

ARTIGO ORIGINAL

Susceptibilidade de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos e a clorexidina

Review of Epidemiological and Clinical Characteristics and Overall Survival

Helder Ferreira¹, Lourdes Botelho Garcia², Floristher Elaine Carrara-Marrone³, Maria Cristina Bronharo Tognim², Celso Luis Cardoso²

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PR, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.

³Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

Recebido em: 14/08/2014

Aceito em: 15/12/2014

heelfer@gmail.com

RESUMO

Justificativa e Objetivos: *Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno hospitalar oportunista que apresenta diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos constituindo um problema de grande importância em saúde pública. O objetivo deste estudo foi investigar a existência de uma possível associação entre a resistência a antibióticos e a susceptibilidade a clorexidina de 65 amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de pacientes internados em um hospital brasileiro. **Métodos:** As amostras foram identificadas pelo sistema automatizado de identificação de microrganismos MicroScan e o perfil de sensibilidade aos antibióticos foi realizado pela técnica de disco-difusão. A concentração inibitória mínima (CIM) da clorexidina foi avaliada pelo método de diluição em caldo e a atividade bactericida, nas concentrações de 0,2% e de 2%, foi avaliada pelo teste de suspensão, de acordo com a Norma Européia 1040. **Resultados:** Todas as amostras testadas apresentaram sensibilidade a polimixina, seguida da piperacilina/tazobactam (75,4%). A CIM da clorexidina variou de 2,5 a 40 µg/ml, com CIM50 e CIM90 de 10 e 20 µg/ml. No teste de suspensão, a clorexidina na concentração de 0,2% eliminou 24,2% (15/65) das amostras. Uma amostra apresentou susceptibilidade reduzida a clorexidina, isto é, no teste de suspensão, a redução de bactérias viáveis do inóculo foi inferior a 5 Log10. Outras três amostras sofreram uma redução logarítmica muito próxima de 5. **Conclusão:** Os resultados dos testes *in vitro* com a clorexidina foram homogêneos, parecendo não indicar uma associação deste biocida com a múltipla resistência aos antibióticos das amostras de *P. aeruginosa* testadas. Destaca-se o achado de uma amostra de *P. aeruginosa* com reduzida susceptibilidade a clorexidina na diluição de uso de 0,2%.

DESCRIPTORES

Pseudomonas aeruginosa.
Clorexidina
Resistência

ABSTRACT

Background and Objectives: Aimed to investigate whether there is a possible association between antibiotic resistance and susceptibility to chlorhexidine of 65 clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in a Brazilian hospital. **Methods:** The samples were identified by the MicroScan system and the sensitivity to antibiotics was performed by the disk diffusion technique. The minimum inhibitory concentration (MIC) of chlorhexidine was evaluated by broth dilution method and bactericidal activity at concentrations of 0.2% and 2%, was evaluated by the test suspension, according to the European Standard 1040. **Results:** All strains tested showed sensitivity to polymyxin, followed by piperacillin / tazobactam (75.4%), ceftazidime and cefepime (41.5%), tobramycin (36.9%), aztreonam and amikacin (33.8%), levofloxacin (30.8%), ciprofloxacin (29.2%), ofloxacin (27.3%), gentamicin (26.2%) and ceftriaxone (7.7%). The MIC of chlorhexidine ranged from 2.5 to 40 micrograms / ml, with MIC50 and MIC90 of 10 and 20 mg / ml. In a suspension test, the concentration of chlorhexidine in 2% destroy any bacterial cell inoculum of 65 samples. At the concentration of 0.2% chlorhexidine removed 24.2% (15/65) of samples. A sample showed reduced susceptibility chlorhexidine, ie, in the test suspension, the reduction of viable bacteria in the inoculum was less than 5 log10. Three other samples were very close to a logarithmic reduction of 5. **Conclusion:** In our study, the results of *in vitro* tests with chlorhexidine were homogeneous, seeming to indicate an association of biocide with multiple antibiotic resistance of *P. aeruginosa* samples tested. Noteworthy is the finding of a sample of *P. aeruginosa* with reduced susceptibility to chlorhexidine use in dilution of 0.2%.

KEYWORDS

Pseudomonas aeruginosa
Chlorhexidine
Resistance

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não-fermentador que raramente causa infecções em indivíduos saudáveis. Entretanto, é um importante patógeno hospitalar oportunista, sendo responsável por infecções, particularmente em pacientes gravemente enfermos ou imunocomprometidos. Esta espécie bacteriana apresenta diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos e, a emergência de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistente constitui atualmente um problema de grande importância em saúde pública.

Estudos epidemiológicos nacionais realizados pelo *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), direcionados a pacientes hospitalizados, avaliaram 3.728 isolados, entre bactérias Gram-positivas e negativas, obtidos de 12 centros hospitalares de quatro estados, e *P. aeruginosa* foi responsável por 13,3% dos casos e o terceiro patógeno mais frequente, com 30,2% de resistência ao imipenem (IPM). O *Meropenem Yearly Susceptibility Information Collection* (MYSTIC), específico para estudos epidemiológicos em UTI's, avaliou 1.550 amostras de bactérias Gram-negativas, provenientes de 20 centros hospitalares, e *P. aeruginosa* estava envolvida em 30,3% das infecções de corrente sanguínea, trato respiratório e urinário, pele, tecidos moles, e com 36,6% de resistência ao IPM. Outros estudos, realizados no Sul e Centro-Oeste do país, relataram percentuais de resistência de 58,9% até 82,7%, respectivamente.¹⁻⁵

Além dos antibióticos, os biocidas, incluindo anti-sépticos e desinfetantes, são amplamente utilizados em hospitais, clínicas odontológicas e outros setores de saúde como parte de programas de controle de infecção. Entre esses produtos a clorexidina, devido seu amplo espectro de ação, atividade antimicrobiana, substantividade e propriedade hipoalergênica é provavelmente o biocida mais utilizado na formulação de anti-sépticos, principalmente naqueles destinados a higienização das mãos e anti-sepsia da cavidade oral. Também é empregada, em menor escala, como desinfetante e conservante.^{6,7}

Os mecanismos gerais de resistência bacteriana aos antibióticos, como por exemplo, efluxo, impermeabilidade, modificação de sítios alvos, inativação ou modificação da droga, são também aplicáveis aos biocidas, existindo, portanto a possibilidade de haver resistência cruzada entre antibióticos e biocidas.⁸

O presente estudo teve como objetivo investigar a susceptibilidade de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos e a clorexidina.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal no período de março de 2005 a março de 2007 onde foram incluídas, através de uma amostra de conveniência, 65 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo 30 (46,1%) sensíveis e 35 (53,9%) resistentes aos antibióticos carbapenêmicos imipenem e meropenem, isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, PR). Esta cepas fazem parte do acervo de microrganismos

do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Londrina. Cada amostra foi originária de um paciente que esteve internado em setores diversos do hospital, no período de 2003 a 2005. Destas amostras, 32 (49%) foram isoladas de urina, 17 (26%) de secreção traqueal e 16 (25%) de secreções diversas. A identificação de *P. aeruginosa* foi realizada utilizando o sistema automatizado MicroScan-4 (Dade-Behring Inc, Sacramento, CA, USA), e mantidas em estoque em ágar tripticaseína soja (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) a temperatura ambiente e também em caldo Müeller-Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), adicionado de 30% de glicerol (Merck, Darmstadt, Germany) conservado em "freezer" a -20°C.

Teste de sensibilidade aos antibióticos

O teste de sensibilidade das amostras de *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão. Brevemente, três a cinco colônias de uma cultura bacteriana de 24 horas foram transferidas para um tubo contendo 4 mL de caldo Müeller Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). A densidade do inóculo foi ajustada a uma turvação equivalente a do tubo 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL). A seguir, a suspensão bacteriana foi semeada com auxílio de *swab* na superfície de uma placa de ágar Müeller Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), onde foram aplicados discos de papel de filtro impregnados com os seguintes agentes antimicrobianos: cefepima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), ofloxacina (5 µg), tobramicina (10 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg) (Cefar Diagnóstica Ltda., São Paulo -SP, Brasil); amicacina (30 µg), aztreonam (3 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil); meropenem (10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e Polimixina B (300 u) (DME, Araçatuba, SP, Brasil). Após incubação por um período de 18 a 24 horas na estufa a 37°C a leitura das placas foi realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição de crescimento ao redor de cada disco em milímetros. Os resultados foram interpretados de acordo com dados do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com exceção da polimixina, cujos resultados foram interpretados com conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A amostra padrão de *P. aeruginosa American Type Culture Collection* (ATCC) 15442 foi utilizada, em paralelo, como controle.⁹⁻¹¹

Determinação da concentração inibitória mínima da clorexidina

A concentração inibitória mínima (CIM) da clorexidina para as amostras de *P. aeruginosa* foi determinada pelo método da macrodiluição em caldo. Brevemente, diluições seriadas da clorexidina (0,625 mg/ml a 640 mg/ml) preparadas em caldo Müeller-Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) a partir de uma solução de digluconato de clorexidina a 20%, foram inoculadas com aproximadamente 10^5 UFC/mL da amostra bacteriana a ser testada. A leitura foi realizada após 24 horas de incubação na estufa a 37 °C, considerando-se a CIM como a menor concentração da clorexidina capaz de inibir o crescimento bacteriano. Em paralelo, a amostra *P.*

aeruginosa ATCC 15442 foi utilizada como controle.⁹

Avaliação da atividade bactericida da clorexidina

A atividade bactericida da clorexidina para as amostras de *P. aeruginosa* foi avaliada pelo teste de suspensão quantitativo, nas concentrações de 0,2% e de 2%, conforme descrito na Norma Européia 1040 (EN 1040). Brevemente, 1 mL da solução de clorexidina foi misturada com 1 mL da suspensão bacteriana contendo $1,5$ a $5,0 \times 10^8$ UFC/ mL da amostra em teste. Após 5 minutos de contato, a temperatura de 20 °C, adicionou-se a mistura 8 mL de solução salina triptonada (cloreto de sódio 0,85% com 0,1% de tripton) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), adicionado dos seguintes neutralizantes: lecitina 0,3% (Viafarma Importadora Ltda, São Paulo, SP, Brasil), tween 80® 3% (Inlab, São Paulo, SP, Brasil), tiosulfato de sódio 0,5% (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), L-histidina 0,1% (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e saponina 3% (Inlab). Após 30 minutos de contato, foi realizada a contagem das bactérias sobreviventes pela técnica de "pour-plate" em ágar tripticaseína soja (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). A atividade bactericida da clorexidina foi considerada adequada quando a redução de bactérias viáveis do inóculo inicial foi igual ou superior a 5 Log₁₀.¹²

RESULTADOS

A sensibilidade geral aos agentes antimicrobianos encontrada entre as 65 amostras de *P. aeruginosa* tes-

tadas foi de Polimixina (100%), piperacilina/tazobactam (75,4%), ceftazidima e cefepima (41,5%), tobramicina (36,9%), aztreonam e amicacina (33,8%), levofloxacina (30,8%), ciprofloxacina (29,2%), ofloxacina (27,3%), gentamicina (26,2%) e ceftriaxona (7,7%).

Conforme mostrado na tabela 1, as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem/meropenem apresentaram 80 a 100% de resistência aos antimicrobianos testados, com exceção da polimixina B e da associação piperacilina/tazobactam, onde 100% e 68,6% das amostras foram sensíveis. Nas amostras de *P. aeruginosa* sensíveis a imipenem/meropenem 86,7% delas foram resistentes a ceftriaxona. Com exceção da Polimixina B, a resistência para os antimicrobianos restantes variou de 16,7 a 56,2%.

A CIM da clorexidina para as amostras de *P. aeruginosa* testadas variou de 2,5 mg/ml a 40 mg/ml. As amostras resistentes e sensíveis a imipenem/meropenem apresentaram uma CIM₅₀ de 10mg/ml e uma CIM₉₀ de 20mg/ml (Figura 1).

No teste de suspensão (EN 1040), a clorexidina na concentração de 2% eliminou todas as células de *P. aeruginosa* após 5 minutos de contato. A atividade bactericida da clorexidina a 0,2% foi adequada para 98,46% (64/65) das amostras testadas (Figura 2). Um isolado de 2004 apresentou uma sensibilidade diminuída a clorexidina a 0,2% e outras três apresentaram fatores de redução logarítmica muito próximos de 5,0.

Tabela 1. Comportamento das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* frente aos antimicrobianos, testadas pela técnica de disco-difusão, agrupadas de acordo com a sensibilidade (n=30) ou a resistência (n=35) ao imipenem e ao meropenem.

Agentes Antimicrobianos	Amostras resistentes a imipenem/meropenem		Amostras sensíveis a imipenem/meropenem	
	Sensibilidade n/total (%)	Resistência n/total (%)	Sensibilidade n/total (%)	Resistência n/total (%)
Beta-Lactâmicos:				
Aztreonam	7/35 (20,0)	28/35 (80,0)	15/30 (50,0)	15/30 (50,0)
Ceftazidima	7/35 (20,0)	28/35 (80,0)	20/30 (66,7)	10/30 (33,3)
Ceftriaxona	1/35 (2,9)	34/35 (97,1)	4/30 (13,3)	26/30 (86,7)
Cefepima	7/35 (20,0)	28/35 (80,0)	20/30 (66,7)	10/30 (33,3)
Piperacilina/Tazobactam	24/35 (68,6)	11/35 (34,4)	25/30 (83,3)	5/30 (16,7)
Aminoglicosídeos:				
Amicacina	3/35 (8,6)	32/35 (91,4)	19/30 (63,3)	11/30 (36,7)
Gentamicina	1/35 (2,9)	34/35 (97,1)	16/30 (53,3)	14/30 (46,7)
Tobramicina	7/35 (20,0)	28/35 (80,0)	17/30 (56,7)	13/30 (43,3)
Quinolônicos:				
Ciprofloxacina	2/35 (5,7)	33/35 (94,3)	17/30 (56,7)	13/30 (43,3)
Levofloxacina	5/35 (14,3)	30/35 (85,7)	15/30 (50,0)	15/30 (50,0)
Ofloxacina	2/17(11,8)	15/17 (88,2)	7/15 (46,7)	8/15 (53,3)
Polimixinas:				
Polimixina B	35/35 (100)	0/35 (0)	30/30 (100)	0/30 (0)

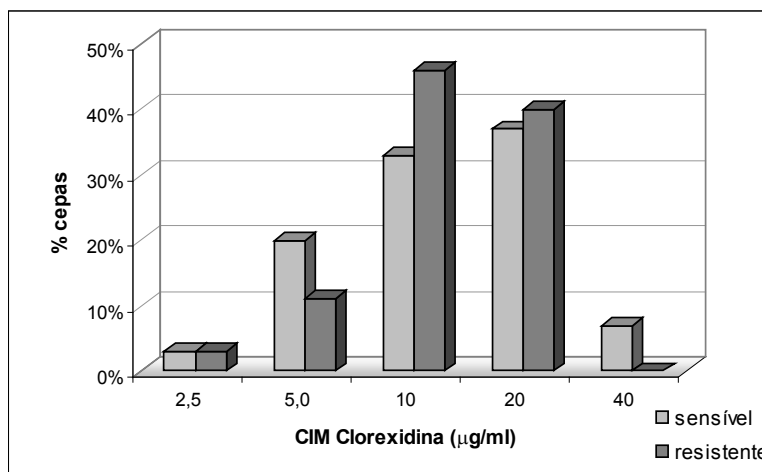


Figura 1. Distribuição das amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* sensíveis e resistentes ao imipenem e ao meropenem em relação à concentração inibitória mínima a clorexidina.

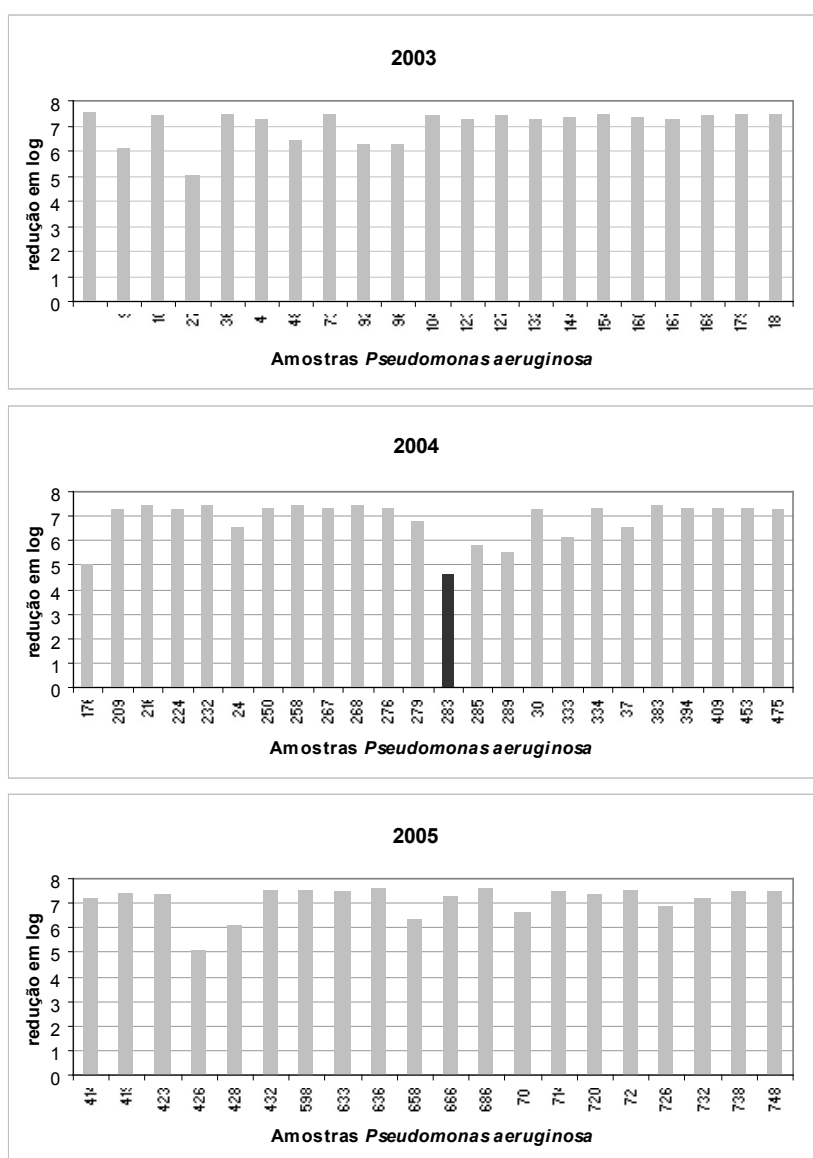


Figura 2. Atividade bactericida da clorexidina a 0,2% contra as 65 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, avaliada pelo teste de suspensão (EN 1040). Resultados expressos pelo fator de redução logarítmica. Amostras bacterianas distribuídas de acordo com o período de isolamento.

DISCUSSÃO

Em décadas passadas, as polimixinas constituíam uma das poucas opções no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa*, entretanto, a partir de 1980, outros agentes antimicrobianos menos tóxicos foram introduzidos na terapêutica e assim, o uso clínico das polimixinas permaneceu limitado às formulações de uso tópico. Mais recentemente, porém, as polimixinas foram reintroduzidas na forma de monoterapia ou em associação com outros antibióticos, para tratar doenças graves causadas por *P. aeruginosa*, pois, em muitos casos é o único agente ativo contra estas bactérias. No presente estudo, a polimixina B foi o único antibiótico ativo para todas as amostras testadas.¹³⁻¹⁶

Entre os demais antibióticos testados a piperacilina em combinação com tazobactam apresentou maior atividade antimicrobiana (75,4%), seguida da ceftazidima e cefepima (41,5%). A taxa de sensibilidade foi semelhante à encontrada em um estudo multicêntrico com amostras de hemoculturas de pacientes internados em quatro hospitais brasileiros (73,4%), e superior a encontrada em outro estudo realizado em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro (63,5%).^{17,18} Por outro lado, a sensibilidade a ceftazidima e cefepima de 41,5% foi inferior a outros estudos realizados, como por exemplo, àquelas encontradas em estudo multicêntrico realizado em quatro hospitais brasileiros que foram de 50,2% para ceftazimima e 46,6% para cefepima, o estudo de Santos e colaboradores (2002) encontrou 78% e 70% e Freitas & Barth (2002) 87,7% e 80%, respectivamente.^{17,19,20}

Taxas de sensibilidade inferiores a 40% foram encontradas para aztreonam, aminoglicosídeos e quinolonas. Esses resultados, associados aos obtidos com as cefalosporinas limitam as opções terapêuticas e apontam um problema de difícil solução no hospital onde as amostras foram selecionadas. Entretanto, é possível verificar através de resultados de outros estudos que as taxas de sensibilidade para esses antimicrobianos variam entre os hospitais, provavelmente, influenciadas pelas condutas terapêuticas de cada instituição, como a terapia empírica.²⁰⁻²²

Pseudomonas aeruginosa assim como outros bacilos Gram-negativos não-fermentadores frequentemente são resistentes a três ou mais classes de antibióticos e essa característica confere a essas bactérias o fenótipo de multirresistência. Isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes podem apresentar resistência a todos os antibióticos disponíveis clinicamente. No estudo verificou-se que entre as 35 amostras resistentes a imipenem/meropenem, 5 (14%) apresentaram sensibilidade apenas para polimixina B. A taxa de sensibilidade dessas amostras a piperacilina/tazobactam (68,6%) é elevada quando comparada com os demais agentes testados, mas insuficiente para que este antibiótico seja utilizado isoladamente na terapia empírica em pacientes graves. Desta forma, a polimixina B, que embora apresentando atividade para 100% das amostras, é um agente com maior toxicidade do que os agentes tradicionais, sendo a nefrotoxicidade o efeito mais frequente. Ao contrário

dos resultados obtidos nesta pesquisa, outros estudos recentes relatam o isolamento de *P. aeruginosa* com reduzida susceptibilidade a polimixina B em hospitais de Nova York.^{2, 22, 23}

Um estudo recente realizado com amostras clínicas de *P. aeruginosa* multirresistentes isoladas em hospitais brasileiros demonstrou que 43% das cepas apresentavam redução da susceptibilidade a um desinfetante quaternário de amônio comumente empregado nos setores de saúde.²⁴ Em relação à clorexidina, Stickler e colaboradores (1983), relataram resistência a esse biocida e a cinco antibióticos em bactérias Gram-negativas isoladas de infecções de trato urinário. Diante desses resultados os autores sugerem que o amplo uso de clorexidina seria responsável por selecionar cepas resistentes aos antibióticos. Um outro estudo demonstrou a resistência a clorexidina, na concentração de 0,05%, em 84,2% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de lesões.² Em relação à CIM da clorexidina, os resultados encontrados neste estudo, variaram de 2,5 a 40 µg/ml, com CIM₅₀ de 10 µg/ml e CIM₉₀ de 20 µg/ml, e não foi encontrado aumento da CIM entre as amostras isoladas nos três diferentes anos de estudo. Esses resultados são similares aos de Amorin e colaboradores com valores variando de 2,67 µg/ml a 80 µg/ml. Os demais estudos citados acima diferem dos resultados encontrados neste trabalho.²⁵

Em relação ao teste de suspensão, uma das 65 amostras avaliadas apresentou susceptibilidade reduzida a clorexidina, com fator de redução menor do que 5 log, quando foi exposta por cinco minutos a clorexidina 0,2%. No teste de diluição, a CIM da clorexidina foi de 20 µg/ml. Essa amostra apresentou sensibilidade aos antibióticos piperacilina/tazobactam e polimixina B, e resistência a amicacina, aztreonam, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, ofloxacina e levofloxacina.

O uso contínuo de compostos químicos com atividade antimicrobiana produz um processo seletivo, principalmente em hospitais, causando o aparecimento de microrganismos resistentes. Desse modo, a falta de padronização e o uso inadequado desses agentes podem dificultar tanto o controle da disseminação quanto a erradicação dos patógenos.

No estudo os testes *in vitro* realizados com duas concentrações de uso da clorexidina foram homogêneos e parece não indicar correlação com a múltipla resistência das amostras aos antibióticos. Entretanto, uma amostra apresentou resistência a clorexidina despertando a importância para a vigilância individualizada do perfil de resistência em cada instituição. Novos estudos devem ser realizados para auxiliar na adoção de políticas de utilização racional dos antimicrobianos e de redução da disseminação das cepas resistentes nas instituições de saúde.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior, fundação financiadora da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Navon-Venezia S, Ben-Ami R; Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 306-313.
2. McGowan Jr JE. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med* 2006; 119(6A): S29-S36.
3. Sader HS *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001; 5(4): 200-14
4. Kifer, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gramnegative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* 2005; 9(3): 216-24.
5. Gonçalves, D. C. *et al.* Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Goiânia, state of Goiás. *Rev Soc Bras Med* 2009; 42(4): 411-4.
6. Ataee AA. The use of 2% chlorhexidine gel and toothbrushing for oral hygiene of patients receiving mechanical ventilation: effects on ventilator-associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva* 2014; 26(4): 438-440.
7. Russel AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J of Hosp Infec* 2004; 57: 97-104
8. Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J Appl Microbiol* 2002; 92(Suppl 1): 121S-135S.
9. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8. Wayne, PA, 2003.
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement M100-S16. Wayne, PA, 2006.
11. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th informational supplement M100-S17. Wayne, PA, 2007.
12. EN 1040. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics-Test method and requirements (phase 1). The European standard EN 1040, 2006.
13. Tascini C, Gemignani G, Ferranti S, *et al.* Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Chemother* 2004; 16: 282-287.
14. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* 1999; 33(9): 960-967.
15. Levin AS, Barone AA, Penco J, *et al.* Intravenous colistin a therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999; 28(5): 1008-11.
16. Markou N, Apostolakis H, Koumoudiou C, *et al.* Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care* 2003; 7(5): 78-83.
17. Sader HS, Jones RN, Gales AC, *et al.* SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 25-79.
18. Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, *et al.* Occurrence of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in Different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microb* 2002; 40: 2420-2424.
19. Santos FL, Santos IB, Assis AML. Produção da metalo- β -lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isolados em João Pessoa, Paraíba. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38: 291-296.
20. Freitas ALP, Barth AL. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Braz J Infect Dis* 2002; 6: 1-6.
21. Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab* 2011; 47(4): 409-420.
22. Romão CMCPA, Faria YN, Pereira LP, Asensi MD. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 541-548.
23. Landman D, Bratu S, Alam M, Quale J. Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 954-957.
24. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, *et al.* Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 140-141.
25. Amorin CVG, Aum CE, Mayer MPA. Susceptibilidade de alguns microrganismos orais frente à clorexidina e ao paramonoclorofenol. *Brazilian Oral Research* 2004; 18(3): 242-243.