



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Curso de Doutorado



**COLONIZAÇÃO DE OROFARINGE COMO  
FATOR DE RISCO PARA PNEUMONIA  
ASSOCIADA À VENTILAÇÃO POR *Staphylococcus  
aureus*, USO DE ANTIMICROBIANOS,  
MULTIRRESISTÊNCIA E PROGNÓSTICO DE  
PACIENTES EM UNIDADE DE TERAPIA  
INTENSIVA DE ADULTOS**

Michel Rodrigues Moreira

Uberlândia - MG  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Curso de Doutorado



**COLONIZAÇÃO DE OROFARINGE COMO  
FATOR DE RISCO PARA PNEUMONIA  
ASSOCIADA À VENTILAÇÃO POR *Staphylococcus  
aureus*, USO DE ANTIMICROBIANOS,  
MULTIRRESISTÊNCIA E PROGNÓSTICO DE  
PACIENTES EM UNIDADE DE TERAPIA  
INTENSIVA DE ADULTOS**

Tese apresentada ao Colegiado  
do Programa de Pós-Graduação  
em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como requisito  
parcial à obtenção do título de  
Doutor.

Michel Rodrigues Moreira  
Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (Orientador)  
Prof. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (Co-orientadora)

**Uberlândia - MG  
2013**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M838c    Moreira, Michel Rodrigues, 1978-  
2013       Colonização de orofaringe como fator de risco para pneumonia associada à ventilação por *Staphylococcus aureus*, uso de antimicrobianos, multirresistência e prognóstico de pacientes em unidade de terapia intensiva de adultos / Michel Rodrigues Moreira. – 2013.  
79 p. : il.

Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.

Coorientadora: Ana Lúcia da Costa Darini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Agentes anti-infecciosos - Teses. 3. Pneumonia - Teses. 4. *Staphylococcus aureus* - Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Darini, Ana Lúcia da Costa. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

Dedico este trabalho aos meus pais e minha esposa, por tornarem minha caminhada mais suave.

“Ainda que eu tiver o dom da profecia e conhecer todos os mistérios e ciência, e ainda que eu tiver toda fé e não tiver amor, eu nada serei” (1 Cor. 13:2).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me iluminar quando a dúvida afligia e por me dar coragem quando os obstáculos pareciam intransponíveis. A Ele toda honra, glória e louvor.

Aos meus pais, Pio e Margarete, sem os quais essa conquista não seria possível, pelos ensinamentos para a vida, por todo amor, apoio e compreensão.

À minha esposa Vivian, pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou, por seu apoio que nunca faltou, por sua paciência e compreensão, e por seu amor.

Às minhas irmãs, Camila e Gabriela, pela amizade e apoio em todos os momentos, à Valentina, que veio trazer muita alegria e aos meus cunhados.

Ao Celinho, Nazaré e família, por todo apoio e carinho.

Ao meu orientador Professor Dr. Paulo Gontijo, pela paciência e pelo exemplo de dedicação às pessoas, ao ensino e à pesquisa.

À minha co-orientadora Professora Dra. Ana Lúcia Darini, por seu apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

À Joseane, pela disponibilidade e auxílio.

Aos professores Dr. Carlos Fortaleza, Dr. Geraldo Sadoyama e Dr. Orlando Mantese, por aceitarem compor a banca na defesa desta tese.

Ao Professor Dr. Geraldo Melo, pelos ensinamentos, apoio, amizade e por aceitar compor a banca na defesa desta tese.

Às professoras Dra. Lizandra e Dra. Karinne, por aceitarem participar como suplentes na defesa desta tese.

À professora Dra. Rosineide, pelo seu apoio, amizade e valiosa contribuição durante a realização deste trabalho.

À professora Dra. Denise, pelo apoio e amizade.

Aos técnicos Ricardo, Samuel e Claudete, pela dedicação, amizade e colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Lílian, pela amizade e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Deivid, pela disponibilidade para me ajudar com PCR

Aos colegas do laboratório de microbiologia, pelos bons momentos juntos, pela amizade e companheirismo.

Aos profissionais da UTI de adultos do HC-UFU, os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos profissionais da farmácia do HC-UFU.

Aos pacientes e seus familiares, por colaborarem para a realização deste trabalho.

Aos amigos Jorge, Lucileide e Lucélia, pela amizade, dedicação e paciência inesgotável.

A todos os demais, que porventura não fizeram parte desta lista, mas que contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui, muito obrigado!

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ARIMP – Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia

ASIS – “*Average Severity of Illness Score*”

ATCC – “American Type Culture Collection”

ATS – “American Thoracic Society”

BHI – “Brain and Heart Infusion” (Caldo Infusão Cérebro e Coração)

CDC – “Center for Disease Control and Prevention”

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CVC – Catéter vascular central

DDD – Dose diária definida

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA – Ácido etileno di-amino tetra-acético

ESBL – Beta lactamases de espectro estendido

EUA – Estados Unidos da América

HC – Hospital de Clínicas

HCl – Ácido clorídrico

IC – Intervalo de confiança

IRAS – Infecções relacionadas com assistência à saúde

MR – Multirresistente

mg – miligrama

mM - milimolar

mL – Mililitro

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Manésio

MLST – “Multilocus sequence typing”

NaCl – Cloreto de sódio

NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance System

OF – oxidação-fermentação

OR – *Odds Ratio*

ORSA – *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

OSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina



PAV – Pneumonia associada à ventilação

Pb – Pares de bases

PCR – “Polimerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

PFGE – “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (Eletroforese em gel de campo pulsado)

pH – potencial hidrogeniônico

Q.S.P. – Quantidade suficiente para

SCC*mec* – “Staphylococcal cassette chromosome *mec*”

SNG – Sonda naso-gástrica

SV – Sonda vesical

TIADPAV – Tempo de internação anterior ao diagnóstico de PAV

DVMADPAV – Duração da ventilação mecânica anterior ao diagnóstico de PAV

TE – Tris-EDTA

TSA – “Trypticase soy agar”

TSB – “Trypticase Soy Broth”

UFC – Unidades formadoras de colônias

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

US\$ - Dólares (americanos)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

$X^2$  – Qui-quadrado

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Tempo para o desenvolvimento de colonização de orofaringe por *S. aureus* nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....37
- Figura 2: Eletroforese em gel de agarose do gene *mecA* em *S. aureus* resistentes à oxacilina.....38
- Figura 3: Padrão de macrorrestrição após digestão com *SmaI* e PFGE do DNA cromossômico de nove amostras de ORSA isoladas de pacientes da UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....41
- Figura 4: Padrão de macrorrestrição e dendrograma de similaridade genômica após digestão com *SmaI* e PFGE do DNA cromossômico de dez amostras de OSSA.....42
- Figura 5: Relação entre a densidade de uso de antimicrobianos e a densidade de colonização de orofaringe por *S. aureus* nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....43
- Figura 6: Relação entre a densidade de uso de antimicrobianos e a etiologia de PAVs nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....44
- Figura 7: Análise da mortalidade hospitalar no período de 30 dias após o diagnóstico de PAV por patógenos multirresistentes ou não-multirresistentes em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....47
- Figura 8: Análise da mortalidade hospitalar no período de 30 dias após o diagnóstico de PAV em pacientes que receberam terapia antimicrobiana

empírica apropriada ou inapropriada na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....	48
---	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Microrganismos multirresistentes e não-multirresistentes associados com PAV na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....35
- Tabela 2: Pacientes sob ventilação mecânica colonizados por *S. aureus*, ORSA e OSSA e o risco de PAV na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....36
- Tabela 3: Características da colonização de orofaringe por ORSA ou por OSSA nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....38
- Tabela 4: Fatores de risco independentes para colonização de orofaringe por ORSA em pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....39
- Tabela 5: Características dos pacientes com PAV por microrganismos multirresistentes ou não-multirresistentes na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....45
- Tabela 6: Fatores de risco independentes para PAV causada por microrganismos multirresistentes na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.....46

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Hospital.....	26
3.2 Desenho do estudo.....	26
3.3 Definições.....	27
3.3.1 PAV hospitalar.....	27
3.3.2 Multirresistência aos antimicrobianos.....	27
3.3.3 Terapia antimicrobiana empírica inapropriada.....	28
3.3.4 Terapia antimicrobiana prévia.....	28
3.3.5 Escore ASIS.....	28
3.4 Consumo de antimicrobianos.....	28
3.5 Técnicas microbiológicas.....	29
3.5.1 Coleta de espécime clínico.....	29
3.5.2 Cultura qualitativa.....	29
3.5.3 Cultura quantitativa.....	30
3.5.4 Identificação dos microrganismos.....	30
3.5.5 Estocagem das amostras bacterianas.....	31
3.5.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	31
3.6 Técnicas moleculares.....	32
3.6.1 Reação em cadeia da polimerase para detecção de gene <i>mecA</i> .....	32
3.6.2 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	33
3.7 Análise estatística.....	34
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>77</b>
Anexo I – Ficha individual.....	77
Anexo II – Aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (análise final).....	78
Anexo III – Termo de consentimento.....	79

## RESUMO

A colonização da orofaringe tem papel importante na patogênese de pneumonia associada à ventilação (PAV). A presença de microrganismos multirresistentes (MR) e a terapia antimicrobiana empírica inapropriada afetam negativamente a evolução desta infecção. Este estudo investigou a participação dos fenótipos ORSA e OSSA na etiologia de PAVs, a importância da colonização prévia da mucosa da orofaringe na patogenia desta infecção, a influência do uso de antibióticos na emergência de amostras MR e o prognóstico de pacientes quando da terapêutica antimicrobiana empírica. O estudo foi prospectivo, longitudinal, com busca de casos de colonização de orofaringe e PAV por *S. aureus* no período de Maio/2009 a Agosto/2010. Adicionalmente, também foram feitos dois estudos caso-controle; o primeiro para a avaliação dos fatores de risco associados à colonização por *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA), sendo os casos pacientes colonizados por ORSA e os controles por *S. aureus* sensível à oxacilina (OSSA), e o segundo estudo para avaliar os fatores associados ao desenvolvimento de PAV por microrganismos MR, com os casos representados por pacientes com PAV por bactérias MR e os controles aqueles com PAV por bactérias não-MR. No total, 346 pacientes foram submetidos à ventilação mecânica, 36,4% apresentaram a mucosa da orofaringe colonizada, sendo a maioria (63,5%) pelo fenótipo ORSA e 36,5% pelo OSSA, com risco de pneumonia significativo para ambos fenótipos. A densidade de uso de glicopetídeos elevada (269,56 DDDs/1.000) foi relacionada com a colonização pelo ORSA (Pearson  $r=0.57/p=0.02$ ) e a idade > 60 anos, terapia antibiótica previa e uso prévio de carbapenêmicos, foram fatores de risco independentes para a presença deste microrganismo na mucosa de orofaringe. A taxa de PAV foi de 25,3%, com microrganismos MR representando cerca da metade (47,3%). Foram fatores de risco independentes para este grupo as seguintes características: tempo de internação prolongado, uso de corticoides e exposição prévia a antibióticos. A terapia antimicrobiana empírica foi inapropriada em 30,9% dos pacientes com PAV e foi significativamente associada com a mortalidade em 30 dias, assim como quando da etiologia por microrganismos MR. Em síntese, foi observada relação significativa entre colonização de orofaringe e risco de PAV por ambos os fenótipos. A colonização por ORSA foi relacionada com idade > 60 anos e exposição prévia a antibióticos, esta última relacionada também com PAV por microrganismos MR, a qual teve um pior

prognóstico, assim como aquelas que receberam terapêutica antimicrobiana empírica inapropriada. A importância das PAVs em UTIs de hospitais de países em desenvolvimento com poucos recursos na área de saúde hospitalar é clara, fazendo-se necessário mais e melhores estudos epidemiológicos, além de pesquisas sobre estratégias mais fáceis e de menor custo na sua prevenção.

**Palavras chave:** Colonização de orofaringe, pneumonia associada à ventilação, infecção hospitalar, microrganismos multirresistentes, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

The colonization of the oropharynx plays an important role in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia (VAP). The presence of multidrug-resistant (MDR) microorganisms and inappropriate empirical antimicrobial therapy negatively affects the evolution of this infection. This study evaluated the involvement of ORSA and OSSA phenotypes in the etiology of VAPs, the importance of previous colonization of the oropharyngeal mucosa in the pathogenesis, the influence of the use of antibiotics in the emergence of MDR samples, and prognosis of patients when empirical antimicrobial therapy was introduced. We conducted a longitudinal, prospective study with the search for cases of oropharyngeal colonization and VAP by *S. aureus* from May 2009 to August 2010. Additionally, two case-control studies were also performed; the first to assess the risk factors associated with colonization by *S. aureus* resistant to oxacillin (ORSA), with cases represented by colonized patients by ORSA and controls those colonized by *S. aureus* sensitive to oxacillin (OSSA), and the second study to evaluate factors associated with the development of VAP by MDR microorganisms, with cases represented by patients with VAP by bacteria MDR and controls those with VAP by bacteria non-MDR. In total, 346 patients were submitted to mechanical ventilation, of which 36.4% were colonized in the oropharynx with *S. aureus*, corresponding to 63.5% and 36.5% of ORSA and OSSA, respectively and risk of pneumonia was significant for both phenotypes. The high density of use of glycopeptides (269.56 DDDs / 1,000 patient-days) was related to colonization by ORSA (Pearson  $r = 0.57$  /  $P = 0.02$ ), and age > 60, previous antibiotic therapy and previous use of carbapenems were independent risk factors for the presence of this bacteria in the mucosa of the oropharynx. The VAP rate was 25.3% with MDR microorganisms representing nearly half (47.3%). The risk factors for this latter group were: length of hospital stay, use of corticoids and prior use of antibiotics. Empirical antimicrobial therapy was inappropriate in 30.9% of patients with VAP and was significantly associated with 30-day ICU mortality, as well as the etiology by microorganisms MDR. In summary, there was a significant relationship between the colonization of the oropharyngeal mucosa and the risk of VAP by both phenotypes. The ORSA colonization was associated with age > 60 years and previous exposure to antibiotics, the latter also associated with VAP by microorganisms MDR, which had a worse prognosis, as well as those who received



inappropriate empirical antimicrobial therapy. The importance of VAPs in ICUs of hospitals in developing countries with limited resources in healthcare hospital is clear, making it necessary more and better epidemiological studies, and research on strategies easier and less costly in its prevention.

**Keywords:** Oropharyngeal colonization, ventilator-associated pneumonia, hospital infection, multidrug-resistant microorganisms, *Staphylococcus aureus*.

## 1-INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas com assistência à saúde (IRAS) representam grave problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento como o Brasil, onde os recursos humanos e financeiros são muito limitados e a minoria dos hospitais possui comissões de controle de infecções ativas, quanto em países desenvolvidos, causando aumento significativo na morbidade, mortalidade e custos hospitalares (NETLEMAN, 1993; PRADE, 1995; BOYCE, 2001; TOUFEN JUNIOR et al., 2003; VINCENT et al., 2009; ROSENTHAL et al., 2010; PELEG e HOOPER, 2010; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012). No Brasil a taxa média de prevalência é de 15%, em hospitais de assistência terciária (PRADE et al., 1995). Nos EUA, elas afetam cerca de 9% dos pacientes hospitalizados e as taxas de infecções adquiridas nas unidades de terapia intensiva (UTIs) são 5-10 vezes maiores que nas demais unidades, portanto, pelo menos 45% das IRAS ocorrem em pacientes internados nestas unidades, que correspondem a menos de 10% dos leitos hospitalares (DHILLON e CLARK, 2009). Nas UTIs os pacientes são mais susceptíveis a essas infecções em função do imunocomprometimento devido à idade avançada, co-morbidades, além da maior utilização de dispositivos invasivos e da exposição a antibióticos (PITTET e HARBATH, 1998; VINCENT, 2003; VINCENT et al., 2009; ROSENTHAL et al., 2010; JACOBY et al., 2010; PADOVEZE et al., 2010). No início deste século, a incidência de IRAS foi estimada em 1,7 milhões nos EUA, com aproximadamente 6% de mortalidade (100.000/ano) e um custo financeiro de US\$ 35-45 bilhões/ano (PELEG e HOOPER, 2010; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que as autoridades de saúde desenvolvam programas nacionais ou regionais para dar suporte aos hospitais na redução do risco de IRAS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). No Brasil, embora os comitês para controle de infecção sejam mandatórios desde 1997, não há evidências de que as medidas de controle de infecção sejam corretamente aplicadas (PADOVEZE et al., 2010).

Entre as IRAS, a pneumonia é a segunda mais comum e a primeira em pacientes internados em UTIs, onde correspondem a cerca de 50% das infecções (VINCENT, 2003; ALP et al., 2004). A maioria destas infecções é representada pelas “pneumonias associadas à ventilação” (PAVs) (BROUGHTON FONER e BASS, 1996; PELEG e HOOPER, 2010). Elas ocorrem em 9-24% dos pacientes sob ventilação mecânica,

elevam o tempo de internação e contribuem para aumentar a taxa de mortalidade nas UTIs (RELLO et al., 2002; ERBAY et al., 2004; GARCIN et al., 2009; NIVEN et al., 2009; JOSEPH et al., 2010; PELEG e HOOPER, 2010; AL-DORZI et al., 2012; TSENG et al., 2012). Nos países desenvolvidos a taxa de incidência de PAV varia de 1 a 4 casos por 1000 dias de ventilação (EDWARDS et al., 2009; TAO et al., 2012) e fica em torno de 13 casos por 1000 dias de ventilação nos países em desenvolvimento (ROSENTHAL et al., 2010; TAO et al., 2012), sendo que na UTI de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) a taxa de incidência de PAV foi de 24,59 casos por 1000 dias de ventilação (ROCHA et al., 2008). Estima-se que 52000 pacientes/ano sejam acometidos nos EUA (LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012). As PAVs são definidas como hospitalares quando adquiridas após 48 horas da presença da prótese ventilatória (KOLLEF, 2005; JOSEPH et al., 2010a). Este procedimento invasivo está associado a 83% das pneumonias hospitalares (VINCENT, 2003), compromete os mecanismos de defesa, incluindo a tosse e o papel da barreira muco-ciliar (TEJADA et al., 2001; APPELGREN et al., 2001; JOSEPH et al., 2010), favorecendo a microaspiração de secreções da orofaringe colonizadas por microrganismos potencialmente patogênicos (VINCENT, 2003; DIAZ, DIAZ e RELLO, 2003; BERGMANS e BONTEN, 2004; SAFDAR, CRNICH e MAKI, 2005).

Embora a ventilação mecânica seja identificada como fator de risco per si, a duração da ventilação é igualmente importante (VINCENT et al., 1995; PAPIA et al., 1999; APPELGREN et al., 2001; ALP e VOSS, 2006; JOSEPH et al., 2010a; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012). O risco de ocorrência de PAV é de 1% a 3% para cada dia de permanência em ventilação mecânica (TEIXEIRA et al., 2004). Outros fatores de risco incluem: nível de consciência diminuído, idade avançada, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), traumatismo craniano, queimadura, profilaxia de úlcera de estresse, cirurgia gastro-torácica, nutrição parenteral e uso de antibióticos (TROUILLET et al., 1998; FLEMING, BALAGUERA e CRAVEN, 2001; IBRAHIM et al., 2001; LEROY et al., 2003; ALP et al., 2004; YEPES et al., 2006; JOSEPH et al., 2010; TAO et al., 2012; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012).

Os agentes etiológicos de PAVs variam de acordo com a região geográfica, hospital, unidade e população estudada (JOSEPH et al., 2010a), entretanto, de uma maneira geral, *Staphylococcus aureus* e os bacilos Gram-negativos não-fermentadores

são os agentes mais importantes (GALES et al., 2009; JOSEPH et al., 2010a; SANDIUMENGE et al., 2011; PELEG e HOOPER, 2010; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012; TSENG et al., 2012). No Brasil, dados do SENTRY revelam que *Pseudomonas aeruginosa* é o agente mais frequente associado a pneumonias em pacientes hospitalizados, seguido por *S. aureus* e por *Acinetobacter baumannii* (GALES et al., 2009), assim como revelam trabalhos realizados em uma UTI de adultos em Uberlândia (ROCHA et al., 2008; MOREIRA et al., 2009). Em Porto Alegre, um trabalho realizado em quatro UTIs clínico-cirúrgicas mostrou que *S. aureus* foi o principal agente de PAVs, seguido por *P. aeruginosa* e por *A. baumannii* (TEIXEIRA et al., 2004).

Apesar dos estafilococos serem habitantes comuns da pele e membranas mucosas, as narinas constitui o principal reservatório destes microrganismos, sendo o sítio mais investigado (WENZEL e PERL, 1995; WERTHEIM, 2005; CHEN, CHANG e HUANG, 2010). A colonização destas parece exercer papel importante na epidemiologia e patogênese de muitas infecções (KLUYTMANS, BELKUM e VERBRUGH, 1997). A colonização nasal por *S. aureus* aumenta significativamente a taxa de infecção de sítio cirúrgico após cirurgia cardíaca maior e é um fator de risco independente para infecções de ferida cirúrgica (MUÑOZ et al., 2008). No que diz respeito às infecções relacionadas com cateter venoso central estudo de Luzar (1991) relatou que 45% dos pacientes avaliados apresentavam colonização nasal antes da inserção do cateter. As infecções do local de inserção do cateter ocorreram a uma taxa de 0,4 episódios por paciente por ano nos pacientes colonizados, mas são menos frequentes nos pacientes não colonizados, com 0,1 episódios por paciente por ano. Em estudo conduzido por Pujol et al. (1996), a colonização nasal por *S. aureus* foi fator de risco para o desenvolvimento de bacteremia nosocomial em uma unidade de terapia intensiva, com uma taxa de bacteremia de 38% para pacientes colonizados por *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA) vs. 9.5% para aqueles colonizados por *S. aureus* sensível à oxacilina (OSSA) e 1,7% para aqueles não colonizados. Entretanto, recentemente, estudos mostram que a colonização da mucosa da orofaringe é igualmente importante à da mucosa nasal (RINGBERG et al., 2006; NILSSON e RIPA, 2006; MARSHALL e SPELMAN, 2007; MERTZ et al., 2007, BIGNARDI e LOWES, 2009) e tem papel de destaque na patogênese das PAVs (GEORGE et al., 1998; CAVALCANTI, VALENCIA e TORRES, 2005; BERALDO e ANDRADE, 2009). Adicionalmente, a

intubação, em insuficiência respiratória é mais comum por via oral do que nasal em decorrência de aspectos iatrogênicos (DODEK et al., 2004; ATS, 2005), portanto a investigação da colonização da mucosa de orofaringe como origem de microrganismos associados à etiologia de PAVs parece ser mais racional.

A microaspiração de secreções da orofaringe é um evento comum, mesmo em indivíduos saudáveis (KOLLEF, 2005a), com 45% deles aspirando secreções durante o sono (HUXLEY et al., 1978). A colonização da mucosa do trato respiratório superior por microrganismos potencialmente patogênicos é particularmente frequente em pacientes graves internados em UTI por tempo prolongado e em uso de antibióticos e dispositivos invasivos, com destaque para a prótese ventilatória, especialmente naqueles com nível de consciência diminuído (VINCENT, 2003; SAFDAR, CRNICH e MAKI, 2005). A colonização da orofaringe é fator preditor independente para a colonização traqueo-bronquial subsequente e a aspiração dessa secreção contendo um inóculo bacteriano em pacientes sob ventilação mecânica é a principal via de aquisição de PAV (SAFDAR, CRNICH e MAKI, 2005).

Alguns fatores de risco específicos predisõem à colonização/infecção por ORSA, incluindo tempos de ventilação mecânica e de permanência na UTI prolongados, idade avançada, proximidade a pacientes com infecção por esta bactéria e terapia antimicrobiana prévia de amplo espectro, particularmente com cefalosporinas e fluoroquinolonas (SIMOR et al., 2001; THOMPSON, 2004; FERRARA, 2007; TACCONELLI et al., 2008; GOULD, 2009). Por outro lado, a colonização/infecção pelo *S. aureus* sensível à oxacilina (OSSA) ocorre mais frequentemente em pacientes mais jovens com trauma crânio-encefálico (LEROY et al., 2003; DIAZ, DIAZ e RELLO, 2003; PARK, 2005).

A taxa de mortalidade hospitalar por PAV é alta, variando de 20% a 70% de acordo com a população estudada (CHASTRE e FAGON, 2002; KOLLEF, 2005a; ALP e VOSS, 2006; TSENG et al., 2012; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012), e o seu custo financeiro é substancial, variando de US\$10.000 a US\$40.000 por episódio (CHASTRE e FAGON, 2002; FLANDERS, COLLARD e SAINT, 2006; JOSEPH et al, 2010; LOBDELL, STAMOU e SANCHEZ, 2012).

O diagnóstico de pneumonia hospitalar é complexo, feito por critérios clínicos, radiológicos, laboratoriais e microbiológicos (TROUILLET et al., 1998; LEROY et al., 2003; ALP e VOSS, 2006; JOSEPH et al, 2010). Os dados clínicos e radiológicos estão

ligados à baixa especificidade (NIEDERMAN, 2005; KOLLEF, 2005; MEDFORD et al., 2009; CRAVEN, HUDCOVA e LEI, 2011), e a utilização de critérios microbiológicos quantitativos aumenta a especificidade (BERGMANS e BONTEN, 2004; MEDFORD et al., 2009; CRAVEN, HUDCOVA e LEI, 2011). Os espécimes clínicos utilizados na avaliação microbiológica incluem: aspirado endotraqueal, lavado bronco-alveolar e escovado protegido, sendo os dois últimos considerados minimamente contaminados por secreções do trato respiratório superior, porém mais caros e invasivos, podendo raramente levar a arritmias cardíacas, hipoxemia e broncoespasmo (NAFZIGER e WIBLIN, 2003; MEDFORD et al., 2009; KIENINGER e LIPSETT, 2009; JOSEPH et al., 2010a; PELEG e HOOPER, 2010; CRAVEN, HUDCOVA e LEI, 2011). O aspirado endotraqueal é uma alternativa de custo mais baixo, apresentando boa sensibilidade, mas com pior especificidade quando comparado com os resultados obtidos com outros espécimes clínicos (BASELSKI e WUNDERINK, 1994; MEDFORD et al., 2009; KIENINGER e LIPSETT, 2009; JOSEPH et al., 2010). Entretanto, a análise do aspirado endotraqueal pela técnica quantitativa com ponto de corte de  $10^6$  UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) evidencia boa correlação com os resultados obtidos com os de espécimes minimamente contaminados (SAUAIA et al., 1993; TORRES et al., 1993; MARQUETTE et al., 1995; KIENINGER e LIPSETT, 2009; JOSEPH et al., 2010; CRAVEN, HUDCOVA e LEI, 2011).

As PAVs são classificadas em precoces e tardias, estas últimas manifestando-se após quatro dias de ventilação mecânica e relacionadas mais frequentemente com bactérias resistentes, como ORSA (BAUER et al., 2000; CHASTRE e FAGON, 2002; KOLLEF, 2005b; KIENINGER e LIPSETT, 2009; JOSEPH et al., 2010).

A resistência antimicrobiana é ameaça crescente em pacientes hospitalizados e tanto a morbidade quanto a mortalidade são maiores quando causadas por microrganismos resistentes a antibióticos (HSUEH, CHEN e LUH, 2005; JOSEPH et al., 2010). O Brasil e demais países latino-americanos, em geral, tem taxas mais altas de resistência bacteriana em hospitais quando comparado com a Europa e Estados Unidos, particularmente entre bacilos gram-negativos não-fermentadores e representantes da família *Enterobacteriaceae*, neste último grupo destacando-se membros produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), mas também entre os microrganismos gram-positivos, principalmente o *S. aureus* (ROSSI, 2011).

O aumento na prevalência desses patógenos resistentes a antibióticos em hospitais está frequentemente relacionado com a alta pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos tradicionalmente usados em pacientes hospitalizados, particularmente, cefalosporinas de amplo espectro, combinações de beta-lactêmicos com inibidores de beta-lactamases, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (MEYER et al., 2003; HSUEH, CHEN e LUH, 2005).

Por sua gravidade, o tratamento das PAVs deve ser iniciado rapidamente, sendo empírico com antibióticos de amplo espectro até que os resultados da cultura e dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos estejam disponíveis, pois podem ter diversos agentes, ser polimicrobianas ou envolverem bactérias multirresistentes (MR) a antibióticos (KOLLEF, 2005b; FERRARA, 2007; MASTERTON, 2007; JOFFE et al., 2008; NICASIO et al., 2010), as quais são mais frequentemente associadas à PAV tardia, hospitalização prévia ou uso prévio de antimicrobianos (JOSEPH et al., 2010a). Após definição do agente causal, deve-se optar pela terapia específica com o uso de antibióticos de espectro reduzido, promovendo-se o descalonamento da terapia antimicrobiana empírica (HÖFFKEN e NIEDERMANN, 2002; MASTERTON, 2007), mesmo quando o paciente responder bem ao tratamento inicial, a fim de limitar o risco de superinfecção, resistência bacteriana, reações adversas, além de limitar os custos (VINCENT, 2003).

A terapia antimicrobiana empírica inapropriada afeta negativamente a evolução de pacientes com PAV (WAELE et al., 2010), devendo ser adaptada de acordo com a ecologia microbiana local e com o tempo de internação anterior ao desenvolvimento da PAV (PELEG e HOOPER, 2010). O uso adequado de antimicrobianos consiste em encontrar um meio termo entre sua capacidade de reduzir a morbidade e a mortalidade dos pacientes com doenças infecciosas e seus efeitos potencialmente perigosos, ou seja, eventos adversos graves, interações medicamentosas e indução de cepas resistentes (HULSCHER, GROL e VAN DER MEER, 2010).

O uso excessivo ou mesmo inapropriado de antibióticos de amplo espectro e as dificuldades na implementação de medidas de controle de infecções hospitalares são apontados como responsáveis pela emergência e disseminação de agentes cada vez mais resistentes, principalmente em ambientes que apresentam elevada densidade de uso de tais fármacos, como nas UTIs (MCGOWAN, 1987; MEYER et al., 2003; SANTOS et al., 2007; MOREIRA et al., 2009).

O uso aumentado de antibióticos como os carbapenêmicos, que são considerados a última opção terapêutica, podem contribuir, a exemplo do que aconteceu com as penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, para a emergência de bacilos gram-negativos MR, sobretudo de não fermentadores (ISTURIZ, 2008).

Estudos prévios mostram que há variações muito grandes no uso de antibióticos entre países europeus, bem como em hospitais americanos. Essas diferenças podem ser explicadas principalmente com base nas populações de pacientes estudadas, mas aspectos culturais, comportamentais, financeiros e administrativos também tem influência (HULSCHER, GROL e VAN DER MEER, 2010; CARLET et al., 2011). No Brasil há menos dados, mas existem relatos, considerando apenas pacientes críticos, de uso muito mais intenso quando da comparação com hospitais americanos e europeus (MOREIRA et al., 2009).

Considerando os custos e o impacto causado pelo uso de antibióticos, além da necessidade de melhorar o uso dos mesmos, a Organização Mundial de Saúde recomenda como indicador epidemiológico para comparar o seu consumo, a DDD (dose diária definida), a qual é definida como a dose média de manutenção por dia, para um fármaco para determinada indicação em adultos (WHO, 2000; MEYER et al., 2003; CURTIS, MARRIOTT e LANGLEY, 2004).

O entendimento do mecanismo de disseminação de patógenos MR como ORSA é essencial no planejamento de medidas de prevenção e controle e, dadas as limitações dos métodos de tipagem convencionais, observa-se uma preferência pela utilização de técnicas moleculares para o melhor conhecimento e caracterização dos patógenos hospitalares (WELLER, 2000).

Atualmente, a tipagem molecular de bactérias representa uma ferramenta imprescindível no estudo de infecções endêmicas e principalmente epidêmicas de natureza hospitalar, assim como no conhecimento de sua patogenia (SAIMAN et al., 2003). As técnicas de tipagem mais comumente usadas para o *S. aureus* são a eletroforese em campo pulsado (“Pulsed Field Gel Eletrophoresis”, PFGE), o sequenciamento da região polimórfica X do gene que codifica a proteína A, a tipagem do *SCCmec* e o “Multilocus sequence typing” (MLST) (DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008).

A caracterização genotípica pelas técnicas de macrorrestrrição é amplamente utilizada, pela sua maior reprodutibilidade e poder discriminatório das amostras



(MASLOW, MULLIGAN, 1996). A eletroforese em campo pulsado é a mais usada para uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas como *S. aureus* e *Enterococcus*, e gram-negativas, tais como espécies de *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (TENOVER et al., 1994; WELLER, 2000; VILLARI, SARNATARO e IACUZO, 2000; DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008; FEIZABALDI et al., 2011).

Considerando, que há poucos estudos sobre aspectos epidemiológicos de PAVs; que ela é a infecção mais frequente em UTIs de adultos; que nossa UTI é referência regional; que a terapêutica antimicrobiana na unidade é usualmente empírica, com associação de antibióticos de amplo espectro, sem descalonamento desta quando da obtenção do resultado das culturas, com reflexo no prognóstico dos pacientes e nos custos do tratamento; que a falta de recursos humanos e financeiros dificultam a adoção de práticas de prevenção e controle destas infecções, oferecendo condições favoráveis para que microrganismos resistentes, resultantes da pressão seletiva do uso de antimicrobianos, possam disseminar com mais facilidade entre os pacientes; a investigação proposta analisa as PAVs por *S. aureus* sensível ou resistente à oxacilina no que concerne sua patogenia, envolvendo a colonização prévia da mucosa da orofaringe como fator de risco, inclusive através de utilização de técnica molecular; bem como as PAVs por outros microrganismos, envolvendo particularmente o papel modulador de diferentes classes de antimicrobianos na etiologia das mesmas e o prognóstico dos pacientes quando da terapia antimicrobiana empírica inicial apropriada ou inapropriada.

## 2-OBJETIVOS

### 2.1-Objetivo geral:

Investigar a participação dos fenótipos ORSA e OSSA na etiologia de PAVs, a importância da colonização prévia da mucosa da orofaringe na patogenia desta infecção, a influência do uso de antibióticos na emergência de amostras multirresistentes e o prognóstico de pacientes quando da terapêutica antimicrobiana empírica.

### 2.2-Objetivos específicos:

- Determinar a incidência de ORSA e OSSA;
- Avaliar os fatores de risco associados à colonização de orofaringe por *S. aureus* resistente ou sensível à oxacilina e o risco de desenvolvimento de PAV em pacientes previamente colonizados, bem como alguns fatores de risco para PAV pelos demais microrganismos MR;
- Verificar a relação entre o consumo de carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta gerações e glicopeptídeos e a etiologia de PAVs por diferentes microrganismos MR e com a colonização de orofaringe por *S. aureus* resistente à oxacilina;
- Avaliar a evolução dos pacientes quando da terapêutica antimicrobiana empírica apropriada ou inapropriada;
- Determinar a presença do gene *mecA* nas amostras de pacientes colonizados por ORSA que evoluíram para PAV;
- Avaliar o padrão clonal de amostras de *S. aureus* isoladas da mucosa de orofaringe e aspirado endotraqueal / PAV, para verificar a relação entre colonização e infecção e os padrões endêmico e epidêmico na unidade.

### 3-CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1-Hospital

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), complexo hospitalar público, universitário, de assistência terciária e com capacidade para 530 leitos. É referência para uma população estimada de mais de dois milhões de habitantes, moradores de Uberlândia e de 81 municípios das regiões do Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e sul de Goiás. É responsável pela maior parte do atendimento hospitalar vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) no município de Uberlândia. Possui clínicas de várias especialidades e, por ser um hospital de alta complexidade que atua como referência regional, grande parte dos seus pacientes exige cuidados complexos. A Unidade de Terapia Intensiva (UTI) mista de adultos é clínico-cirúrgica e no momento do estudo apresentava 15 leitos.

#### 3.2-Desenho de estudo

No período de maio/2009 a agosto/2010 foi realizado estudo prospectivo, longitudinal, com busca de casos de colonização de orofaringe e PAV por *S. aureus*. Adicionalmente, também foram feitos dois estudos caso-controle, sendo o primeiro para a avaliação dos fatores de risco associados à colonização por ORSA, com os casos incluindo pacientes colonizados por ORSA e os controles aqueles colonizados por OSSA; o segundo estudo foi realizado para avaliar os fatores de risco associados como o desenvolvimento de PAV por microrganismos MR, sendo os casos representados por pacientes com PAV por patógenos MR e os controles aqueles com PAV por patógenos não-MR. Foi preenchida uma ficha individual contendo os seguintes dados de cada paciente: idade, gênero, diagnóstico de admissão, procedimentos invasivos, uso prévio de antimicrobianos e corticoides, tempos de internação e ventilação mecânica (Anexo I). A gravidade dos pacientes foi avaliada utilizando-se o escore ASIS (“Average Severity of Illness Score”) nas primeiras 24 / 48 horas de admissão na UTI e nas 24 horas anteriores ao início do episódio de PAV (ROSENTHAL et al., 2006). Foi ainda realizada a vigilância ativa de todos os pacientes quanto ao consumo de antimicrobianos, considerando-se a classe prescrita e sua densidade de uso. A terapia antimicrobiana empírica foi avaliada de acordo com os “guidelines” da American Thoracic Society (ATS, 2005) sendo estabelecida relação entre terapêutica empírica

apropriada / inapropriada e evolução / prognóstico do paciente. A mortalidade total hospitalar foi avaliada no prazo de 30 dias após o diagnóstico de PAV.

Foram realizadas culturas qualitativas de material clínico coletado da orofaringe, num período de 24 horas de internação e a cada dois dias até a confirmação da colonização ou alta do paciente, e quantitativas do aspirado endotraqueal, quando com suspeita clínica e radiológica de PAV.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU nº 364/08 – Anexo II).

Os pacientes incluídos no estudo ou seus responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos do trabalho proposto e a coleta foi realizada mediante concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III).

### **3.3-Definições**

#### **3.3.1-PAV hospitalar**

Paciente sob ventilação mecânica por período  $\geq 48$  horas após a admissão na UTI, com desenvolvimento de infiltrado radiológico novo e/ou progressivo e pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos / laboratoriais: secreção respiratória purulenta, temperatura maior que 38,5° C ou menor que 35° C, e contagem de leucócitos maior que 10000/ $\mu$ L com desvio à esquerda ou menor que 3000/ $\mu$ L; e, cultura quantitativa de aspirado endotraqueal com contagem  $\geq 10^6$  UFC/mL. A PAV foi considerada precoce quando o diagnóstico ocorreu nos primeiro quatro dias de ventilação mecânica e tardia quando o diagnóstico ocorreu com cinco dias ou mais de ventilação mecânica (TROUILLET et al., 1998; LEROY et al., 2003; ALP e VOSS, 2006; JOSEPH et al., 2010; MAGRET et al., 2011; CRAVEN, HUDCOVA e LEI, 2011).

#### **3.3.2-Multirresistência aos antimicrobianos**

A multirresistência foi definida quando a bactéria apresentou resistência a três ou mais classes distintas de antimicrobianos (DEPUYDT et al., 2008). *A. baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram classificados como multirresistentes se resistentes a quatro ou mais classes de antimicrobianos. A sensibilidade/resistência foi interpretada

de acordo com os critérios do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009).

### **3.3.3-Terapia antimicrobiana empírica inapropriada**

A terapia antimicrobiana empírica foi considerada inapropriada quando pelo menos uma bactéria isolada não era coberta por nenhum antimicrobiano administrado, ou quando era resistente a todos os antimicrobianos incluídos no esquema empírico (KOLLEF, 2000; MAGNOTTI et al., 2011).

### **3.3.4-Terapia antimicrobiana prévia**

Foi definida quando houve uso de antimicrobianos dentro de um período de 14 dias anteriores ao isolamento do microrganismo (BARAN et al., 2008).

### **3.3.5-Escore ASIS (“Average Severity of Illness Score”) definido segundo ROSENTHAL et al., 2006:**

1 ponto: pacientes provenientes de cirurgias que requerem somente observação de rotina no pós-operatório;

2 pontos: pacientes não cirúrgicos, fisiologicamente estáveis, que requerem observação noturna;

3 pontos: pacientes que precisam ser monitorados e necessitam de cuidados de enfermagem contínuos;

4 pontos: pacientes fisiologicamente instáveis, que necessitam de cuidados médicos e de enfermagem intensos e precisam de avaliações e ajustes frequentes da terapêutica;

5 pontos: pacientes fisiologicamente instáveis, que estão em coma ou choque e requerem ressuscitação cardíaco-pulmonar ou cuidados médicos e de enfermagem intensivos com frequentes avaliações.

### **3.4-Consumo de antimicrobianos**

Foram selecionados para cálculos das densidades de uso por 1000 pacientes/dia antibióticos das seguintes classes: carbapenêmicos, cefalosporinas de 3<sup>a</sup>/4<sup>a</sup> gerações e glicopeptídeos. O consumo desses antibióticos foi considerado observando-se a dose

diária definida (DDD), como proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

$$DDD = \frac{\text{Consumo de antibióticos em gramas}}{\text{Dose diária definida (NNIS, 2004)}}$$

$$DDD/1000 \text{ pacientes-dia} = \frac{DDD}{N^{\circ} \text{ de pacientes-dia}^*} \times 1000$$

\* P x L x T

P = Período de tempo em observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

T = índice de ocupação no tempo considerado.

### **3.5-Técnicas microbiológicas**

#### **3.5.1-Colheita de espécime clínico**

A constatação de colonização da orofaringe foi realizada com colheita usando suabe esterilizado, transportado em tubo com 1 mL de “Trypticase Soy Broth” (TSB, Biobrás, Brasil), suplementado com 6,5% de cloreto de sódio (NaCl), e o aspirado endotraqueal foi colhido por sonda nº 12, durante o toalete da árvore respiratória, no início da manhã, pelos profissionais de saúde responsáveis pelo procedimento (fisioterapeutas e enfermeiros), transportado em tubo esterilizado contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%) para o laboratório de microbiologia/ARIMP-UFU, e processado em tempo inferior a duas horas.

#### **3.5.2-Cultura qualitativa**

A suspensão em TSB (Biobrás, Brasil) suplementado com 6,5% de NaCl era incubada durante 18-24 horas a 37°C e, em seguida, 0,1 mL da mesma eram inoculados no meio de cultura ágar manitol salgado (Biobrás, Brasil), para cultivo de estafilococos. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas.

### 3.5.3-Cultura quantitativa

O cultivo quantitativo do aspirado foi realizado em ágar sangue (ágar Mueller-Hinton acrescido de sangue de carneiro), ágar manitol salgado (Biobrás, Brasil), ágar MacConkey (Difco, França) e ágar Pseudomonas (Difco, França). O espécime clínico era diluído 1:10, 1:100, 1:1000, em solução fisiológica (NaCl 0,9%), sendo 0,5 mL do espécime clínico e 4,5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) na primeira diluição, e volumes de 0,1 mL destas diluições foram inoculados. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, para determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

### 3.5.4-Identificação dos microrganismos

Para identificação de microrganismos do gênero *Staphylococcus* foram utilizados: fermentação de manitol (meio de ágar manitol salgado), morfologia celular através de características observadas na coloração de Gram e testes da catalase, coagulase livre e coagulase ligada. Bacilos gram-negativos foram identificados como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e ao grupo dos não-fermentadores através dos testes de oxidação-fermentação (OF) e reação de citocromo-oxidase. A identificação das espécies foi realizada pelos seguintes testes (KONEMAN et al., 2008): Família *Enterobacteriaceae* – fermentação da glicose e lactose, produção de indol, motilidade, utilização de citrato, hidrólise de uréia, produção de gás sulfídrico, fenilalanina desaminase, lisina e ornitina descarboxilase, reação do vermelho de metila e reação de Vogues-Proskauer. Bacilos gram-negativos não-fermentadores – diidrólise de arginina, redução do nitrato, utilização do gluconato, citrato, produção de pigmento, atividade de lisina descarboxilase, urease, produção de indol, hidrólise de acetamida e de esculina.

#### 3.5.4.1-Teste da coagulase livre

Foi realizado a partir de colônias isoladas em ágar, transferidas com alça de platina para tubo com plasma de coelho diluído 1:4 em solução fisiológica (NaCl 0,9%). A leitura para verificação da produção de coágulo foi feita em 4 horas e a confirmação dos resultados negativos realizada 24 horas após incubação a 35°C em banho de água. *S. aureus* ATCC-25923 foi utilizada como controle positivo.

#### **3.5.4.2-Teste da coagulase ligada**

Foi realizado utilizando o “kit” Staphyclin<sup>R</sup> (Laborclin, Brasil), com a adição de uma gota do reagente R1 (hemácias sensibilizadas com fibrinogênio humano e partículas de látex sensibilizadas com IgG monoclonal anti-*S. aureus*) e de uma gota de suspensão da amostra em solução fisiológica (NaCl 0,9%). O reagente R2 (hemácias e partículas de látex não sensibilizadas) foi utilizado como controle negativo. A leitura do teste foi realizada pela visualização de formação de grumos em até 60 segundos.

#### **3.5.5-Estocagem das amostras bacterianas**

Todas as bactérias identificadas com contagem microbiológica no aspirado endotraqueal acima de  $10^6$  UFC/mL e aquelas resultantes da colonização de orofaringe foram estocadas em “Brain and Heart Infusion” (BHI, Biobrás, Brasil) com 20% de glicerol, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.5.6-Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

##### **3.5.6.1-Teste de triagem em ágar incorporado de oxacilina**

As bactérias estocadas foram descongeladas e subcultivadas em ágar TSA (Biobrás, Brasil) pela técnica de esgotamento e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, a seguir, em ágar Mueller-Hinton (Micromed, Brasil) incorporado com 6  $\mu\text{g/ml}$  de oxacilina e 4,5% de NaCl, para detecção de resistência à oxacilina, de acordo com o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009). *S. aureus* – ATCC-25923 foi utilizado como controle de sensibilidade e *S. aureus* – ATCC-33591 como controle de resistência.

##### **3.5.6.2-Teste de difusão em gel**

As amostras foram subcultivadas em ágar TSA (Biobrás, Brasil) pela técnica de esgotamento e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas; cerca de 3 a 5 colônias foram suspensas em solução salina até atingir turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, correspondente à concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL e a suspensão foi semeada com suabe na superfície da placa de ágar Mueller-Hinton, seguindo-se incubação por 24 horas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . A sensibilidade / resistência foi determinada pelo diâmetro do halo de inibição formado (CLSI, 2009), utilizando-se os seguintes



discos de antimicrobianos (OXOID LTD., England): oxacilina (1 µg), penicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), rifampicina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), vancomicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), cefepime (30 µg), tetraciclina (30 µg) e sulfazotrim (25 µg) para Gram-positivos; imipenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), ceftriaxone (30 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina-tazobactam (100/10 µg), polimixina B (300 u)(apenas para *P. aeruginosa*), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), sulfazotrim (25 µg) e tetraciclina (30 µg) para gram-negativos. Foram utilizadas como controles *S. aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922) e *P. aeruginosa* (ATCC-27853).

### 3.6-Técnicas moleculares

#### 3.6.1-Reação em cadeia da polimerase para detecção do gene *mecA*

##### 3.6.1.1-Extração do DNA bacteriano

A extração foi realizada por lise térmica após subcultivo em tubo com 5 mL de caldo TSB (Biobrás, Brasil). Uma alíquota de 1 mL de solução resultante foi submetida à centrifugação por 4 minutos a 2500 x g, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado três vezes em 1 mL de solução tamponante TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e ressuspenso em 100 µL desta mesma solução. A suspensão foi mantida a 100 ° C por 10 minutos e em seguida foi centrifugada por 30 segundos a 9000 x g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas PCR.

##### 3.6.1.2-Reação de PCR

A presença do gene *mecA* foi confirmada pela amplificação dos fragmentos correspondentes, utilizando os seguintes primers: *mecA* P4 5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3' e *mecA* P7 5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'. Em cada tubo, de cada amostra, foram adicionados 8 µL da suspensão de DNA extraído por lise térmica, 25 µL de solução tamponante da Taq DNA polimerase, 1 µL de Mix dNTP (5mM), 1,25 µL de Taq DNA polimerase com MgCl<sub>2</sub>, 1 µL dos primers e água ultra pura q.s.p. 50 µL. A amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycler personal eppendorf* como descrito a seguir: pré-desnaturação a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação com cada um

consistindo de 95° C por 30 segundos, 50° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72° C. Posteriormente, 10 µL deste material amplificado foi aplicado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE, com 5 µL de SYBR<sup>R</sup> SAFE (Applied Biosystems) (1:10000) a cada 100 mL de solução tamponante. Foram aplicados 6 µL de padrão de peso molecular (100pb ladder, Fermentas). A eletroforese foi realizada a 90 V por cerca de 90 minutos e a visualização foi feita utilizando transluminador.

### **3.6.2-Eletroforese em gel de campo pulsado**

As amostras foram inicialmente cultivadas em meio de ágar-sangue a 35°C, por 24 horas. Posteriormente, cinco colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo BHI (OXOID, England) e incubadas durante 18 horas a 37°C. A seguir, 1,5 mL desta suspensão foi centrifugado (16000 x g por dois minutos) e o sedimento ressuspense em 200 µL de solução tamponante PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“*Low Melting Point Agarose*”, IBI Technical, New Haven, EUA) a 1,5%. Após a homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes que foram mantidos a 4°C por cerca de 10 minutos. Posteriormente, os blocos de agarose foram colocados em 1 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6mM pH 7,6, NaCl 1M, EDTA 100 mM pH 7,5, 0,2% deoxycolato de sódio, Brij 58 0,5% e lauril sarcosinato de sódio 0,5%) acrescentando-se RNase a uma concentração final de 20 µg/mL, 1 µg/mL de Lisozima (Sigma) e 100 µg/mL de lisostafina (Sigma) e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. Após este período, a solução tamponante EC foi substituída por solução tamponante ES (EDTA pH 9, sarcosil 1%) acrescida de proteinase K na concentração de 1mg/mL, esta solução foi incubada por 18 horas a 50°C. Os blocos de agarose foram lavados 5 vezes por um tempo de 30 minutos cada com 13 mL da solução tamponante TE 1x (10Mm Tris, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8.0).

#### **3.6.2.1-Digestão com endonuclease de restrição**

Um único bloco com DNA de cada amostra foi colocado em 100µL de tampão da enzima de restrição enzima de restrição *SmaI* (Fermentas) e deixado a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por solução tamponante

fresca e adicionado 30 unidades de enzima de restrição seguindo a incubação em banho de água por 18 a 20 horas a 25°C. Foi preparado 100 mL de gel a 1% (*Agarose Ultra Pure*) em TBE 0,5x (0,89M Tris; 0,89 ácido bórico; 0,25 EDTA, pH 8.0).

### 3.6.2.2-Eletroforese em campo pulsado

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em aparelho - CHEF DR III - System (Bio-Rad), utilizando solução tamponante TBE 0,5% e à temperatura de 14°C por um tempo de pulso crescente de 1 a 30s, durante 23 horas a 6V, com ângulo de 120°. O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL), por 30 minutos, descorado por uma hora com água destilada, observado sob luz ultravioleta e posteriormente fotografado.

Os padrões de banda foram analisados por comparação visual das bandas e foram classificados de acordo com os critérios de Tenover et al. (1995) para análise dos agrupamentos. O dendrograma foi gerado usando o software Bionumerics versão 5.01 (Applied Maths).

### 3.7-Análise estatística

A análise estatística univariada dos fatores de risco foi realizada utilizando-se o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e quando o  $n < 5$  o teste exato de Fisher foi adotado através de tabelas contingência do tipo dois por dois (2 x 2). As variáveis que demonstraram medidas de associação altas (*odds ratio*) foram submetidas à análise multivariada através de modelo de regressão logística. O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para determinar a relação entre o consumo de antibióticos e resistência antimicrobiana. A curva de sobrevivência em 30 dias foi preparada usando estimativa de Kaplan-Meier e comparada usando o teste log rank. A significância estatística foi definida por um valor de  $P \leq 0,05$ . A análise das variáveis foi realizada utilizando-se os programas estatísticos BioEstat 5.0 (Belém, Brasil), GraphPad Prim versão 3.0 (San Diego, EUA), SPSS PC versão 11.0 (Chicago, EUA) e o Epi-Info Software versão 5/2000 (CDC, Atlanta, EUA).

#### 4-RESULTADOS

No total, 617 pacientes foram admitidos na UTI de adultos do HC-UFU no período de maio de 2009 a agosto de 2010. Trezentos e quarenta e seis (56,1%) pacientes foram submetidos à ventilação mecânica, sendo que 126 (36,4%) deles apresentaram-se com a orofaringe colonizada por *S. aureus* em algum momento da internação na unidade. O fenótipo ORSA colonizou 63,5% desses pacientes e o OSSA 36,5%, correspondendo a  $10,97 \pm 6,67$  e  $6,26 \pm 4,49$  colonizações/1000 pacientes-dia para esses microrganismos respectivamente. Entre os 320 (51,9%) pacientes submetidos à ventilação mecânica por  $\geq 48$  horas foram diagnosticados 81 (25,3%) casos de PAV, sendo 71 (87,7%) monomicrobianas e 10 (12,3%) de etiologia polimicrobiana. Os patógenos responsáveis pelas PAVs são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Microrganismos multirresistentes e não-multirresistentes associados com PAV na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

<b>Microrganismos</b>	<b>Total N=91</b>	<b>Multirresistentes N=43 (47,3%)</b>	<b>Não- multirresistentes N=48 (52,7%)</b>
<b>Gram-positivos</b>	13 (14,3%)	4 (9,3%)	9 (18,7%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (12,1%)	4 (9,3%)	7 (14,6%)
SCoN <sup>+</sup>	1 (1,1%)	-	1 (2,1%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (1,1%)	-	1 (2,1%)
<b>Gram-negativos</b>	78 (85,7%)	39 (90,7%)	39 (81,3%)
<b>BGN-NF*</b>	59 (72,8%)	33 (76,7%)	26 (54,2%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32 (39,5%)	18 (41,9%)	14 (29,2%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	24 (29,2%)	13 (30,2%)	11 (22,9%)
Outros BGN-NF*	3 (3,3%)	2 (4,6%)	1 (2,1%)
<b>Enterobacteriaceae</b>	19 (23,5%)	6 (13,9%)	13 (27,1%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9 (11,1%)	6 (13,9%)	3 (6,3%)
<i>Enterobacter</i> spp.	4 (4,9%)	-	4 (8,3%)
<i>Morganella morganii</i>	2 (2,5%)	-	2 (4,2%)
<i>Serratia marcescens</i>	2 (2,5%)	-	2 (4,2%)
<i>Escherichia coli</i>	2 (2,5%)	-	2 (4,2%)

+ *Staphylococcus* Coagulase Negativo, \* Bacilos gram-negativos-não fermentadores

#### 4.1-Colonização de orofaringe por *S. aureus* e o risco de PAV

Apesar das altas frequências de colonização da mucosa da orofaringe por *S. aureus* (126/346; 36,4%), ORSA (80/346; 23,1%) e OSSA (46/346; 13,3%), a participação dos mesmos nos episódios de PAV foi pequena, correspondendo a 11 (13,6%) em 81, com predomínio de OSSA sobre ORSA (63,6% vs. 36,4%, respectivamente). Em sete (63,3%) dos 11 casos de PAV por *S. aureus* houve colonização prévia pelo mesmo microrganismo. O risco dos pacientes com a orofaringe colonizada evoluírem para PAV foi de 5,5% (7 em 126) para *S. aureus*, 5,0% (4 em 80) para o ORSA e 6,5% (3 em 46) para OSSA. Quatro pacientes tiveram episódios de PAV (4 OSSA) sem colonização prévia por este microrganismo. O risco de pneumonia foi significativo ( $P \leq 0,05$ ) quando da análise univariada, considerando se a colonização/infecção foi por ORSA ou OSSA (Tabela 2).

Tabela 2: Pacientes sob ventilação mecânica colonizados por *S. aureus*, ORSA e OSSA e o risco de PAV na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

<i>S. aureus</i>	Colonizados N=126 (%)	Não colonizados N=220 (%)	<i>P</i>	OR	IC
PAV	7 (5,5)	4 (1,8)	0,11	3,18	0,81-13,20
ORSA	Colonizados por ORSA N=80 (%)	Não colonizados por ORSA N=266 (%)	<i>P</i>	OR	IC
PAV por ORSA	4 (5,0)	0	0,003	-	-
OSSA	Colonizados por OSSA N=46 (%)	Não colonizados por OSSA N=300 (%)	<i>P</i>	OR	IC
PAV por OSSA	3 (6,5)	4 (1,3)	0,05	5,16	0,88-28,55

#### 4.2- Características demográficas e clínicas dos pacientes colonizados na orofaringe por *S. aureus*

A colonização da orofaringe foi significativamente associada ao tempo de internação na UTI ( $P = 0,0001$ ), ocorrendo a partir da primeira semana de internação em 75 (93,7%) dos 80 pacientes colonizados pelo ORSA e em 30 (65,2%) dos 46 pelo OSSA. O restante dos pacientes, 6,3% (5/80) e 34,8% (16/46) foram admitidos na unidade já colonizados pelo ORSA e pelo OSSA, respectivamente (Figura 1).

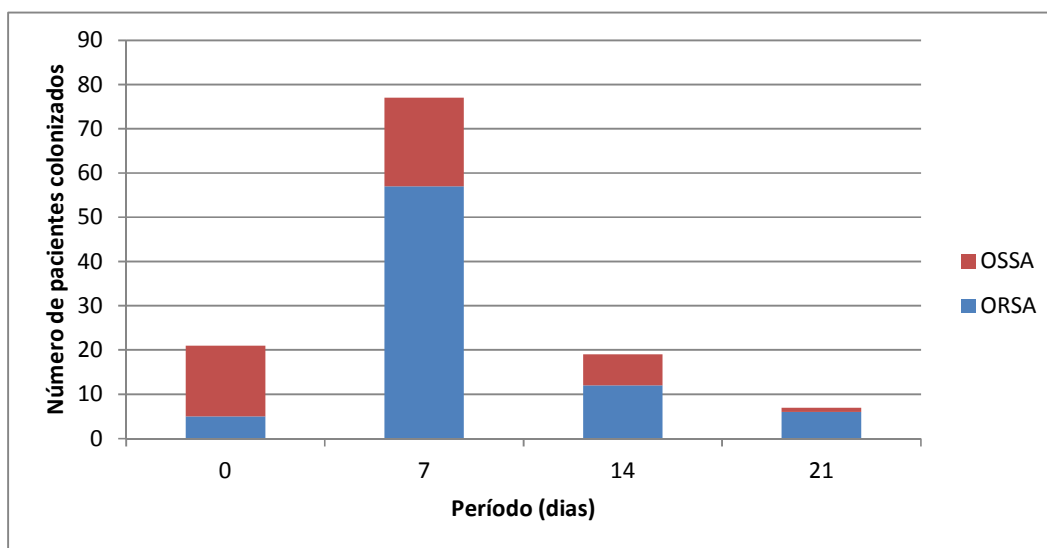


Figura 1: Tempo para o desenvolvimento de colonização de orofaringe por *S. aureus* nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

O tempo médio para colonização foi ligeiramente maior para o ORSA (5,8 dias) do que para o OSSA (5,0 dias) (Tabela 3). Adicionalmente, idade maior que 60 anos, terapia antimicrobiana prévia e uso prévio de carbapenêmicos foram significativamente relacionados com a colonização pelo ORSA quando das análises univariada e multivariada (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Características da colonização de orofaringe por ORSA ou por OSSA nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

<b>Características</b>	<b>ORSA N=80 (63,5%)</b>	<b>OSSA N=46 (36,5%)</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>
<b>Gênero</b>				
Masculino	54 (67,5%)	37 (80,4%)	0,18	0,51
Feminino	26 (32,5%)	9 (19,6%)	0,18	1,98
<b>Idade &gt; 60 anos</b>	25 (31,3%)	6 (13,0%)	0,04 <sup>#</sup>	3,03
<b>Procedimentos invasivos</b>				
Traqueostomia	9 (11,3%)	3 (6,5%)	0,53	1,82
CVC <sup>+</sup>	73 (91,3%)	41 (89,1%)	0,76	1,27
SV <sup>++</sup>	78 (97,5%)	44 (95,6%)	0,62	1,77
SNG <sup>+++</sup>	75 (97,3%)	44 (95,6%)	1,00	0,68
Dreno	11 (13,7%)	6 (13,0%)	0,87	1,06
<b>Uso de corticoides</b>	24 (30,0%)	10 (21,8%)	0,42	1,54
<b>Terapia antimicrobiana prévia</b>	72 (90,0%)	33 (71,7%)	0,02 <sup>#</sup>	3,55
<b>Diagnóstico de admissão</b>				
Clínico	34 (42,5%)	10 (21,8%)	0,03 <sup>#</sup>	2,66
Cirúrgico	11 (13,7%)	6 (13,0%)	0,87	1,06
Trauma	35 (43,8%)	30 (65,2%)	0,06	0,47
<b>Infecção (PAV)</b>	4 (5,0%)	3 (6,5%)	0,70	0,75
<b>Uso de antimicrobianos</b>				
≥ 3	27 (33,7%)	10 (21,8%)	0,22	1,83
Carbapenêmicos	24 (30,0%)	5 (10,9%)	0,02 <sup>#</sup>	3,51
Glicopeptídeos	27 (33,7%)	13 (28,3%)	0,66	1,29
Cefalosporinas <sup>¥</sup> de 3ª e 4ª gerações	42 (52,5%)	25 (54,3%)	0,99	0,93
Penicilinas				
Ampicilina	11 (13,7%)	9 (19,6%)	0,54	0,66
Oxacilina	3 (3,7%)	6 (13,0%)	0,07	0,26
Fluoroquinolonas	14 (17,5%)	4 (8,7%)	0,27	2,23
Outros <sup>*</sup>	42 (52,5%)	21 (45,6%)	0,58	1,32
<b>Tempo médio para colonização (dias)</b>	5,8 ± 4,1	5,0 ± 6,5	-	-

<sup>+</sup> Cateter Vascular Central, <sup>++</sup> Sonda Vesical, <sup>+++</sup> Sonda Nasogástrica, <sup>¥</sup> Cefalosporinas, <sup>\*</sup> Cefazolina, Clindamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Fluconazol, Gentamicina, Metronidazol, Nistatina, Rifampicina, <sup>#</sup>  $P \leq 0,05$ .

Tabela 4: Fatores de risco independentes para colonização de orofaringe por ORSA em pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

Variáveis	<i>P</i>	OR	IC
Idade > 60 anos	0,04	3,23	1,06-9,88
Uso prévio de antimicrobianos	0,04	3,31	1,07-10,20
Uso prévio de carbapenêmicos	0,03	3,68	1,10-12,32

#### 4.3-Detecção do genótipo *mecA* e definição da linhagem/clones nas amostras de *S. aureus*

O gene *mecA* foi detectado, por PCR, em estafilococos de cinco pacientes colonizados que evoluíram para PAV, sendo quatro provenientes de isolados clínicos de PAV e cinco de colonização de orofaringe (Figura 2).

Foram selecionados 19 *S. aureus* de 11 pacientes para tipagem molecular, sendo 11 isolados de amostras de PAV e oito de colonização da orofaringe de pacientes que evoluíram para PAV. A comparação dos perfis eletroforéticos obtidos após macrorrestrição com a enzima *Sma I* e PFGE evidenciou a presença de apenas um clone de ORSA na etiologia de PAV em quatro pacientes (amostras 03, 12, 14 e 17). Estas amostras foram geneticamente relacionadas com as de colonização da orofaringe nestes pacientes (amostras 04, 13, 15 e 18) [Figura 3]. A tipagem molecular demonstrou também a presença de dois clones de OSSA, sendo um com apenas uma amostra (19) e outro mostrando dois subtipos, um mais frequente, com oito amostras (01, 05, 06, 07, 08, 09, 10 e 11) e o segundo representado por apenas uma amostra (16) [Figura 4]. Em sete pacientes a PAV foi causada por OSSA, sendo três PAVs (amostras 05, 07 e 09) com perfis clonais similares aos OSSA isolados da colonização da orofaringe destes pacientes (amostras 06, 08 e 10). Outros três pacientes sem a presença de OSSA na orofaringe desenvolveram PAV por este fenótipo, com duas amostras pertencentes ao mesmo clone, mas de subtipos diferentes (11 e 16) e uma discordante (amostra 19)



[Figura 4]. Em apenas um dos pacientes as amostras obtidas de orofaringe (amostra 02 – ORSA) e de PAV (amostra 01 – OSSA) foram diferentes (Figuras 3 e 4).

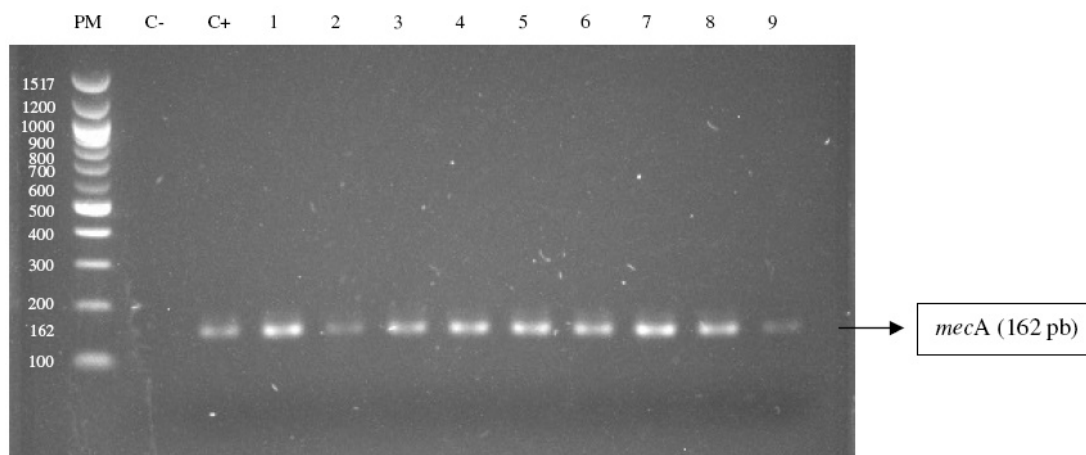


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose do gene *mecA* em *S. aureus* resistentes à oxacilina. Coluna PM: padrão de peso molecular (100 pb ladder, Fermentas), coluna C-: controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923), coluna C+: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591), coluna 1: amostra de colonização de orofaringe do paciente 1, coluna 2: amostra de PAV de paciente 2, coluna 3: amostra de colonização de orofaringe do paciente 2, coluna 4: amostra de PAV do paciente 7, coluna 5: amostra de colonização de orofaringe do paciente 7, coluna 6: amostra de PAV do paciente 8, coluna 7: amostra de colonização de orofaringe do paciente 8, coluna 8: amostra de PAV do paciente 10, coluna 9: amostra de colonização de orofaringe do paciente 10.

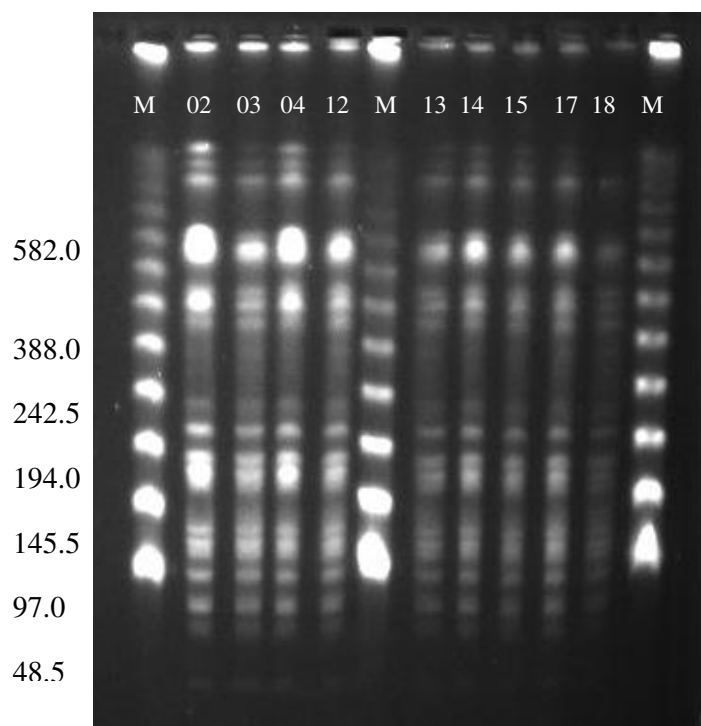


Figura 3: Padrão de macrorrestrição após digestão com *Sma*I e PFGE do DNA cromossômico de nove amostras de ORSA isolados de pacientes da UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010. M - padrão de peso molecular (Lambda ladder PFG marker - Biolabs), coluna 02 – ORSA 02 (colonização de orofaringe) do paciente 1, colunas 03 e 04 – ORSA 03 (PAV) e 04 (colonização de orofaringe) do paciente 2, colunas 12 e 13 – ORSA 12 (PAV) e 13 (colonização de orofaringe) do paciente 7, colunas 14 e 15 – ORSA 14 (PAV) e 15 (colonização de orofaringe) do paciente 8, colunas 17 e 18 – ORSA 17 (PAV) e 18 (colonização de orofaringe) do paciente 10.

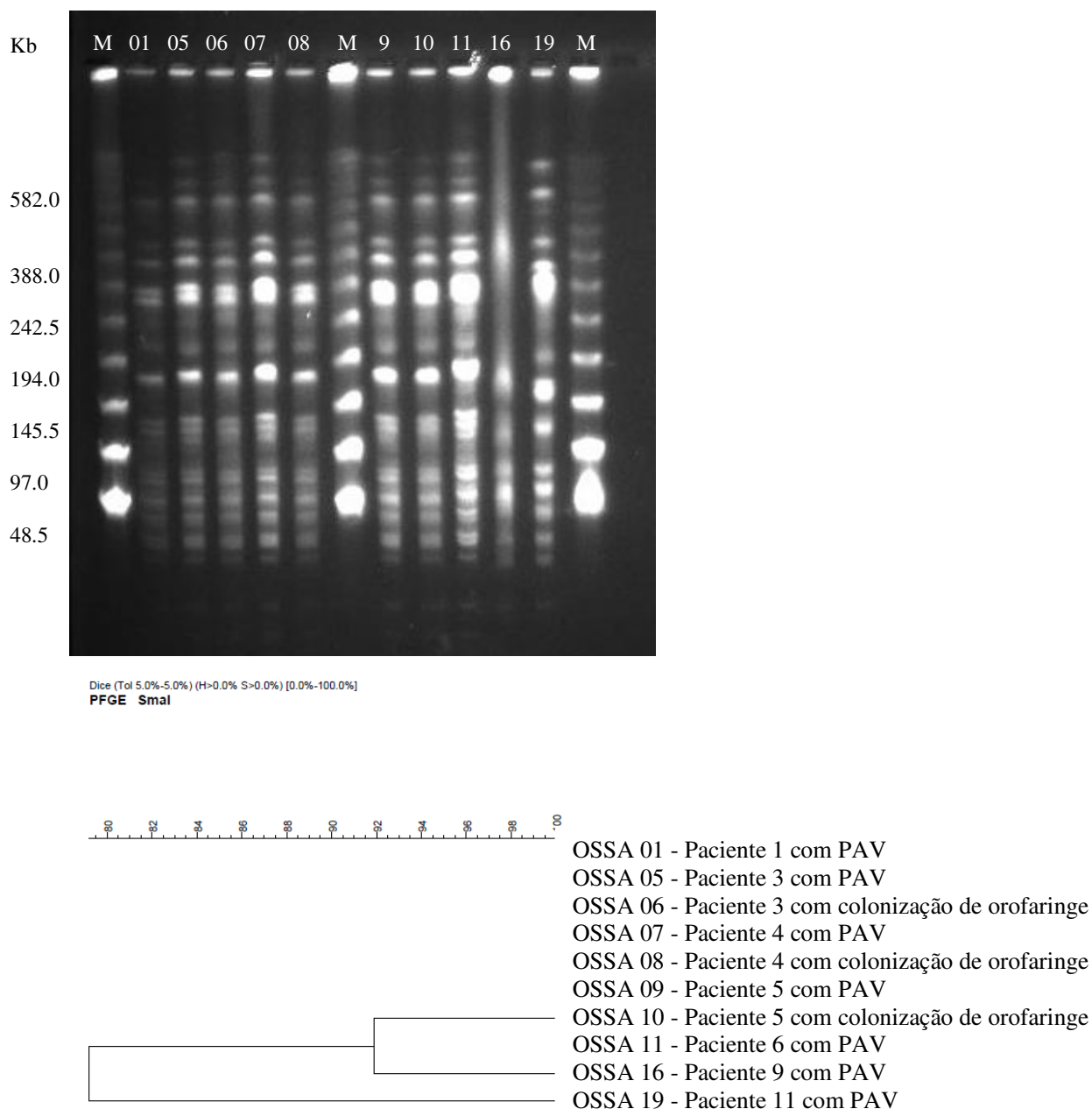


Figura 4: Padrão de macrorrestrição e dendrograma de similaridade genômica após digestão com *SmaI* e PFGE do DNA cromossômico de dez amostras de OSSA. M - padrão de peso molecular (Lambda ladder PFG marker - Biolabs), coluna 01 – OSSA 01 (PAV) do paciente 1, colunas 05 e 06 – OSSA 05 (PAV) e 06 (colonização de orofaringe) do paciente 3, colunas 07 e 08 – OSSA 07 (PAV) e 08 (colonização de orofaringe) do paciente 4, colunas 09 e 10 – OSSA 09 (PAV) e 10 (colonização de orofaringe) do paciente 5, coluna 11 – OSSA 11 (PAV) do paciente 6, coluna 16 – OSSA 16 (PAV) do paciente 9, colunar 19 – OSSA 19 (PAV) do paciente 11.

#### 4.4-Uso de antimicrobianos e relação com a multirresistência

O uso de antimicrobianos foi elevado para todas as classes avaliadas, com destaque para as cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, que tiveram densidade de uso de 551,26 DDDs/1000 pacientes-dia, sobressaindo em relação aos carbapenêmicos (263,57 DDDs/1000 pacientes-dia) e glicopeptídeos (269,56 DDDs/1000 pacientes-dia). A alta densidade de uso de glicopeptídeos foi correlacionada com a colonização de orofaringe pelo ORSA (Pearson  $r = 0,57$  /  $P = 0,02$ ) [Figura 5]. Não foi observada relação significativa entre o uso de antimicrobianos e a etiologia de PAVs, sendo a *P. aeruginosa* e o *A. baumannii* os principais agentes, com destaque para os fenótipos MR aos antibióticos (Tabela 1, Figura 6).

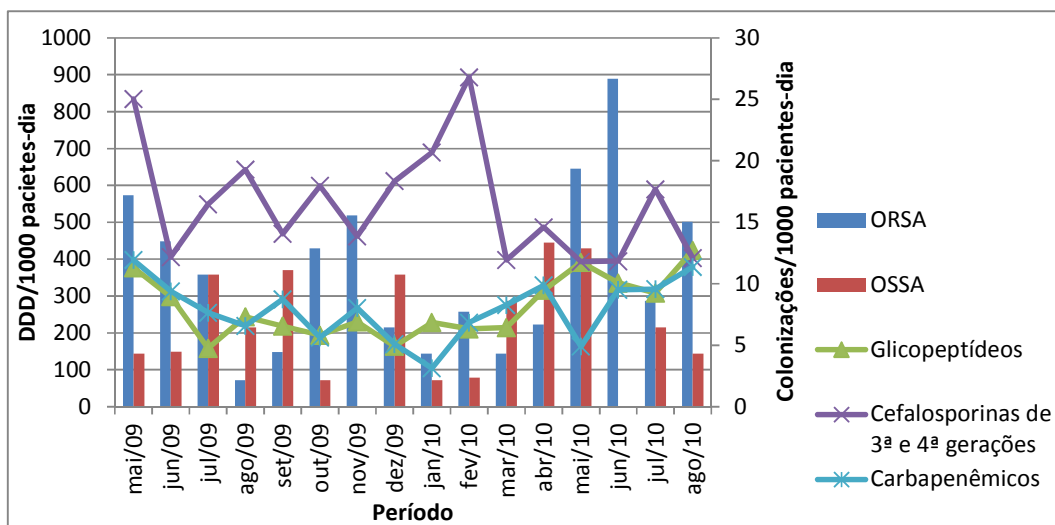


Figura 5: Relação entre a densidade de uso de antimicrobianos e a densidade de colonização de orofaringe por *S. aureus* nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

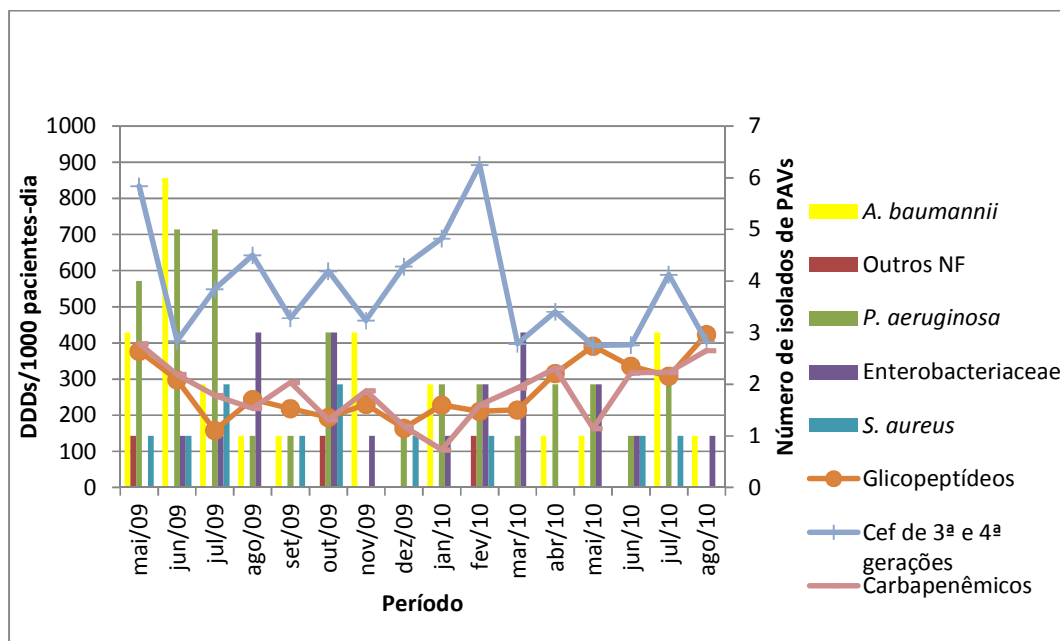


Figura 6: Relação entre a densidade de uso de antimicrobianos e a etiologia de PAVs nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

#### 4.5- Características demográficas e clínicas dos pacientes com PAV por microrganismos multirresistentes

Amostras de microrganismos MR foram isoladas em 43 (47,3%) dos 81 episódios de PAV, sendo que o ORSA representou 36,4% do total de *S. aureus*, 56,2% dos isolados de *P. aeruginosa* foram MR, assim como 54,2% dos de *A. baumannii* e 31,6% daqueles da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 1). Vinte pacientes (24,7%) desenvolveram PAV precoce, sendo seis (30,0%) por patógenos MR e 61 (75,3%) desenvolveram PAV tardia, sendo 34 (55,7%) por patógenos MR.

As características dos pacientes que desenvolveram PAV por microrganismos MR ou não-MR são mostradas na Tabela 5. A análise da regressão logística múltipla evidenciou que o risco de PAV por patógenos MR foi mais que duas vezes maior entre pacientes que tiveram um tempo de internação hospitalar maior que sete dias antes do diagnóstico de PAV bem como naqueles que fizeram uso de corticoides, e mais que três vezes maior entre pacientes que fizeram uso prévio de antimicrobianos (Tabela 6).

Tabela 5: Características dos pacientes com PAV por microrganismos multirresistentes ou não-multirresistentes na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

<b>Variáveis</b>	<b>Multirresistentes N=40 (49,4%)</b>	<b>Não- multirresistentes N=41 (50,6%)</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>
<b>Gênero</b>				
Masculino	30 (75,0%)	28 (68,3%)	0,67	1,39
Feminino	10 (25,0%)	13 (31,7%)	0,67	0,72
<b>Idade &gt; 60</b>	13 (32,5%)	10 (24,4%)	0,57	1,49
<b>TIADPAV<sup>‡</sup> &gt; 7 dias</b>	29 (72,5%)	19 (46,3%)	0,03 <sup>#</sup>	3,05
<b>DVMADPAV<sup>*</sup> &gt; 7 dias</b>	26 (65,0%)	18 (43,9%)	0,09	2,37
<b>Procedimentos invasivos</b>				
Traqueostomia	9 (22,5%)	4 (9,8%)	0,06	3,96
CVC <sup>+</sup>	36 (90,0%)	38 (92,7%)	0,71	0,71
SV <sup>++</sup>	38 (95,0%)	40 (97,6%)	0,62	0,47
SNG <sup>+++</sup>	35 (87,5%)	37 (90,2%)	0,74	0,76
Dreno	4 (10,0%)	6 (14,6%)	0,75	0,76
<b>PAV precoce</b>	6 (15,0%)	14 (34,1%)	0,08	0,34
<b>PAV tardia</b>	34 (85,0%)	27 (65,8%)	0,08	2,94
<b>Uso de corticóides</b>	23 (57,5%)	13 (31,7%)	0,03 <sup>#</sup>	2,91
<b>Terapia antimicrobiana prévia</b>	29 (72,5%)	20 (48,8%)	0,05 <sup>#</sup>	2,77
<b>Uso de três ou mais antimicrobianos</b>	14 (35,0%)	12 (29,3%)	0,75	1,30
<b>Diagnóstico de admissão</b>				
Clínico	13 (32,5%)	12 (29,3%)	0,94	1,16
Cirúrgico	11 (27,5%)	7 (17,1%)	0,39	1,84
Trauma	16 (40,0%)	22 (53,7%)	0,31	0,58
<b>Terapia antimicrobiana inapropriada</b>	21 (52,5%)	4 (9,8%)	<0,0001 <sup>#</sup>	10,22
<b>Mortalidade</b>	21 (52,5%)	8 (19,5%)	0,004 <sup>#</sup>	4,56

<sup>‡</sup> Tempo de internação anterior ao diagnóstico de PAV, <sup>\*</sup> Duração da ventilação mecânica anterior ao diagnóstico de PAV, <sup>+</sup> Cateter Vascular Central, <sup>++</sup> Sonda Vesical, <sup>+++</sup> Sonda Nasogástrica, <sup>#</sup>  $P \leq 0,05$ .

Tabela 6: Fatores de risco independentes para PAV causada por microrganismos multirresistentes na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010.

Variáveis	<i>P</i>	OR	IC
Tempo de internação anterior ao diagnóstico de PAV > 7 dias	0,03	2,95	1,09-8,00
Uso de corticóides	0,04	2,73	1,03-7,25
Terapia antimicrobiana prévia	0,02	3,22	1,17-8,84

#### 4.6-Terapia antimicrobiana empírica

Vinte e cinco (30,9%) dos 81 pacientes com diagnóstico clínico de PAV receberam tratamento antimicrobiano empírico inapropriado e 56 (69,1%) foram apropriadamente tratados. O risco de a terapia antimicrobiana empírica ser inapropriada foi mais de 10 vezes maior entre pacientes com PAV por microrganismos MR (21 (84,0%) dos 25 pacientes que foram inapropriadamente tratados), tanto na análise univariada (OR, 10,22; IC 95%, 2,75-41,43;  $P < 0,0001$ ), quanto na multivariada (OR, 10,22; IC 95%, 3,07-34,08;  $P = 0,0002$ ) quando comparado com pacientes que tiveram PAV por microrganismos não-MR. Os seis (30,0%) pacientes com PAV precoce por microrganismos MR estão entre aqueles que receberam terapia antimicrobiana empírica inapropriada. Além disso, o tratamento empírico inapropriado foi significativamente maior naqueles pacientes que tiveram PAV de etiologia polimicrobiana do que quando por um único patógeno (70.0% vs. 25.3%), nas análises univariada (OR, 6,87; IC 95%, 1,38-38,19;  $P = 0,008$ ) e multivariada (OR, 6,87; IC 95%, 1,60-29,42;  $P = 0,009$ ).

#### 4.7-Evolução dos pacientes

O estudo incluiu pacientes com “status” clínico grave, com um escore clínico de gravidade (ASIS) de 4,76 em média. Entretanto a mortalidade em 30 dias foi significativamente maior naqueles com PAV causada por microrganismos MR do que

naqueles por microrganismos susceptíveis [21 (52,5%) vs 8 (19,5%),  $P = 0,01$ ] (Figura 7) e no grupo que recebeu terapia antimicrobiana empírica inapropriada do que naquele submetido a tratamento empírico apropriado [13 (23,2%) vs 16 (64,0%),  $P = 0,0004$ ] (Figura 8).

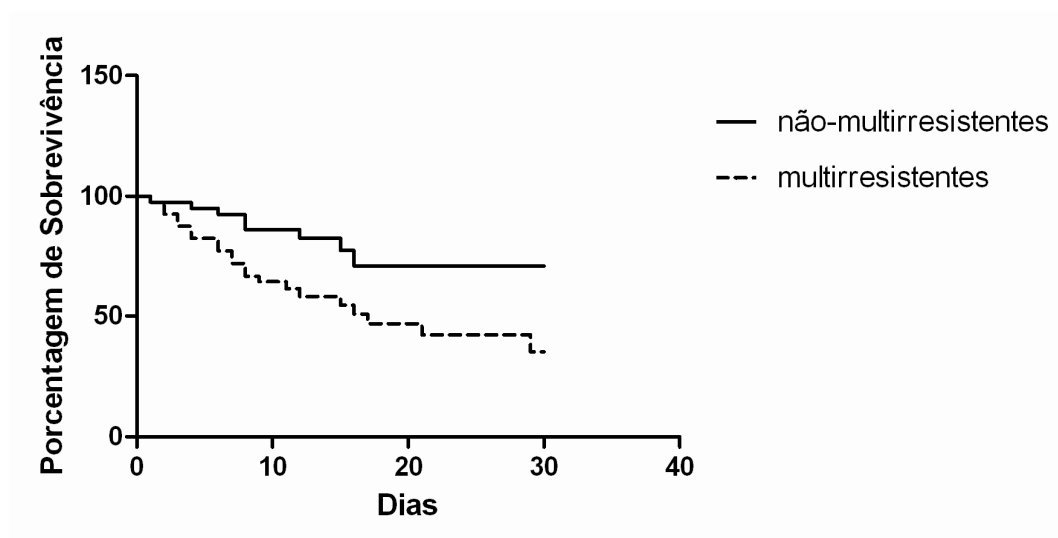


Figura 7: Análise da mortalidade hospitalar no período de 30 dias após o diagnóstico de PAV por patógenos multirresistentes ou não-multirresistentes em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010. Curva de sobrevivência preparada usando estimativa de Kaplan-Meier e comparada usando o teste log rank ( $P = 0,01$ ).



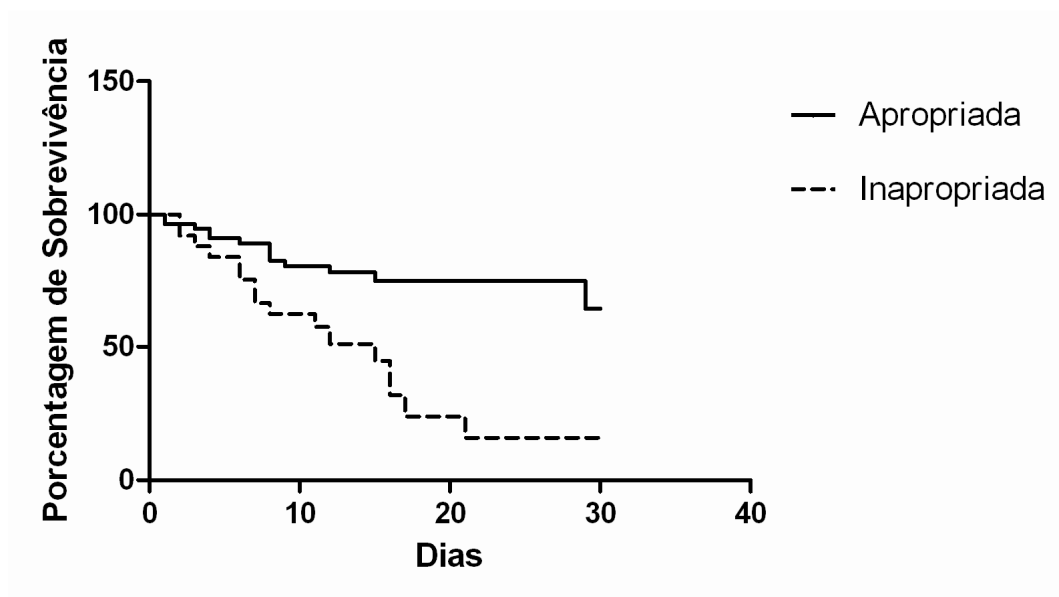


Figura 8: Análise da mortalidade hospitalar no período de 30 dias após o diagnóstico de PAV em pacientes que receberam terapia antimicrobiana empírica apropriada ou inapropriada na UTI de adultos do HC-UFU, no período de maio/2009 a agosto/2010. Curva de sobrevivência preparada usando estimativa de Kaplan-Meier e comparada usando o teste log rank ( $P = 0,0004$ ).

## 5-DISCUSSÃO

A taxa de colonização da mucosa de orofaringe por *S. aureus* observada neste estudo nos pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU foi de 36,4%, com 63,5% correspondendo ao ORSA e 36,5% ao OSSA. Estudos de Garrouste-Orgeas et al. (1997) e Nilsson e Ripa (2006) relataram taxas semelhantes de 38,4% e 40,0% para *S. aureus*, respectivamente. Em pacientes sob ventilação mecânica internados em UTIs, a microbiota normal é alterada principalmente em função da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos (PATERSON, 2004; JOSEPH et al., 2010a), e da produção aumentada de proteases que levam a uma redução de imunoglobulina A e fibronectina na mucosa, resultando na diminuição da adesão de microrganismos da microbiota normal, favorecendo a adesão de *S. aureus* e bacilos gram-negativos, como os representantes da família *Enterobacteriaceae* e os não-fermentadores, com destaque para *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (SAFDAR, CRNICH e MAKI, 2005; JOSEPH et al., 2010).

Para o desenvolvimento de pneumonia, microrganismos potencialmente patogênicos devem atingir o espaço alveolar e invadir o parênquima pulmonar. Naquelas de natureza hospitalar, o principal mecanismo é a microaspiração de secreções da orofaringe (CAVALCANTI et al., 2005; SAFDAR, CRNICH e MAKI, 2005). Neste estudo, 25,3% dos pacientes sob ventilação mecânica desenvolveram PAV, sendo 12,3% de etiologia polimicrobiana e 87,7% causadas por um único microrganismo. Entre os pacientes colonizados por *S. aureus*, a evolução para PAV foi de 5,5%, ao contrário de apenas 1,8% nos não colonizados ( $P > 0,05$ ). Considerando os indivíduos colonizados pelos fenótipos ORSA e OSSA, 5,0% e 6,5% desenvolveram PAV, respectivamente, ao contrário de 0% e 1,3% ( $P = 0,003$  /  $P = 0,05$ ) daqueles não colonizados por estes fenótipos, respectivamente. No total de PAVs diagnosticadas, *S. aureus* foi isolado em apenas 13,6%, sendo que ORSA foi encontrado em apenas 4,9% dos episódios.

Em um estudo multicêntrico recente, incluindo 1290 pacientes em UTIs de hospitais das Américas Central e do Sul, 60,3% tiveram algum tipo de infecção, com predomínio (66,0%) da pneumonia. As bactérias gram-negativas foram responsáveis por 70,9% destas pneumonias, com ORSA causando apenas 10,4% delas (VINCENT et al., 2009). Dados recentes do “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network”

mostram que seis países europeus apresentaram tendências decrescentes na proporção de ORSA entre *S. aureus* isolados de infecções graves no período de 2006 a 2009, provavelmente relacionadas com esforços contínuos para conter a disseminação de ORSA em hospitais e demais estabelecimentos de saúde (STRUELENS e MONNET, 2010). Em três UTIs na França a aquisição de ORSA foi reduzida de 7,0% para 3,0% através de múltiplas intervenções, incluindo vigilância ativa através de culturas constantes, precauções de contato e uso de álcool na higienização das mãos (LUCET et al., 2005; TACCONELLI, 2009). Entretanto, em outros países / regiões, *S. aureus*, particularmente o fenótipo ORSA, permanece endêmico em hospitais gerais como a principal causa de infecções de corrente sanguínea e pneumonia (VINCENT et al., 2009; PADOVEZE et al., 2010; WELTE e PLETZ, 2010). Na nossa investigação, apesar da sua participação menor na etiologia de PAVs quando comparado com os bacilos gram-negativos, as taxas de colonização da orofaringe foram significativas, representando um risco potencial para o desenvolvimento de infecção no paciente, bem como um reservatório importante no hospital.

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, como a oxacilina, é codificada pelo gene *mecA* e a detecção deste gene por PCR é considerada o padrão ouro para detecção, porém poucos laboratórios utilizam métodos genotípicos, sendo os testes de gel-difusão a partir de disco e de triagem em ágar incorporado com oxacilina os mais utilizados para detectar a resistência mediada pelo gene *mecA* (BROWN, 2001). No nosso estudo ela foi caracterizada por PCR nas amostras de cinco pacientes selecionados, correspondendo a quatro isolados clínicos de PAV e cinco isoladas de pacientes colonizados.

A tipagem por técnicas moleculares pode ter poder discriminatório alto para distinção de linhagens entre os isolados e facilita a orientação quanto às práticas de controle e prevenção de infecções. A técnica ideal deve ser rápida, fácil, segura, reprodutível e com poder discriminatório (FOKA et al., 2006). Em relação a *S. aureus*, a técnica de “DNA fingerprint”, com destaque para o PFGE, é considerada o padrão ouro, pelo seu alto poder discriminatório de diferentes linhagens (TENOVER, ARBEIT, e GOERING, 1997; WANG et al., 2002). No nosso trabalho, o PFGE evidenciou a natureza monoclonal das amostras de ORSA isoladas de casos de PAV e de colonização de orofaringe. Entretanto, em função de custos, apenas cinco das amostras correspondentes a isolados de colonização de orofaringe pelo ORSA foram avaliadas

por esta técnica, limitando a sua avaliação epidemiológica na unidade. No Brasil, amostras de ORSA correspondem usualmente ao “Brazilian epidemic clone” (BEC), que pertence ao tipo SCCmec III, e apresentam-se disseminadas intra e inter-hospitalar no país, portanto, endêmico nos hospitais de assistência terciária / gerais (COIMBRA et al., 2000; SOARES et al., 2001; PADOVEZE et al., 2010). Muitos relatos mostraram que uma vez endêmico no hospital, ORSA é de difícil erradicação (COHEN, MORITA e BRADFORD, 1991; KAUFFMAN et al., 1993; ADEYEMI-DORO et al., 1997; WANG et al., 2002), resultando numa taxa de incidência expressiva em infecções hospitalares (SALMENLLINA et al., 2000; WANG et al., 2002). No nosso estudo, com relação a OSSA, observamos a presença de dois clones, sendo um representado por uma só amostra (19) e o outro mostrando dois subtipos, sendo que no mais frequente as amostras evidenciaram 100% de similaridade e no segundo, com apenas uma amostra, a similaridade foi de 91,5% com o primeiro subtipo (não nítido na Figura 4, mas confirmado em outros géis não mostrados). Entre os pacientes que desenvolveram PAV por OSSA, três estavam previamente colonizados por este fenótipo e apresentaram similaridade de 100% entre as amostras dos isolados clínicos PAV e de colonização de orofaringe. Bonten et al. (1995) evidenciaram que a orofaringe, sozinha ou em associação com a traqueia, foi o sítio inicial de colonização para, respectivamente, 13 e 14 microrganismos, de um total de 58 associados a episódios de PAV.

Atualmente, a emergência e disseminação hospitalar de amostras resistentes à oxacilina tornou-se um grave problema terapêutico quando do tratamento de estafilocóccias (IBRAHEN et al., 2008). Pacientes que permanecem internados por períodos maiores que cinco dias apresentam maior risco de aquisição de patógenos multirresistentes e agentes antimicrobianos de amplo espectro são prescritos quando da decisão do tratamento empírico (PELEG e HOOPER, 2010). Em nosso estudo, o tempo médio para colonização por ORSA foi de 5,8 dias e por OSSA de 5,0 dias, com a colonização de orofaringe ocorrendo a partir da primeira semana em 93,7% dos pacientes com o fenótipo resistente e 65,2% daqueles com o fenótipo sensível à oxacilina. Os demais pacientes colonizados por *S. aureus*, 6,3% e 34,8% foram admitidos na unidade com ORSA e OSSA presentes na mucosa da orofaringe, respectivamente.

A idade maior que 60 anos foi considerada fator de risco independente para a aquisição de ORSA ( $P = 0,04$ ), assim como uso prévio de antibióticos ( $P = 0,04$ ) e de

carbapenêmicos ( $P = 0,03$ ). Estes fatores estão relatados na literatura, além dos seguintes: internação hospitalar prévia, duração da internação, admissão na UTI, presença de comorbidades, utilização do cateter venoso central, nutrição parenteral, trabalho excessivo da equipe de enfermagem e baixa adesão à higienização das mãos (GRAFFUNDER e VENEZIA, 2002; GRUNDMANN et al., 2002; HO, 2003; TACCONELLI et al., 2008a; BLOEMENDAAL et al., 2009).

A pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos foi descrita como um fator de risco para a aquisição do ORSA (GRAFFUNDER e VENEZIA, 2002; MARSHALL et al., 2004; BLOEMENDAAL et al., 2009), sendo que tanto seu uso prévio como durante a internação na UTI está relacionado com um aumento nas infecções por este microrganismo (WASHIO, 1997; WASHIO et al., 1997; ONORATO, BORUCKI e BAILARGEON, 1999; BLOEMENDAAL et al., 2009). Um estudo de meta-análise mostrou que indivíduos expostos à terapia antimicrobiana tem quase duas vezes mais chances de adquirirem ORSA do que os não expostos e este risco é quase três vezes maior quando do uso de fluoroquinolonas e glicopeptídeos (TACCONELLI et al., 2008a). Em investigação realizada na Irlanda do Norte, Aldeyab et al. (2008) evidenciaram variações temporais significativas nas taxas de incidência de ORSA após alterações no uso (DDDs) de fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplo espectro, macrolídeos e amoxicilina / ácido clavulânico, através de um modelo de análise estatística multivariada. No nosso estudo, o uso de antibióticos foi alto quando comparado com dados americanos e europeus (MEYER et al., 2003; NISS, 2004), principalmente o de cefalosporinas de amplo espectro e a alta densidade de uso de glicopeptídeos na UTI foi relacionada significativamente com a aquisição do ORSA pelos pacientes, assim como o uso prévio de carbapenêmicos. Além disso, pacientes que fizeram uso prévio de fluoroquinolonas apresentaram-se duas vezes mais susceptíveis à aquisição deste microrganismo ( $P > 0,05$ ). A necessidade de melhorar o uso de antibióticos é urgente no mundo todo. Os “Guidelines” da “Society of Hospital Epidemiologists of America” e da “Infectious Diseases Society of America” recomendam que é preciso haver uma grande difusão de programas de gerenciamento do uso de antibióticos em unidades de saúde (DELLIT, OWENS e MCGOWAN, 2007; TACCONELLI, 2009a). Entretanto, as mudanças na política de uso de antibióticos nos hospitais representam um desafio de grande complexidade, pois há muitos determinantes afetando o seu uso e a sua grande diversidade mostra que as medidas ou

estratégias para a melhora do uso de antibióticos devem ser igualmente diversas (HULSCHER, GROL e VAN DER MEER, 2010).

No presente estudo, amostras de microrganismos MR foram isoladas em 47,3% dos episódios de PAV. A exposição prévia a antibióticos, tempo de internação anterior ao diagnóstico de PAV maior que sete dias e uso de corticoides foram fatores de risco independentes para PAV pelos microrganismos MR. Estes fatores são similares àqueles relatados na literatura, além dos seguintes: tempo prolongado de ventilação mecânica e internação prévia em UTI (TROUILLET et al., 1998; ZAVASCKI et al., 2006; DEPUYDT et al., 2008; SHENG et al., 2010; PARK et al., 2011; ULLDEMOLINS et al., 2011). A história de terapia antimicrobiana prévia tem um efeito importante na ecologia da microbiota do paciente, favorecendo a colonização / infecção por amostras resistentes de microrganismos potencialmente patogênicos. Adicionalmente, o tempo de internação prolongado também aumenta a probabilidade de colonização por bactérias resistentes, que pode resultar em infecções graves subsequentes (RELLO et al., 1993; TROUILLET et al., 1998; TACCONELLI et al., 2008; ULLDEMONLINS et al., 2011). A emergência das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e AmpC acarretou no uso aumentado de carbapenêmicos, antibióticos considerados a última opção e que podem contribuir para a emergência de bacilos Gram-negativos MR, sobretudo de não-fermentadores (ISTURIZ, 2008). Em nosso estudo, 56,2% dos isolados de *P. aeruginosa* e 54,2% dos de *A. baumannii* foram MR. As opções terapêuticas são extremamente reduzidas para o tratamento de infecções hospitalares por bacilos gram-negativos MR, dificultando a conduta dos clínicos quando da terapêutica empírica em infecções graves e atualmente já ocorrem situações em que não há antibióticos efetivos para tratar estas infecções (CARLET et al., 2011).

Assim, em nossa investigação, a terapia antimicrobiana empírica foi inapropriada em 30,9% dos pacientes com PAV. Resultados semelhantes foram descritos no estudo de Willemsen et al. (2007), onde esta terapia foi considerada inapropriada em 351 (37,4%) de um total de 938 pacientes e no de Teixeira et al. (2007), este em Porto Alegre - RS, quando 69 (45,7%) de 151 pacientes com PAV receberam tratamento antimicrobiano inapropriado. A presença de microrganismos MR ou não esperados diminui a probabilidade de acerto na escolha do antibiótico apropriado para a terapia empírica (TEIXEIRA et al., 2007, WELTE e PLETZ, 2010; ULLDEMOLINS et al., 2011). Nós evidenciamos que PAVs por bactérias MR e de

etiologia polimicrobiana são fatores de risco independentes para o tratamento empírico inapropriado, o qual foi significativamente relacionado com uma mortalidade hospitalar aumentada. A terapia antimicrobiana empírica inapropriada foi maior (52,5%) nos pacientes com PAV por patógenos MR do que naqueles cujos agentes foram patógenos não-MR (9,8%), assim como em indivíduos com PAV polimicrobiana (70,0%), versus 25,3% quando monomicrobiana. Embora a maioria dos casos de PAV por microrganismos MR ocorra tardiamente, 30,0% dos nossos pacientes com PAV precoce receberam terapia antimicrobiana empírica inapropriada devido a patógenos MR. Estes achados podem ser explicados pelo fato de que muitos destes pacientes foram admitidos em outras alas do hospital e previamente expostos a antibióticos, ou tinham história de hospitalização anterior recente ou foram transferidos de outros hospitais, como relatado por alguns autores (FRIEDMAN et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2007; ULLDEMOLINS et al., 2011).

Os antibióticos de largo espectro são usados quando do tratamento empírico inicial em pacientes internados em UTIs, contribuindo com o aumento da pressão para a seleção de microrganismos resistentes (JOFFE et al., 2008). Atualmente, as recomendações dos principais “guidelines” são: descalonamento desta terapia inicial quando da definição laboratorial do agente etiológico, visando estreitar o espectro de ação do antibiótico, e diminuir a duração do tempo de tratamento (HOFFKËN e NIEDERMAN, 2002; ATS, 2005; JOFFE et al., 2008). Na nossa investigação, foram prescritos três ou mais antibióticos empiricamente para aproximadamente um terço (32,1%) dos pacientes, sem adoção do descalonamento após o conhecimento do resultado microbiológico. Essa conduta contribui para a emergência de microrganismos MR, como relatado na literatura (TROUILLET et al., 1998; KOLLEF, 2005b; WAELE et al., 2010).

A escolha do esquema antimicrobiano empírico inicial para o tratamento de PAVs e outras infecções graves tem importância crítica na evolução clínica dos pacientes, particularmente no que diz respeito à mortalidade hospitalar, especialmente naqueles episódios por microrganismos resistentes a antibióticos (KOLLEF et al., 2006; CHANG et al., 2011). A terapia apropriada, precoce e agressiva, dirigida contra os microrganismos mais prováveis, de acordo com dados epidemiológicos locais, é importante para otimizar o manejo destas infecções e está associada a taxas de mortalidade reduzidas (RELLO et al., 1997; LUNA et al., 1997; HOFFKËN e

NIEDERMAN, 2002; MASTERNON, 2007; CHANG et al., 2011). Em nosso estudo, a mortalidade hospitalar total no prazo de 30 dias foi significativamente maior em pacientes com PAV por microrganismos MR aos antibióticos assim como no grupo que recebeu tratamento antimicrobiano empírico inapropriado. Depuydt et al. (2008) relataram resultados similares, com a taxa de mortalidade em 30 dias significativamente maior no grupo de pacientes com PAV por microrganismos MR do que naquele por microrganismos não-MR (37,0% vs. 20,0%;  $P = 0,02$ ). A terapia antimicrobiana empírica inapropriada afeta de maneira expressiva a morbidade e a mortalidade em pacientes hospitalizados (ULLDEMOLINS et al., 2011). Estudo multicêntrico internacional avaliou os efeitos da mesma na mortalidade e no tempo de internação de pacientes com infecções graves, concluindo que a mortalidade total em 30 dias foi significativamente maior em pacientes que receberam tratamento inicial inapropriado (20,1% vs. 11,8%;  $P = 0,001$ ), e que o tempo de internação aumentou por mais que dois dias ( $P = 0,02$ ) (FRASER et al., 2006). Outros trabalhos mostraram que o tratamento empírico inapropriado de PAVs esteve associado com um pior prognóstico (KUTI, PATEL e KOLEMAN, 2008; GARCIN et al., 2009; ULLDEMOLINS et al., 2011). No Brasil, Teixeira et al. (2007) mostraram que bactérias MR foram a principal variável quando da avaliação da terapia antimicrobiana empírica inapropriada, significativamente associada com a mortalidade em 28 dias.

Nosso estudo tem algumas limitações relatadas a seguir: primeiro, foi realizado em um único hospital de forma que os resultados podem ser atribuídos a variáveis específicas desta instituição, implicando em um viés na seleção de pacientes e em algumas práticas institucionais; segundo, o número de pacientes com PAVs por *S. aureus* foi pequeno; terceiro, os determinantes de multirresistência foram identificados usando um estudo caso-controle, sendo os pacientes com PAV por microrganismos não-MR os controles e não pacientes sob risco de desenvolver PAV. Como a exposição aos antibióticos é provável de resultar na supressão do crescimento de bactérias sensíveis, os controles utilizados na investigação podem ter recebido menos antibióticos do que os pacientes sob risco de desenvolver PAV, resultando numa superestimação da associação entre exposição a antibióticos e multirresistência (HARRIS et al., 2001; DEPUYDT et al., 2008).



## 6-CONCLUSÃO

- A mucosa da orofaringe de pacientes adultos sob ventilação mecânica apresentou colonização expressiva por *S. aureus*, predominantemente por amostras resistentes à oxacilina, enquanto a incidência de PAVs por este microrganismo foi baixa, inclusive quando comparada à de bacilos gram-negativos;
- Foi observada relação significativa entre a colonização e o risco de desenvolvimento de PAV tanto pelo ORSA quanto pelo OSSA;
- O gene *mecA* foi detectado, por PCR, em todos estafilococos resistentes à oxacilina investigados;
- A tipagem molecular mostrou que a presença de *S. aureus* na UTI caracterizou-se pela policlonalidade e evidenciou a relação entre PAV e colonização prévia da mucosa de orofaringe por este microrganismo;
- Idade maior que 60 anos, terapia antimicrobiana prévia e uso prévio de carbapenêmicos foram fatores de risco independentes para a colonização por ORSA;
- O consumo de antibióticos foi elevado quando comparado com UTIs americanas e europeias, principalmente de cefalosporinas de amplo espectro, e a alta densidade de uso de glicopeptídeos foi correlacionada com a colonização de orofaringe dos pacientes por ORSA;
- Tempo de internação hospitalar maior que sete dias, uso de corticoides e exposição prévia a antibióticos foram fatores de risco independentes para PAV por microrganismos MR;
- O tratamento antimicrobiano empírico foi inadequado em 30,9% dos pacientes com PAV, sobretudo naquelas causadas por microrganismos MR (84,0%) e de etiologia mista (70,0%);
- A mortalidade total no prazo de 30 dias foi significativamente maior nos pacientes com PAV por amostras MR e naqueles que receberam terapia antimicrobiana empírica inadequada;
- A importância das PAVs em UTIs de hospitais de países em desenvolvimento com poucos recursos na área de saúde hospitalar é clara, fazendo-se necessário

mais e melhores estudos epidemiológicos, além de pesquisas sobre estratégias mais fáceis e de menor custo na sua prevenção.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI-DORO, F. A. Living with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 7-year experience with endemic MRSA in a university hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 18, p. 765-767, 1997.

ALDEYAB, M. A. et al. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p. 593-600, 2008.

AL-DORZI, H. M. et al. The results of a 6-year epidemiologic surveillance for ventilator-associated pneumonia at a tertiary care intensive care unit in Saudi Arabia. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 9, p. 794-799, 2012.

ALP, E. et al. Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in intensive care units: a prospective study. **Ann Clin Microb Antimicrob**, v. 3, p. 17, 2004.

ALP, E.; VOSS, A. Ventilator Associated Pneumonia and Infection Control. **Ann Clinic Microbiol Antimicrob**, v. 5, n. 7, doi: 10.1186/1476-0711-5-7, 2006.

APPELGREN, P. et al. Risk factors for nosocomial intensive care infection: a long-term prospective analysis. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 45, p. 710-719, 2001.

ATS – American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, p. 388-416, 2005.

BASELSKI, V.; WUNDERINK, R. G. Bronchoscopic Diagnosis of Pneumonia. **Clin Microb Rev**, v. 7, n. 4, p. 533-558, 1994.

BARAN, G. et al. Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Int J Infect Dis**, v. 12, p. 16-21, 2008.

BAUER, T. T. et al. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, and microbiology. **Semin Respir Infect**, v. 15, p. 272-279, 2000.

BERALDO, C. C.; ANDRADE, D. Oral hygiene with chlorhexidine in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 9, p. 707-714, 2008.

BERGMANS, D. C. J. J.; BONTEN, M. J. M. Nosocomial Pneumonia. In: MAYHALL, C.G. **Hosp Epidemiol Infect Control**, 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams, cap. 22, p. 311-339, 2004.

BIGNARDI, G. E.; LOWES, S. MRSA screening: throat swabs are better than nose swabs. **J Hosp Infect**, v. 71, p. 373-374, 2009.

BLOEMENDAAL, A. L. A. et al. Acquisition and Cross-Transmission of *Staphylococcus aureus* in European Intensive Care Units. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 30, n. 2, p. 117-124, 2009.

BONTEN, M. J. M. et al. The role of intragastric acidity and stress ulcer prophylaxis on colonization and infection in mechanically ventilated patients: a stratified, randomized, double-blind study of sucralfate versus antacids. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 152, p. 1825-1834, 1995.

BOYCE, J. M. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. **J Hosp Infect**, v. 48, Suppl A, p. S9-S14, 2001.

BROUGHTON, W. A.; FONER, B. J.; BASS, J. B. Jr. Nosocomial pneumonia: trying to make sense of the literature. **Postgrad Med**, v. 99, p. 221-242, 1996.

BROWN, D. F. Detection of methicillin / oxacillin resistance in staphylococci. **J Antimicrob Chemoth**, v. 48, p. 65-70, 2001.

CARLET, J. et al. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. **Lancet**, v. 378, p. 369-371, 2011.

CAVALCANTI, M.; VALENCIA, M.; TORRES, M. Respiratory nosocomial infections in the medical intensive care unit. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 292-391, 2005.

CHANG, H.C. et al. Mortality risk factors in patients with *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **J Formos Med Assoc**, v. 110, p. 564-571, 2011.

CHASTRE, J.; FAGON, J. Ventilator-associated Pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. 867-903, 2002.

CHEN, C. -B.; CHANG, H. -C.; HUANG, Y. -C. Nasal meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among intensive care unit hospitalized adult patients in a Taiwanese medical centre: one time-point prevalence, molecular characteristics and risk factors for carriage. **J Hosp Infect**, v. 74, p. 238-244, 2010.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Nineteenth Informational Supplement**. M100-S19, CLSI, Wayne, 2009.

COHEN, S. H.; MORITA, M. M. e BRADFORD, M. A seven-year experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Am J Med**, v. 91, Suppl. 3B, p. S233-S237, 1991.

COIMBRA, M. V. S. et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. **Pathol Soc Great Brit Irel**, v. 49, p. 187-192, 2000.

CRAVEN, D. E.; HUDCOVA, J.; LEI, Y. Diagnosis of Ventilator-Associated Respiratory Infections (VARI): Microbiologic Clues for Tracheobronchitis (VAT) and Pneumonia (VAP). **Clin Chest Med**, v. 32, p. 547-557, 2011.

CURTIS, C.; MARRIOTT, J.; LANGLEY, C. Development of a prescribing indicator for objective quantification of antibiotic usage in secondary care. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, p. 529-533, 2004.

DELLIT, T. H.; OWENS, R. C.; MCGOWAN, J. E. Jr. Infectious Diseases Society of America and Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. **Clin Infect Dis**, v. 44, p. 159-177, 2007.

DEPUYDT, P. O. et al. Determinant and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated pneumonia. **Crit Care**, v. 12, n. 6, doi: 10.1186/cc7119, 2008.

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol**. v. 8, n. 6, p. 747-763, 2008.

DIAZ, O.; DIAZ, E.; RELLO, J.; Risk factors for pneumonia in the intubated patient. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, p. 697-705, 2003.

DHILLON, R.; CLARK, J. Infection in intensive care unit (ICU). **Cur Anaesth Crit Care**, v. 20, n. 4, p. 175-182, 2009.

DODEK, P. et al. Evidence-Based Clinical Practice Guideline for the Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia. **Ann Intern Med**, v. 141, p. 305-313, 2004.

EDWARDS, J. R. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. **Am J Infect Control**, v. 37, n. 10, p. 783-805, 2009.

ERBAY, R. H. et al. Costs and risk factors for ventilator-ventilator associated pneumonia in a Turkish University Hospital's Intensive Care Unit: A case-control study. **BMC Pulmo Med**, v. 4, n. 3, doi:10.1186/1471-2466-4-3, 2004.

FEIZABALDI, M. M. et al. Developed of a modified DNA extraction method for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Staphylococcus aureus* and enterococci without using lysostaphin. **J Microbial Meth.** v. 84, p. 144-146, 2011.

FERRARA, A. M. Tratament of hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Antimicrob Agents**, doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.02.011, 2007.

FLANDERS, S. A.; COLLARD, H. R.; SAINT, S. Nosocomial pneumonia: State of the science. **Am J Infect Control**, v. 34, p. 84-93, 2006.

FLEMING, C. A.; BALAGUERA, H. U.; CRAVEN, D. E. Risk factors for nosocomial pneumonia. **Med Clin North Am**, v. 85, p. 1545-1563, 2001.

FOKA, A. et al. Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. **Clin Microb Infect**, v. 12, p. 1230-1236, 2006.

FRASER, A. et al. Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. **Am J Med**, v. 119, n. 11, p. 970-976, 2006.

FRIEDMAN, N. D. et al. Healthcare-associated bloodstream infection in adults: a reason to change the accepted definitions of community-acquired infections. **Ann Intern Med**, v. 137, p. 791-797, 2002.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram-positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the “SENTRY” program (2005-2008). **Braz J Infect Dis**, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

GARCIN, F. et al. Non-Adherence to guidelines: an avoidable cause of failure of empirical antimicrobial therapy in the presence of difficult-of-treat bacteria. **Intensive Care Med**, v. 36, n. 1, p. 75-82, 2009.

GARROUSTE-ORGEAS, M. et al. Oropharyngeal or Gastric Colonization and Nosocomial Pneumonia in Adult Intensive Care Unit Patients. A Prospective Study Based on DNA Analysis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, p. 1647-1655, 1997.

GEORGE, D. L. et al. Epidemiology of ventilator-acquired pneumonia based on protected bronchoscopy sampling. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, p. 1839-1847, 1998.

GOULD, I. M. Controversies in infection: infection control or antibiotic stewardship to control healthcare-acquired infection? **J Hosp Infect**, v. 73, p. 386-391, 2009.

GRAFFUNDER, E. M.; VENEZIA, R. A. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 999-1005, 2002.

GRUNDMANN, H. et al. Risk factor for the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an adult intensive care unit: fitting a model to the data. **J Infect Dis**, v. 185, p. 481-488, 2002.

HARRIS, A. D. et al. Methodological principles of case-control studies that analysed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. **Clin Infect Dis**, v. 32, p. 1055-1061.



HO, P. L. For the Hong Kong Intensive Care Unit Antimicrobial Resistance Study (HK-ICARE) Group. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ceftazidime-resistant Gram-negative bacilli, and Vancomycin-resistant enterococci before and after intensive care unit admission. **Crit Care Med**, v. 31, p. 1175-1182, 2003.

HÖFFKEN, G.; NIEDERMAN, M. S. The Importance of a De-escalating Strategy for Antibiotic Treatment of Pneumonia in the ICU. **Chest**, v. 122, p. 2183-2196, 2002.

HSUEH, P. R.; CHEN, W. H.; LUH, K. T. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, p. 463-472, 2005.

HULSCHER, M. E. J. L.; GROL, R. P. T. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach. **Lancet Infect Dis**, v. 10, p. 167-175, 2010.

HUXLEY, E. J. Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. **Am J Med**, v. 64, n. 4, p. 564-568, 1978.

IBRAHEM, S. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. **Clin Microb Infect**, v. 14, p. 1020-1027, 2008.

IBRAHIM, E. H. et al. The occurrence of ventilator-associated pneumonia in a community hospital: Risk factors and clinical outcomes. **Chest**, v. 120, p. 555-561, 2001.

ISTURIZ, R. Global resistance trends and the potential impact on empiric therapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, Suppl. 4, p. S201-S206, 2008.

JACOBY, T. S. et al. Impact of hospital-wide infection rate, invasive procedures use and antimicrobial consumption on bacterial resistance inside an intensive care unit. **J Hosp Infect**, v. 75, p. 23-27, 2010.

JOFFE, A. R. et al. The safety of target antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia: A multicenter observational study. **J Crit Care**, v. 23, p. 82-90, 2008.

JOSEPH, N. M. et al. Ventilator-associated pneumonia: role of colonizers and value of routine endotracheal aspirate cultures. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 723-729, 2010.

JOSEPH, N. M. et al. Ventilator-associated pneumonia: A review. **Eur J Intern Med**, v. 21, n. 5, p. 360-368, 2010a.

KAUFFMAN, C. et al. Attempt to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a long-term-care facility with use of mupirocin ointment. **Am J Med**, v. 94, p. 371-378, 1993.

KIENINGER, A. N.; LIPSETT, P. A. Hospital-Acquired Pneumonia: Pathophysiology, diagnosis and treatment. **Surg Clin N Am**, v. 89, p. 439-461, 2009.

KLUYTMANS, J.; BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.

KOLLEF, M. H. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. **Clin Infect Dis**, v. 31, Suppl. 4, p. S131-S138, 2000.

KOLLEF, M. H. The importance of antimicrobial resistance in hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. **Cur Anaesth Crit Care**, v. 16, p. 209-219, 2005.

KOLLEF, M. H. What Is Ventilator-Associated Pneumonia and Why Is It Important? **Respir Care**, v. 50, n. 6, p. 714-724, 2005a.

KOLLEF, M. H. Antibiotic management of ventilator-associated pneumonia due to antibiotic-resistant gram-positive bacterial infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 24, n. 12, p. 794-803, 2005b.

KOLLEF, M. H. et al. Clinical characteristics and treatment patterns among patients with ventilator-associated pneumonia. **Chest**, v. 129, n. 5, p. 1210-1218, 2006.

KONEMAN, E. W. et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido, 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1760, 2008.

KUTI, E. L.; PATEL, A. A.; COLEMAN, C. I. Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator associated pneumonia and blood stream infection: A meta-analysis. **J Crit Care**, v. 23, p. 91-100, 2008.

LEROY, O. et al. Risk Factors for Antimicrobial-Resistance Causative Pathogens in Critically Ill Patients. **Chest**, v. 123, p. 2034-2042, 2003.

LOBDELL, K. W.; STAMOU, S.; SANCHEZ, J. A. Hospital-Acquired Infections. **Surg Clin N Am**, v. 92, p. 65-77, 2012.

LUCET, J. C. et al. Successful long-term program for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units. **Intensive Care Med**, v. 31, p. 1051-1057, 2005.

LUNA, C. M. et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. **Chest**, v. 111, p. 676-683, 1997.

LUZAR, M. A. Exit-site infection in continuous ambulatory peritoneal dialysis: a review. **Perit Dial Int**, v. 11, p. 333-340, 1991.

MAGNOTTI, L. J. et al. Causative Pathogens Dictates Optimal Duration of Antimicrobial Therapy for Ventilator-Associated Pneumonia in Trauma Patients. **J Am Coll Surg**, v. 212, n. 4, p. 476-484, 2011.

MAGRET, M. et al. Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study. **Crit Care**, v. 15, n. 1, R62, 2011.

MARQUETTE, C. H. et al. Diagnostic tests for pneumonia in ventilated patients: prospective evaluation of diagnostic accuracy using histology as a diagnostic gold standard. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, p. 1878-1888, 1995.

MARSHALL, C. et al. Risk factors for acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by trauma patients in the intensive care unit. **J Hosp Infect**, v. 57, p. 245-252, 2004.

MARSHALL, C.; SPELMAN, D. Is throat screening necessary to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in patients upon admission to an intensive care unit? **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 3855, 2007.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 17, n. 9, p. 595-604, 1996.

MASTERTON, R. The place of guidelines in hospital-acquired pneumonia. **J Hosp Infect**, v. 66, p. 116-122, 2007.

MCGOWAN, J. E. Jr. Is antimicrobial resistance in hospital microorganisms related to antibiotic use? **Bull NY Acad Med**, v. 63, p. 253-268, 1987.

MEDFORD, A. L. R. et al. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia. **J Crit Care**, v. 24, p. 473e1-473e6, 2009.

MERTZ, D. et al. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis**, v. 45, p. 475-477, 2007.

MEYER, E. et al. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Infection**, v. 31, n. 4, p. 208-215, 2003.

MOREIRA, M. R. et al. Consumo de Antibióticos e Etiologia de Pneumonia Associada à Ventilação em Pacientes Internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. **Rev Panamericana de Infectologia**, v. 11, n. 1, p. 11-16, 2009.

MUÑOZ, P. et al. Nasal carriage of *S. aureus* increases the risk of surgical site infection after major heart surgery. **J Hosp Infect**, v. 68, p. 25-31, 2008.

NAFZIGER, D. A.; WIBLIN, R. T. Nosocomial pneumonia. In: WENZEL, R. P. **Prevention and control of Nosocomial Infections**. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 22, p. 312-328, 2003.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am J Infect Control**, v. 32, p. 470-485, 2004.

NETLEMAN, M. D. Global aspects of infection control. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 14, p. 646-648, 1993.

NICASIO, A. M. et al. Pharmacodynamic-based clinical pathway for empiric antibiotic choice in patients with ventilator-associated pneumonia. **J Crit Care**, v. 25, n. 1, p. 69-77, 2010.

NIEDERMAN, M. S. The Clinical Diagnosis of Ventilator-Associated Pneumonia. **Respir Care**, v. 50, n. 6, p. 788-796, 2005.

NILSSON, P.; RIPA, T. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 3334-3339, 2006.

NIVEN, D. J. et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal colonization and influence on outcome in the critically ill. **J Crit Care**. v. 24, n. 4, p. 583-589, 2009.

ONORATO, M.; BORUCKI, M. J.; BAILLARGEON, G. Risk factors for colonization or infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV-positive patients: a retrospective case-control study. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 20, p. 26-30, 1999.

PADOVEZE, M. C. et al. Surveillance Programme for Healthcare Associated Infections in the State of São Paulo, Brazil. Implementation and the first three years' results. **J Hosp Infect**, v. 76, p. 311-315, 2010.

PAPIA, G. et al. Infection in hospitalized trauma patients: incidence, risk factors, and complications. **J Trauma**, v. 47, p. 923-927, 1999.

PARK, D. R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. **Respir Care**, v. 50, n. 6, p. 742-763, 2005.

PARK, Y. S. et al. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. **J Hosp Infect**, v. 79, p. 54-58, 2011.

PATERSON, D. L. "Collateral Damage" from Cephalosporin or Quinolone Antibiotic Therapy. **Clin Infect Dis**, v. 38, Suppl. 4, p. S341-S345, 2004.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **N Engl J Med**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.

PITTET, D.; HARBATH, S. J. The intensive care unit infection. In: BENNET, J.V.; BRACHMAN, P.S. **Hospital Infection**, 4ª edição, Philadelphia, Lippicott-Raven Publishers, p. 381-402, 1998.

PRADE, S. S. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Rev do Controle de Infecção Hospitalar**, v. 2, p. 11-25, 1995.

PUJOL, M. et al. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. **Am J Med**, v. 100, p. 509-516, 1996.

RELLO, J. et al. Impact of previous antimicrobial therapy on the etiology and outcome of ventilator-associated pneumonia. **Chest**, v. 104, n. 4, p. 1230-1235, 1993.

RELLO, J. et al. The Value of Routine Microbial investigation in Ventilator-Associated Pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, p. 196-200, 1997.

RELLO, J. et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. **Chest**, v. 122, n. 6, p. 2115-2121, 2002.

RINGBERG, H. et al. The throat: an important site for MRSA colonization. **Scand J Infect Dis**, v. 38, p. 888-893, 2006.

ROCHA, L. A. et al. Ventilator-Associated Pneumonia in an Adult Clinical-Surgical Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital: Incidence, Risk Factors, Etiology and Antibiotic Resistance. **Braz J Infect Dis**, v. 12, n. 1, p. 80-85, 2008.

ROSENTHAL, V. D. et al. Device-Associated Nosocomial Infections in 55 Intensive Care Units of 8 Developing Countries. **Ann Intern Med**, v. 145, p. 582-591, 2006.

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **Am J Infect Control**, v. 38, p. 95-106, 2010.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance on Brazil. **Clin Infect Dis**, v.52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.

SAFDAR, N.; CRNICH, C. J.; MAKI, D. G. The Pathogenesis of Ventilator-Associated Pneumonia: Its Relevance to Developing Effective Strategies for Prevention. **Respir Care**, v. 50, n. 6, p. 725-739, 2005.

SAIMAN, L. et al. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 24, p. 317-321, 2003.

SALMENLINNA, S. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. **Eur J Clin Microb Infect Dis**, v. 19, p. 101-107, 2000.

SANDIUMENGE, A. et al. Effect of Antibiotic Diversity on Ventilator-Associated Pneumonia Caused by ESKAPE Organisms. **Chest**, v. 140, n. 3, p. 643-651, 2011.

SANTOS, E. F. et al. Use of Antimicrobial Agents in na Intensive Care Unit in a Hospital in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 11, n. 3, p. 355-359, 2007.

SAUAIA, A. et al. Diagnosing pneumonia in mechanically ventilated trauma patients: endotracheal aspirate versus bronchoalveolar lavag. **J Trauma**, v. 35, p. 512-517, 1993.

SHENG, W.H. et al. A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Int J Infect Dis**, v. 14, p. e764-e769, 2010.



SIMOR, A. E. et al. The evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals: 5 years of national surveillance. **Canadian Med Assoc J**, v. 165, n. 1, p. 21-26, 2001.

SOARES, M. J. S. et al. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian Epidemic Clone. **J Med Microbiol**, v. 50, p. 1-11, 2001.

STRUELENS, M. J.; MONNET, D. L. Prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: is Europe winning the fight? **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.31, Suppl. 1, p. S42-S44, 2010.

TACCONELLI, E. et al. Prediction models to identify hospitalized patients at risk of being colonized or infected with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii calcoaceticus* complex. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 5, p. 1130-1137, 2008.

TACCONELLI, E. et al. Does antibiotic exposure increase the risk the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A Systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, p. 26-38, 2008a.

TACCONELLI, E. Screening and isolation for infection control. **J Hosp Infect**, v. 73, p. 371-377, 2009.

TACCONELLI, E. Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings. **Curr Opin Infect Dis**, v. 22, p. 352-358, 2009a.

TAO, L. et al. Impact of a multidimensional approach on ventilator-associated pneumonia rates in a hospital of Shanghai: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **J Crit Care**, v. 27, n. 5, p. 440-446, 2012.

TEIXEIRA, P. J. Z. et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **J Bras Pneumol**, v. 30, n. 6, p. 540-548, 2004.

TEIXEIRA, P. J. Z. et al. Inadequate treatment of ventilator-associated pneumonia: risk factors and impact on outcomes. **J Hosp Infect**, v. 65, p. 361-367, 2007.

TEJADA, A. A. et al. Risk factors for nosocomial pneumonia in critically ill trauma patients. **Crit Care Med**, v. 29, p. 304-309, 2001.

TENOVER, F. C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 407-415, 1994.

TENOVER, F. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 18, p. 426-439, 1997.

THOMPSON, D. S. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* in a general intensive care unit. **J R Soc Med**, v. 97, p. 521-526, 2004.

TORRES, A. et al. Specificity of endotracheal aspiration, protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in mechanically ventilated patients. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, n. 4, p. 952-957, 1993.

TOUFEN JUNIOR, C. et al. Prevalence and rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. **Rev Hosp Clín Faculd Med São Paulo**, v. 58, n. 5, p. 254-259, 2003.

TROUILLET, J. L. et al. Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Potentially Drug-resistant Bacteria. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 2, p. 531-539, 1998.

TSENG, C. C. et al. Impact of clinical severity index, infective pathogens, and initial empiric antibiotic use on hospital mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 7, p. 648-652, 2012.

ULLDEMOLINS, M. et al. Appropriateness is Critical. **Crit Care Clin**, v. 27, p. 35-51, 2011.

VILLARI, P.; SARNATARO, C.; IACUZIO, L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three year period. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 1740-1746, 2000.

VINCENT, J. L. et al. The prevalence of nosocomial infections in intensive care units in Europe. **JAMA**, v. 274, p. 639-644, 1995.

VINCENT, J. L.; Nosocomial infectious in adult intensive-care units. **Lancet**, v. 36, n. 1, p. 2068-2077, 2003.

VINCENT, J. L. et al. International Study of the Prevalence and Outcome of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, 2009.

WAELE, J. J. D. et al. De-escalation after empirical meropenem treatment in the intensive care unit: Fiction or reality? **J Crit Care**, v. 25, n. 4, p. 641-646, 2010.

WANG, J. -T. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. **Diag Microb Infect Dis**, v. 42, p. 199-203, 2002.

WASHIO, M. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in a Japanese elderly care nursing home. **Epidemiol Infect**, v. 119, p. 285, 1997.

WASHIO, M. et al. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in a Japanese geriatric hospital. **Public Health**, v. 111, p. 187-190, 1997.

WELLER, T. M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? **J Hosp Infect**, v. 44, p. 160-172, 2000.

WELTE, T.; PLETZ, M. W. Antimicrobial treatment of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: current and future options. **Internat J Antimicrob Agents**, v. 36, p. 391-400, 2010.

WENZEL, R. P.; PERL, T. M. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. **J Hosp Infect**, v. 31, p. 13-24, 1995.

WERTHEIM, H. F. L., et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 751-762, 2005.

WILLEMSSEN, I. et al. Appropriateness of Antimicrobial Therapy Measured by Repeated Prevalence Surveys. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 3, p. 864-867, 2007.

WHO Collaborating Center for Drug statistics methodology. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC), Classification index with Defined Daily Doses (DDD), Oslo, Norway; 2000 (disponível no site [www.whocc.no](http://www.whocc.no)).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of communicable disease, surveillance and response. **Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide**. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: WHO, 2002.

YEPES, D. et al. Ventilator-associated pneumonia and transfusion, is there really an association? (The NAVTRA study). **BMC Pulm Med**, v. 6, n. 18, doi:10.1186/1471-2466-6-18, 2006.

ZAVASCKI, A. P. et al.. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, p. 882-885, 2006.

## 8-ANEXOS

### ANEXO I - FICHA INDIVIDUAL (UTI DE ADULTOS)

#### 1-Identificação:

1.1- Ficha nº: \_\_\_\_ 1.2-Prontuário: \_\_\_\_\_ 1.3-Leito: \_\_\_\_

1.4- Idade: \_\_\_\_ 1.6- Sexo: F ( ) M ( )

#### 2- Data da Internação:

2.1 – Hospital: \_\_\_\_\_ 2.2- UTI: \_\_\_\_\_ 2.3- Transferido: \_\_\_\_\_

#### 3- Evolução:

3.1- Alta: \_\_\_\_\_ 3.2- Morte: \_\_\_\_\_ 3.3- Transferido: \_\_\_\_\_

#### 4- Diagnósticos:

4.1- Doença de base: \_\_\_\_\_

4.2- Diagnóstico de admissão/definitivo: \_\_\_\_\_

4.3- Pneumonia: S/N VM: S/N

Escarro purulento: S/N Febre (>38,5°C): S/N Hipotermia(<35°C): S/N

Leucocitose (>10.000): S/N Diagnóstico radiológico: S/N

4.4- Diagnóstico microbiológico: \_\_\_\_\_

4.5- Outras infecções: S/N Sítio anatômico: \_\_\_\_\_ Natureza: H/C

#### 5- Fatores de risco:

5.1- Internação prévia: S/N 5.2- Trauma: S/N

5.3- Cirurgia: S/N 5.3.1- Qual: \_\_\_\_\_

5.4- Nível de consciência (coma): S/N 5.5- Má nutrição(Albumina): S/N

5.6- Imunocomprometimento (Idade, Diabetes, Corticóides,etc): S/N \_\_\_\_\_

5.7- Uso prévio de antibióticos: S/N 5.7.1- Quais: \_\_\_\_\_

5.8- Uso de procedimento invasivos: S/N

5.8.1- Quais?: CVC, PV, SNG, SNE, Dreno. Outros \_\_\_\_\_

5.9- Prótese ventilatória: Início: \_\_\_\_\_ Fim: \_\_\_\_\_

#### 6- Tratamento atual com antibióticos: S/N

6.1- Quais?: \_\_\_\_\_

#### 7- ASIS: \_\_\_\_\_

## ANEXO II – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (análise final).



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br);  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº. 011/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO  
CEP/UFU 364/08

Projeto Pesquisa: Relação entre o consumo de antibióticos, colonização de orofaringe e pneumonia associada à ventilação (PAV) por *Staphylococcus aureus* sensível ou resistente à oxacilina em pacientes internados na unidade de terapia intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro.

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório parcial: dezembro de 2009.

Data para entrega do relatório parcial: dezembro de 2010.

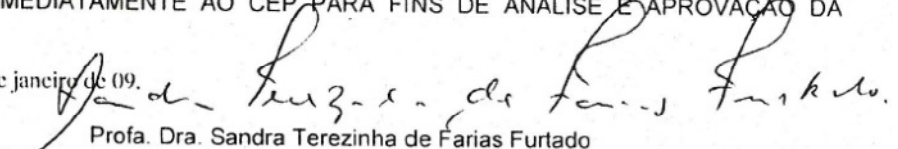
Data para entrega do relatório parcial: dezembro de 2011.

Data para entrega do relatório final: Dezembro de 2013.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 26 de janeiro de 2009.

  
Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.c). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

**ANEXO III****TERMO DE CONSENTIMENTO**

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa coordenada pelo Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho, membro do serviço de Controle de Infecção Hospitalar e professor titular de microbiologia da UFU, com o objetivo de saber a frequência de pneumonias nos pacientes internados na UTI de adultos do HC da UFU. Em caso de dúvidas o paciente/responsável poderá entrar em contato diretamente com o pesquisador no Laboratório de microbiologia, bloco 4C, Campus Umuarama ou através do fone: 3218-2236 ou com o Comitê de Ética no bloco J, Campus Santa Mônica ou no tel.: 3218-4131. Este termo será obtido por Michel Rodrigues Moreira, aluno de doutorado da UFU, antes do início da pesquisa por meio de conversa com paciente ou ser responsável.

Autorizo o acesso ao meu prontuário para levantamento de informações como idade, data de internação e dados clínicos como diabetes, pneumonia e uso de respirador, que está associado à pneumonia. Assim, concordo com a coleta do aspirado de secreção traqueal para análise laboratorial quando da higiene de minhas vias respiratórias realizada pelos profissionais da área de fisioterapia e enfermagem, durante a minha internação; estes procedimentos não acarretarão problemas locais ou gerais para os pacientes e estes não terão nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa, a qual irá contribuir para um melhor conhecimento das pneumonias, melhor cuidado com os pacientes e para melhorias nos serviços oferecidos na unidade. Este é um procedimento que já é realizado diariamente em pacientes intubados para que possam respirar melhor e a secreção traqueal e descartada no lixo hospitalar.

Tenho total liberdade para me informar quanto ao resultado da pesquisa, de desistir a qualquer momento de colaborar com a mesma e estou ciente que em nenhum momento haverá perda da minha privacidade pois não serei identificado.

Uma cópia deste ficará com o paciente.

Nome do paciente \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou seu responsável \_\_\_\_\_

Assinatura dos pesquisadores \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho/Pesquisador responsável