63 pacientes, à época do seu 1º episódio de peritonite por BGNNF, acham-se expressas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Características de 63 pacientes em diálise peritoneal à época do 1º episódio de peritonite por BGNNF

Característica	Média/número (%)
Idade (anos)	46,5 ± 20,1
0 a 60	44 (69,8)
> 61	19 (30,2)
Sexo(Feminino)	28 (44,4)
Sexo(Masculino)	35 (55,6)
Cor da pele (Branca)	46 (73)
Diabéticos	17 (27)
Tempo de diálise	15,8 ± 20,7
Modalidade de diálise	
CAPD	33 (52,4)
DPA	30 (48,6)

6.2.2 Caracterização do tipo de episódio

Entre os 68 episódios avaliados 62 (91,2%) corresponderam a infecções novas, três (4,4%) a recorrências, dois (2,90%) a repetições e um (1,5%) à recidiva.

6.2.3 Apresentação clínica

A presença de líquido turvo foi o sinal predominante, presente em 64 casos (97%), seguido pela dor abdominal, relatada em 63 episódios (92,6%); náuseas, referidas em 32 casos (47%); vômitos, em 30 (44,1%); febre, em 24 (35,3%) casos, e hipotensão, verificada em 10 episódios (14,7%). Infecção do óstio de saída

concomitante à peritonite foi diagnosticada em 18 casos (26,5%). Episódios prévios de peritonite foram relatados em 27 casos (39,7%).

6.2.4 Tratamento antimicrobiano empírico

Todos os episódios classificados como nova infecção foram tratados, inicialmente, de acordo com os protocolos recomendados pela *International Society for Peritoneal Dialysis*, correspondentes à época de ocorrência da peritonite. Todos os pacientes iniciaram tratamento dentre das primeiras 24 horas após o aparecimento dos sinais e sintomas clínicos, com esquemas empíricos de administração intraperitoneal de antimicrobianos. Assim que o resultado da cultura fosse disponível, a terapia era reavaliada. Os seguintes protocolos terapêuticos foram utilizados: cefazolina + amicacina, em 22 casos (32,3%); cefazolina + ceftazidima, em nove casos (13,2%); vancomicina+amicacina, em 19 episódios (27,9%), e outros tratamentos em 18 casos (26,4%).

6.2.5 Evolução clínica das peritonites

Considerando-se a amostra total com 68 episódios, cura foi relatada em 24 casos (35,29%), recidiva em 6 (8,82%), refratariedade em 21 (30,88%), remoção do cateter peritoneal antes do 5º dia de tratamento em 14 (20,59%) e óbito em 3 (4,42%).

6.2.6 Fatores associados ao agente causal, ao paciente e ao tratamento, na evolução das peritonites.

6.2.6.1 Etiologia das peritonites e evolução clínica.

Entre os 68 episódios de peritonite por BGNNF, houve cura em 32,35% dos causados por bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., 39,13% entre aqueles pelo gênero *Acinetobacter* e 36,36% nas infecções por outros BGNNF. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre essas proporções.

6.2.6.2 Resistência bacteriana e evolução das peritonites.

Para esta análise os casos com sensibilidade intermediária, foram considerados como resistentes.

Nos episódios por BGNNF observou-se: 20,0% de cura para os episódios causados por germes resistentes à amicacina e 34,28% entre as sensíveis; 7,69% de cura entre as infecções por resistentes à ceftazidima e 35,9%, entre as sensíveis; 11,76% de cura entre as peritonites por agentes resistentes ao cefepime 37,14% entre os sensíveis e nenhum casos curado entre os episódios por germes resistentes ao imipenem e 35,71% entre os sensíveis. Todas estas diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Quanto ao antimicrobiano ciprofloxacina, as infecções por bactérias resistentes tiveram 15,78% de cura, contra 37,5% dos casos por sensíveis, não se observando significância estatística.

6.2.6.3 Produção de biofilme e evolução das peritonites

Para esta análise foram realizados dois tipos de comparação, quais sejam entre os episódios causados por produtores ou não de biofilme e entre o subgrupo formado por fortes e médios produtores e o subgrupo composto por não produtores e fraco produtores a produção de biofilme não influenciou a taxa de cura.

6.2.6.5 Marcadores de virulência de *P. aeruginosa* e evolução das peritonites

Esta análise restringiu-se exoenzima S, desde que os demais marcadores foram positivos em 100% dos episódios por *P. aeruginosa*. As peritonites causadas por isolados positivos para este marcador apresentaram 25% de cura, em 16 casos, contra uma cura nos nove episódios causados por isolados negativos, sem, no entanto, se atingir significância estatística entre estas proporções.

6.2.6.6 Fatores associados ao paciente, episódio de peritonite e tratamento na evolução das infecções

Os seguintes fatores foram analisados quanto à cura ou não das peritonites por BGN: faixa etária (até 60 anos ou mais que 60 anos; cor da pele, branca ou não branca; presença de diabetes mellitus; presença de IOS concomitante; ocorrência de episódio prévio de peritonites; método de DP (CAPD ou DPA); tipo de episódio (novo ou episódios de recidiva, recorrência e repetição) e protocolo de tratamento empírico da peritonite. A percentagem de resolução não diferiu significativamente na presença ou ausência de cada um desses fatores.

6.2.6.7 Análise multivariada: Fatores associados ao desfecho cura para episódios de peritonite por BGNNF

A **Tabela 3** expressa a análise de regressão logística binária univariada para as possíveis associações entre fatores do agente causal, paciente e tratamento e o desfecho cura, nas peritonites por BGNNF. As variáveis com valor de $p < 0,20$ nesta análise foram incluídas no modelo múltiplo de regressão logística.

Tabela 3 - Fatores associados ao desfecho cura em 68 episódios de peritonite por BGNNF em pacientes em diálise peritoneal. Análise univariada.

Variáveis	OR	IC (95%)	P
Etiologia= <i>Pseudomonas spp</i>	0,99	(0,37-2,67)	0,98
Cor da pele (branca vs não branca)	0,55	(0,30-1,74)	0,38
Tipo de episódio (novo vs outros#)	0,23	(0,20-2,72)	0,24
Idade (anos)	0,98	(0,95-1,04)	0,08
Sexo (masculino)	1,3	(0,47-3,6)	0,61
Método de diálise (CAPD vs APD)	0,41	(0,21-1,77)	0,98
Tempo de diálise até o episódio de peritonite (meses)	1,03	(0,96-1,10)	0,42
Diabetes mellitus	1,04	(0,35-3,10)	0,94
Infecção concomitante de óstio de saída	0,17	(0,03-0,80)	0,03
Episódio prévio de peritonite (sim)	1,87	(0,68-5,1)	0,22
Tratamento 2 (ref = protocolo 1##)	6,66	(0,61-62,7)	0,10
Tratamento 3 (ref = protocolo 1##)	3,12	(0,78-12,5)	0,11
Tratamento 4 (ref = protocolo 1##)	1,02	(0,30-4,43)	0,97
Sensibilidade à amicacina	2,8	(0,66-11,8)	0,16
Sensibilidade à ceftazidima	1,79	(0,58-5,54)	0,31
Sensibilidade ao cefepime	5,01	(0,59-44,7)	0,14
Sensibilidade à ciprofloxacina	7,89	(0,91-68,7)	0,06
Sensibilidade ao imipenem	1,73	(0,53-5,32)	0,34
Produção de biofilme (sim)	0,37	(0,09-1,52)	0,21
Produção de biofilme (médios + fortes produtores vs fracos ou não produtores)	0,91	0,27-3,12	0,88

Outros episódios: recidiva, recorrência e repetição.

Protocolo 1: Amicacina + cefazolina; Protocolo 2: Cefazolima + Ceftazidima; Protocolo 3: Amicacina + Vancomicina; Protocolo 4: outros tratamentos

À análise multivariada (**Tabela 4**) observou-se que os fatores IOS e sensibilidade in vitro à amicacina foram preditores independentes do desfecho cura, como está expresso na tabela 12, de modo que a presença concomitante de IOS reduziu e a sensibilidade à amicacina aumentou a chance de cura. Devido à colinearidade entre a sensibilidade aos diferentes antimicrobianos, este não puderam

ser incluídos no mesmo modelo de regressão. Substituindo-se a amicacina pelo antimicrobiano cefepime mantiveram-se associações independentes e estatisticamente significantes entre a sensibilidade ao mesmo maior chance de cura (OR=14,35, $p=0,040$ e presença de IOS com menor chance para desfecho cura (OR=.0,10, $p=0,02$). Incluindo-se a ciprofloxacina no modelo de regressão, em substituição ao cefepime, não se observou associação entre a sensibilidade à ciprofloxacina e chance de cura, mantendo-se a presença de IOS como preditor independente (OR=0,8, $p<0,01$). de menor chance para desfecho cura.

Tabela 4 - Fatores associados ao desfecho cura em 68 episódios de peritonite por BGNNF em pacientes em diálise peritoneal. Análise multivariada.

Variáveis	OR	IC (95%)	P
Idade (anos)	0,97	(0,96-1,07)	0,08
Infecção concomitante de óstio de saída	0,11	(0,18-0,75)	0,02
Tratamento 2 (ref = protocolo 1##)	3,7	(0,31-54,1)	0,3
Tratamento 3 (ref = protocolo 1##)	3,7	(0,61-31,4)	0,14
Tratamento 4 (ref = protocolo 1##)	0,93	(0,21-4,2)	0,93
Sensibilidade à amicacina	8,04	(1,12-58,2)	0,04

Outros episódios: recidiva, recorrência e repetição.

Protocolo 1: Amicacina + cefazolina; Protocolo 2: Cefazolima + Ceftazidima; Protocolo 3: Amicacina + Vancomicina; Protocolo 4: outros tratamentos

7. DISCUSSÃO

A peritonite em pacientes tratados DP tem diminuído nos últimos anos,^{16,76,77} mas continua sendo uma das principais causas de falha na técnica, contribuindo também para o aumento da morbidade e mortalidade.

O desfecho da peritonite relacionada à DP depende muito do microrganismo infectante. Os cocos Gram-positivos ainda são os organismos causais na maioria dos casos de peritonite, e o manejo dessas infecções já está mais consolidada em relação as infeções causadas por Gram-negativos, em particular os BGNNF.⁷⁸

Neste centro e no período estudado a taxa de peritonite por bacilo Gram-negativo foi de 26,72% do total de episódios, frequência semelhante foi encontrada por Prasad et al.,⁷⁹ desses episódios 9,64% foram ocasionados por BGNNF.

Os resultados do presente estudo confirmaram a predominância da espécie *P. aeruginosa* como agentes etiológicos das peritonites por BGNNF,⁶⁶ em pacientes tratados por DP. A peritonite de *Pseudomonas* é geralmente grave e frequentemente associada à infecção do cateter. Estudos retrospectivos mostraram que a peritonite por este microrganismo está associada a maiores frequências de hospitalização, elevadas taxas de remoção de cateter e transferência permanente de hemodiálise.⁸⁰⁻

81

Ainda que individualmente esta tenha sido a mais frequentemente isolada, outras espécies bacterianas foram encontradas, com identificação de agentes menos frequentemente descritos na etiologia das peritonites em DP,^{28,66,68} como do complexo *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. ursingi*, *A. lwoffii*, *A. denitrificans*, *A. xylosoxidans*, *B. gladioli*, *S. maltophilia* e germes do complexo *B. cepacia*.

Quando analisamos o total dos casos de peritonite por BGNNF, 30,88% foram atribuídos às espécies de *Acinetobacter*. Desses, 57,14% foram causadas por *A. baumannii*, a espécie mais comum. Outras pesquisas confirmam esses dados, sendo também que a resistência a inúmeros medicamentos neste microrganismo tornou-se um problema de saúde pública.^{82,83} Imipenem e meropenem têm sido tradicionalmente os antimicrobianos mais eficazes contra *A. baumannii*,⁸⁴ mas os relatos de cepas resistentes ao carbapenem estão se tornando comuns.

Estudos relacionados com peritonites em DP com as demais espécies encontradas são raros, devido ser etiologias incomuns, mas merece destaque as espécies do complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*, que quando presentes sabe-se que essas infecções são particularmente difíceis de tratar devido a resistência intrínseca a várias classes de antimicrobianos, muitas vezes requerem terapia prolongada com dois antibióticos combinados, podendo culminar em remoção do cateter e interrupção da técnica.^{85,86}

Quanto à resistência bacteriana, houve considerável proporção de BGNNF resistentes aos antimicrobianos testados, em particular à amicacina e à ciprofloxacina,

sendo que a sensibilidade aos betalactâmicos esteve acima de 70%. Entre os anos de 1998 e 2002, observou-se em nosso centro redução dramática da sensibilidade *in vitro* aos betalactâmicos ceftazidima e cefepime, sendo que nesse período a sensibilidade diminuiu aproximadamente de 80% para cerca de 40%.⁵³ Os resultados atuais sugerem que houve melhora do padrão de sensibilidade *in vitro* a esses betalactâmicos, possivelmente pelo menor uso dos mesmos a partir dos resultados mencionados. No entanto, é relevante a constatação de apenas cerca de 65% de sensibilidade *in vitro* à amicacina, sendo este o antimicrobiano mais utilizado para cobertura de germes Gram-negativos, no tratamento inicial empírico das peritonites,⁵⁴ neste conjunto de episódios e na rotina clínica de nosso centro. Na prática clínica, a presença de resistência aos aminoglicosídeos leva à perda de sinergismo com β -lactâmicos para tratamento de infecções, não produzindo efeito bactericida.

Um dos objetivos deste estudo foi a detecção de fatores de virulência nos BGNNF. Observou-se elevada proporção de isolados produtores de biofilme, um dos fatores que têm sido relacionados à não resposta ao tratamento antimicrobiano.⁴⁸ A indicação do antimicrobiano adequado é baseada na concentração inibitória mínima (MIC) do medicamento para células planctônicas. No entanto, a atividade dos antimicrobianos pode ser influenciada por vários fatores, como o modo de crescimento microbiano ou o ambiente de DP. Em geral, as células planctônicas são mais sensíveis aos agentes antimicrobianos do que suas contrapartes em um biofilme, tornam-se resistentes ou tolerantes aos antimicrobianos, fenômeno recentemente designado "tolerância" fenotípica. No entanto, não totalmente compreensível, a tolerância ao biofilme é multifatorial e para biofilmes bacterianos, sugeriu-se que esteja ligada à diminuição da penetração de alguns antimicrobianos, sistemas relacionados a regulação da expressão gênica em resposta à densidade celular crítica (*quorum sense*), troca mais rápida de material genético e a presença de células persistentes.

O estudo dos fatores de virulência da *P. aeruginosa* revelou a presença de fatores de patogenicidade em cerca de 100% dos isolados, como o alginato; associado à aderência bacteriana; exoenzima S, inibidora da síntese proteica; fosfolipase C hemolítica, associada à destruição de membranas celulares e função osmoprotetora; exotoxina A, associada à destruição tecidual e inibição da resposta macrofágica; protease alcalina, associada à lesão tecidual e inativação da IgG; elastase, fator de degradação de imunoglobulinas e fatores do complemento e

ramnolipídeos, agente surfactante e associado à aderência bacteriana.⁷³ Ao compararmos esses resultados com outros estudos, encontramos o mesmo perfil em amostras oriundas de pacientes com fibrose cística,⁷³ diferindo de amostras provenientes de infecções urinárias, água e solo,^{88,89} que apresentam frequência menor dos genes de virulência estudados. Esses achados mostram que os genes de virulência, embora presentes na maioria das cepas,⁹⁰ diferem de acordo com a origem do isolado.

Assim, podemos assumir que os isolados de BGNNF que compuseram a amostra do presente estudo, mostraram em geral perfil potencialmente patogênico, o que poderia ter se associado a um curso clínico desfavorável.

A evolução dos episódios mostrou reduzida taxa de cura. Este achado confirma relatos prévios de baixa percentagem de resolução entre os BGNNF, em comparação aos cocos Gram positivos.²⁸ Esses resultados podem ser atribuídos à resistência bacteriana ou a fatores de patogenicidade dos agentes, além de fatores ligados ao paciente.

A identificação de fatores associados ao desfecho do episódio de peritonite foi objetivo central deste estudo. Os fatores sensibilidade à amicacina e também ao cefepime, se associaram de modo independente à maior chance de cura, enquanto a presença concomitante de IOS foi preditor independente de não resolução do episódio. Estes achados reforçam a influência da resistência bacteriana na evolução das peritonites em DP por BGNNF, como também apontam a presença de IOS, como indutor de não resposta à infecção, o que poderia ser devido à manutenção de uma fonte de infecção pela via periluminal.⁵⁴ Este resultado, no entanto, deve ser analisado com cuidado, desde que a presença concomitante de IOS e de peritonite é uma das indicações para remoção do cateter peritoneal, evolução, neste estudo, que compôs o desfecho não cura.⁵⁴

A análise da influência dos fatores de patogenicidade para a espécie *P. aeruginosa* foi prejudicada pela presença desses fatores em 100% dos isolados, exceção feita a exoenzima S, a qual não apresentou associação com o desfecho cura.

A análise individual dos demais fatores de patogenicidade não mostrou associação de qualquer um desses fatores com o desfecho, o que, no entanto não

afasta a possibilidade de que sua ação patogênica em conjunto possa influenciar a evolução das infecções peritoneais.

Os resultados da tipagem por PFGE revelaram um perfil policlonal para a maioria dos isolados, revelando serem amostras de origens diferentes, provavelmente da microbiota do próprio paciente. Entretanto, para a espécie *A. baumannii* a análise revelou um clone maior com cinco amostras, isoladas com intervalo de 8 anos (2000-2008) com perfil de multirresistência aos antimicrobianos. *A. baumannii* são responsáveis por infecções adquiridas em ambiente hospitalar;⁹¹ a presença desse clone em intervalo tão longo pode sugerir que as peritonites por esse agente tenham fonte hospitalar.

8. CONCLUSÃO

Os episódios de peritonite por BGNNF em DP são infecções graves com reduzida taxa de cura. A resistência bacteriana, em particular à amicacina, é fator associado à menor chance de resolução das peritonites. Alguns aspectos de relevância clínica devem ser considerados. A sensibilidade a esse agente, neste estudo, ficou em torno de 65%; esse antimicrobiano e outros aminoglicosídeos são recomendados pelas diretrizes internacionais para cobertura de BGN, no tratamento inicial das peritonites em DP.⁵⁴ Protocolos à base de amicacina foram os mais frequentes nesta casuística para tratamento inicial das peritonites em DP. Peritonite por bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. podem representar infecção grave, potencialmente de origem hospitalar, por germe multirresistente, fatos que justificam a necessidade de cuidados redobrados quanto ao seu manejo clínico.

REFERÊNCIAS

- 1 Vos T, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.
2. Mills KT, Xu Y, Zhang W, Bundy JD, Chen CS, Kelly TN, Chen J, He J. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int.* 2015 Nov;88(5):950-7.
3. Hamer RA, El Nahas AM. The burden of chronic kidney disease. *BMJ* 2006; 332(7541): 563-4.
4. Chen CK, Tsai YC, Hsu HJ, Wu IW, Sun CY, Chou CC, et al. Depression and suicide risk in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Psychosomatics* 2010; 51(6): 528-528.e6.
5. Johansen KL, Chertow GM, Kutner NG, Dalrymple LS, Grimes BA, Kaysen GA. Low level of self-reported physical activity in ambulatory patients new to dialysis. *Kidney Int.* 2010; 78(11): 1164-70.
6. Eggers PW. Has the incidence of end-stage renal disease in the USA and other countries stabilized? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20(3): 241-5.
7. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao MH, Lv J, Garg AX, Knight J, Rodgers A, Gallagher M, Kotwal S, Cass A, Perkovic V. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet.* 2015 May 16;385(9981):1975-82.
8. PORTAL DA CÂMARA DOS DEPUTADOS. Diálise peritoneal no brasil : cenário atual e desafios. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/arquivos-de-eventos/audiencia-publica-27-04.17/milena-daher-sbn>>. Acesso em: 08 set. 2017
9. Popovich RP, Moncrief JW, Decherd JF, Bomar JJB, Pyle WK. The definition of a novel portable-wearable equilibrium peritoneal technique. *Abst Am Soc Artif Intern Organs.* 1976; 5:64.
10. Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, Ghods AJ, Twardowski ZJ, Pyle WK. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med.* 1978; 88: 449-456.
11. Diaz-Buxo JA, Farmer CD, Walker PJ, Chandler JT, Holt KL. Continuous cyclic peritoneal dialysis: a preliminary report. *Artif Organs.* 1981;5:157-61.
12. Diaz-Buxo JA. What is the role of automated peritoneal dialysis and continuous flow peritoneal dialysis? *Contrib Nephrol.* 2003;:264-71.

13. Vonesh EF, Snyder JJ, Foley RN, Collins AJ. Mortality studies comparing peritoneal dialysis and hemodialysis: what do they tell us? *Kidney Int Suppl.* 2006;103:S3-11.
14. Mehrotra R, Chiu YW, Kalantar-Zadeh K, Bargman J, Vonesh E. Similar outcomes with hemodialysis and peritoneal dialysis in patients with end-stage renal disease. *Arch Intern Med.* 2011;171:110-118.
15. Davenport A. Peritonitis remains the major clinical complication of peritoneal dialysis: the London, UK, peritonitis audit 2002-2003. *Perit Dial Int* 2009; 29:297-302.
16. Barretti P, Bastos KA, Dominguez J, Caramori JC. Peritonitis in Latin América. *Perit Dial Int.* 2007; 27:332-9.
17. de Moraes TP, Figueiredo AE, de Campos LG, Olandoski M, Barretti P, Pecoits-Filho R; BRAZPD Investigators. Characterization of the BRAZPD II cohort and description of trends in peritoneal dialysis outcome across time periods. *Perit Dial Int.* 2014 Nov-Dec; 34(7):714-23.
18. Ghali JR, Bannister KM, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, Johnson DW, McDonald SP. Microbiology and outcomes of peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2011; 31:651–62.
19. Boudville N, Kemp A, Clayton P, Lim W, Badve SV, Hawley CM, et al. Recent peritonitis associates with mortality among patients treated with peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23:1398–405.
20. Pecoits-Filho R, Yabumoto FM, Campos LG, Moraes TP, Figueiredo AE, Olandoski M, Shimakura SE, Barretti P. Peritonitis as a risk factor for long-term cardiovascular mortality in peritoneal dialysis patients: the case of a friendly fire? *Nephrology (Carlton)*. 2016. doi: 10.1111/nep.12986.
21. Martin LC, Caramori JC, Fernandes N, Divino-Filho JC, Pecoits-Filho R, Barretti P. Geographic and educational factors and risk of the first peritonitis episode in Brazilian Peritoneal Dialysis study (BRAZPD) patients. *Clin J Am Soc Nephrol*; 6:1944-51.
22. Prasad N, Gupta A, Sharma RK et al. The spectrum of bacterial peritonitis in CAPD patients in a developing country: is it different? *Perit Dial Int* 2003; 23: 400–402.
23. Piraino B, Bernardini J, Florio T, Fried L. Staphylococcus aureus prophylaxis and trends in gram-negative infections in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2003; 23: 456–459.
24. Ozisik L, Ozdemir FN, Tanriover MD. The changing trends of peritoneal dialysis related peritonitis and novel risk factors. *Ren Fail* 2015; 37:1027–32.
25. Li PH, Cheng VC, Yip T, Yap DY, Lui SL, Lo WK. Epidemiology and clinical characteristics of Acinetobacter peritoneal dialysis-related peritonitis in Hong Kong—with a perspective on multi-drug and carbapenem resistance. *Perit Dial Int.* 2017; 37(2):177-182.

26. Chao CT, Lee SY, Yang WS, Chen HW, Fang CC, Yen CJ, et al. *Acinetobacter* peritoneal dialysis peritonitis: a changing landscape over time. *PLOS ONE* 2014; 9:e110315.
27. Kim DK, Yoo TH, Ryu DR, Xu ZG, Kim HJ, Choi KH, et al. Changes in causative organisms and their antimicrobial susceptibilities in CAPD peritonitis: a single center's experience over one decade. *Perit Dial Int* 2004; 24:424–32.
28. Bunke CM, Briel MR, Golper TA. Outcomes of single organism peritonitis in peritoneal dialysis: gram negatives versus gram positives in the Network 9 Peritonitis Study. *Kidney Int* 1997; 52:524–9.
29. Troidle L, Gorban-Brennan N, Kliger A, Finkelstein F. Differing outcomes of gram-positive and gram-negative peritonitis. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:623–8.
30. Prasad KN, Singh K, Rizwan A, Mishra P, Tiwari D, Prasad N, Gupta A. Microbiology and outcomes of peritonitis in northern India. *Perit Dial Int.* 2014 Mar-Apr;34(2):188-94. doi: 10.3747/pdi.2012.00233.
31. Szeto CC, Chow KM, Leung CB, Wong TY, Wu AK, Wang AY. Clinical course of peritonitis due to *Pseudomonas* species complicating peritoneal dialysis: a review of 104 cases. *Kidney Int* 2001; 59:2309–15.
32. GENUS *pseudomonas.*, Lpsn, 2018. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>>. Acesso em: 23 apr. 2018.
33. Domingo-Calap P., Georgel P., Bahram S.: Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *HLA*, 2016; 87: 133-140.
34. Fu W., Forster T., Mayer O., Curtin J.J., Lehman S.M., Donlan R.M.: Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010; 54: 397-404.
35. Tetz G.V., Artemenko N.K., Tetz V.V.: Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009; 53: 1204-1209.
36. Jyot J., Balloy V., Jouvion G., Verma A., Touqui L., Huerre M., Chignard M., Ramphal R.: Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *J. Infect. Dis.*, 2011; 203: 1369-1377.
37. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L., Kumar V.A., Mohan C.G., Biswas R.: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2016; 306: 48-58.
38. Harper D., Parracho H.M., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S.: Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 2014; 3: 270-284.
39. Livermore D.M.: Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 34: 634-640.
40. Simpson J.A., Smith S.E., Dean R.T.: Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *J. Gen. Microbiol.*, 1988; 134: 29-36.

41. Wei Q., Ma L.Z.: Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 20983-21005.
42. Sharma G., Rao S., Bansal A., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*, 2014; 42: 1-7.
43. Lye WC, Lee EJ, Leong SO, Kumarasinghe G. Clinical characteristics and outcome of *Acinetobacter* infections in CAPD patients. *Perit Dial Int* 1994;14:174–7.
44. GENUS *acinetobacter.*, Lpsn, 2018. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>>. Acesso em: 23 apr. 2018.
45. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection—an emerging threat to human health. *IUBMB Life* 2011; 63:1048–54.
46. Friedman O, Jassal SV, Bargman JM. *Acinetobacter* peritoneal dialysis peritonitis: description and relation to the spice family of organisms. *Perit Dial Int* 2008; 28:195–7.
47. Chao CT, Lee SY, Yang WS, Chen HW, Fang CC, Yen CJ, et al. *Acinetobacter* peritoneal dialysis peritonitis: a changing landscape over time. *PLOS ONE* 2014; 9:e11031.
48. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lapin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711–45.
49. Drenkard E. (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5:1213–19.
50. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1915-22.
51. Sepandj F, Ceru H, Gibb A, Read R, Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit Dial Int* 2004; 24:65–7.
52. Oliveira LG, Luengo J, Caramori JC, Montelli AC, Cunha M de L, Barretti P. Peritonitis in recent years: clinical findings and predictors of treatment response of 170 episodes at a single Brazilian center. *Int Urol Nephrol.* 2012; 44:1529-37.
53. Barretti P, Pereira D, Brasil MA, de Lourdes Cunha M, Caramori J, Montelli A. Evolution of gram-negative bacilli susceptibility in peritoneal dialysis-related peritonitis in Brazil: a single center's experience over nine years. *Perit Dial Int* 2009; 29:230–3.
54. Li PK, Szeto CC, Piraino B, Bernardini J, Figueiredo AE, Gupta A, Johnson DW, Kuijper EJ, Lye WC, Salzer W, Schaefer F, Struijk DG; International Society for Peritoneal Dialysis. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. *Perit Dial Int.* 2010; 30:393-423.
55. Poulidakos P1, Falagas ME. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 Aug;14(12):1585-97.

56. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S120-6.
57. Andrade, L. N. et al. Determinants of β -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. *Can J Microbiol*,2010: 56:399-407.
58. Climaco, E. C. et al. CTX-M-producing *Klebsiella* spp.in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010; 68:186-9.
59. McGowan JE Jr - Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control*. 2006;34:S29-S37.
60. Marra, A. R. et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis*, 2006; 6:24.
61. Zavascki, A.P., Barth, A.L., Gonçalves, A.L.S., Moro, A.L.D., Fernandes, J.F., Martins, A.F., Goldani, L.Z., 2006. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2), 387–392
62. Sloos JH, DijkshoornL, Vogel L, van Boven CPA: Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 2488-93.
63. Cookson, B. D., P. Aparicio, A. Deplano, M. Struelens, R. Goering, and R. Marples. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant. *J Med Microbiol*. 1996 Mar; 44(3):179-84.
64. Krishnan M, Thodis E, Ikonopoulou D, Vidgen E, Chu M, Bargman JM, et al. Predictors of outcome following bacterial peritonitis in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*2002; 22:573-81.
65. de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M, Montelli AC, Fioravante AM, Neves Batalha JE, Teixeira Caramori JC, Barretti P. Predictive factors of outcome following staphylococcal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *ClinNephrol*. 2005; 64:378-82.
66. Moraes TP, Olandoski M, Caramori JCT, Martin LC, Divino-Filho JC, Fernandes N, Pecoits-Filho R, Barretti P. Novel predictors of peritonitis-related outcomes in the BRAZPD cohort. *Perit Dial Int* 2014, Mar-Apr; 34(2): 179–187.
67. Siva B, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, Bannister KM, Johnson DW. *Pseudomonas* peritonitis in Australia: predictors, treatment, and outcomes in 191 cases. *Clin J Am SocNephrol*. 2009; 4:957-64.
68. Szeto CC, Chow VY, Chow KM, Lai RM, Chung KY, Leung CB, et al. Enterobacteriaceae peritonitis complicating peritoneal dialysis: a review of 210 consecutive cases. *Kidney Int* 2006; 69:1245–52.

69. Jarvis EM, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, Bannister KM, Johnson DW. Predictors, treatment, and outcomes of non-Pseudomonas Gram-negative peritonitis. *Kidney Int.* 2010; 78:408-14.
70. Bouvet, P. J., and P. A. Grimont. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1987; 138:569–578.
71. Henry, D. A.; Speert, D. P. *Pseudomonas* In: Versalovic, J. et al W. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. American Society for Microbiology: Washington, 2011. 1:677.
72. Dubois, D., Grare, M., Prere, M.F., Segonds, C., Marty, N., Oswald, E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2012 Aug; 50(8):2568-76.
73. Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A., Quentin, R. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol* 2004; 53:73-81.
74. Gautom, R.K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov; 35(11):2977-80.
75. Avelino F, Saldaña Z, Islam S, Monteiro-Neto V, Dall'Agnol M, Eslava CA, Girón JÁ . The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the E. coli common pilus when adhering to cultured epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:440-448.
76. Krishnan M, Thodis E, Ikonopoulou D, Vidgen E, Chu M, Bargman JM, et al. Predictor of outcome following bacterial peritonitis in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2002; 22:573–81.
77. Stinghen AE, Barretti P, Pecoits-Filho R. Factors contributing to the differences in peritonitis rates between centers and regions. *Perit Dial Int* 2007; 27(2):281–5.
78. Oliveira LG, Luengo J, Caramori JC, Montelli AC, Cunha Mde L, Barretti P. Peritonitis in recent years: clinical findings and predictors of treatment response of 170 episodes at a single Brazilian center. *Int Urol Nephrol* 2012; 44:1529–37
79. Prasad KN1, Singh K, Rizwan A, Mishra P, Tiwari D, Prasad N, Gupta A. Microbiology and outcomes of peritonitis in northern India. *Perit Dial Int.* 2014 Mar-Apr;34(2):188-94.
80. Bernardini J, Piraino B, Sorkin M. Analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis-related *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Am J Med* 1987; 83:829–32. 376.
81. Siva B, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. *Pseudomonas* peritonitis in Australia: predictors, treatment, and outcomes in 191 cases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:957–64

82. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:939–51
83. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ* 2011; 26:101–12
84. Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:265–71.
85. Apostolovic BL, Velickovic-Radovanovic RM, Andjelkovic-Apostolovic MR, Cvetkovic TP, Dinic MM, Radivojevic JD. Repeated *Burkholderia cepacia* Peritonitis in a Patient Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *West Indian Med J*. 2015 Jun;64(3):288-90.
86. Avgeri SG, Matthaiou DK, Dimopoulos G, Grammatikos AP, Falagas ME. Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:394–404.
87. Martins M1, Rodrigues A, Pedrosa JM, Carvalho MJ, Cabrita A, Oliveira R. Update on the challenging role of biofilms in peritoneal dialysis. *Biofouling*. 2013 Sep;29(8):1015-27.
88. Martins VV, Pitondo-Silva A, Man ç o Lde M, Falcão JP, Freitas Sdos S, da Silveira WD, Stehling EG. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. 2014 Feb;122(2):92-100.
89. Badamchi A, Masoumi H, Javadinia S, Asgarian R, Tabatabaee A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. *Microb Pathog*. 2017 Jun;107:44-47.
90. Juan C, Peña C, Oliver A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Infect Dis*. 2017 Feb 15;215(suppl_1):S44-S51.
91. Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V. Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. *J Pathog*. 2016; 2016:7318075.