

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em
Pseudomonas aeruginosa isoladas de sangue: produção de β -lactamases,
perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo**

Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

Uberlândia

Fevereiro – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em
Pseudomonas aeruginosa isoladas de sangue: produção de β -lactamases,
perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo**

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

Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora)

Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (co-orientador)

Uberlândia

Fevereiro – 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- D192e
2015 Dantas, Raquel Cristina Cavalcanti, 1987-
Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue : produção de β -lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo / Raquel Cristina Cavalcanti Dantas. - 2015.
105 f. : il.
- Orientadora: Rosineide Marques Ribas.
Coorientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 3. Carbapenêmicos - Teses. 4. Fatores de risco - Teses. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974-. II. Gontijo Filho, Paulo Pinto. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

“Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue: produção de β -lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Michel Rodrigues Moreira
FFB/UFJF

Dra. Cristiane Silveira de Brito
ICBIM/UFU

Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah
FAMED/UFU

Profa. Dra. Renata Cristina Cezário
UNIPAC

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas – orientadora
ICBIM/UFU

Dedico este trabalho com muito amor e gratidão
à toda minha família, meus pais, Paulo e Elisa,
meu marido Rodrigo e à minha filha Sarah, meu
maior tesouro.

“ O ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete. ”
(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tua grandeza, pelo seu amor incondicional, pelo cuidado com minha família, por nunca desistir de mim, por me amparar em meus momentos tristes e permitir os momentos felizes e a realização de mais esta conquista em minha vida.

Aos meus pais, **Paulo e Elisa**, por todo empenho e dedicação, que me ensinaram a ser o que sou, pelo esteio e amadurecimento, pelos valores e ensinamentos, pela torcida e orações.

Aos meus irmãos, **Paulo e Daniel**, pelo convívio da infância, momentos de alegria e brincadeiras, pelo cuidado e companheirismo.

Ao meu marido **Rodrigo**, pela torcida e incentivo nesta etapa de minha vida, por tornar meus dias mais leves e felizes, pelo bom marido e pai para nossa filha.

A todos os meus familiares e amigos pelo apoio incondicional.

A minha orientadora, **Prof^a. Dra. Rosineide Marques Ribas**, pela oportunidade de aprendizado, disponibilidade, dedicação e exemplo.

Ao **Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho**, pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU) e também da vida, **Ana Luiza, Bruna, Daiane, Deivid, Iara, Marcília, Melina, Paola e Sabrina**, pelo apoio em cada passo deste trabalho e pelos momentos de descontração.

As técnicas do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), **Cristiane e Lícia**, pelo suporte, auxílio e amizade.

À doutoranda **Rebecca Tavares e Silva** do Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia (CREDESH), da Universidade Federal de Uberlândia, por todo apoio e orientação na técnica do PCR *real time*.

As professoras **Dra. Ana Lúcia da Costa Darini** (USP), **Dra. Maria Cristina M. Plotkowski** (UFRJ) e **Dra. Alessandra Saliba** (UFRJ), pela gentileza em ceder a amostra controle PAO1 utilizada neste trabalho.

Às professoras **Dra. Márcia Cristina Cury**, do laboratório de Parasitologia (UFU) e **Dra. Lizandra Ferreira de A. e Borges**, do laboratório de Microbiologia (UFU) pelo apoio prestado e contribuições junto ao exame de qualificação.

À todos os membros da banca, **Dr. Michel Rodrigues Moreira** (UFJF), **Dra. Renata Cristina Cezário** (UNIPAC), **Dra. Cristiane Silveira de Brito** (UFU), **Dra. Vania Olivetti Steffen Abdallah** (UFU).

As secretárias da coordenação do PPIPA, **Lucélia** e **Lucileide**, pela atenção e auxílio.

Aos **profissionais de saúde do Hospital de Clínicas**; à equipe do Laboratório de Microbiologia do HC-UFU; aos funcionários do Setor de Registros Médicos por toda ajuda prestada.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)**, pelo suporte financeiro nas pesquisas frente ao nosso laboratório.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessola de nível Superior (CAPES)** pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva ao doutorado.

A todos que torceram e que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho se concretizasse, o meu sincero agradecimento. **Muito Obrigada!**

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Epidemiologia.....	15
1.2 Mecanismos de resistência aos carbapenêmicos	18
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Hospital.....	27
3.2 Desenho do estudo.....	27
3.3 Definições.....	28
3.4 Amostras bacterianas.....	30
3.5 Coleta e hemoculturas.....	30
3.6 Identificação.....	31
3.7 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	31
3.8 Armazenamento das bactérias.....	32
3.9 Técnicas Fenotípicas.....	32
3.9.1 Teste de Hodge – Carbapenemase.....	32
3.9.3 Teste de sinergismo com Duplo Disco – Metallo- β -lactamase.....	32
3.9.3 Teste de disco antagonismo ou teste “D” – AmpC-induzido.....	33
3.10 Técnicas Moleculares.....	33
3.10.1 PCR end point e multiplex PCR.....	33
3.10.1.1 Extração do DNA por lise térmica.....	34
3.10.1.2 Amplificação.....	35
3.10.1.3 Eletroforese em gel de agarose	36
3.10.2 Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real.....	36
3.10.2.1 Extração do RNA total.....	39
3.10.2.2 Síntese do cDNA.....	39
3.10.2.3 Reação de qRT-PCR.....	40
3.10.2.4 Análise da expressão gênica.....	40
3.10.3 Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado..	41
3.11 Análise estatística.....	42
3.12 Comitê de ética.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1 População de estudo.....	43

4.2 Estudo espidemiológico.....	44
4.3 Pesquisa dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos.....	56
4.4 Tipagem molecular.....	61
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
Apêndice I.....	99
Apêndice II.....	100
Apêndice III.....	101
Apêndice IV.....	102
ANEXO I.....	105
ANEXO II.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
AG	Aminoglicosídeo
ASIS	<i>Average Severity of Illness Score</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BL	Beta-lactâmico
CF	Cefalosporina
CP	Carbapenêmicos
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVC	Cateter Venoso Central
DDD	Dose Diária Definida
dNTP	Desoxinucleotídeos
EDCD	<i>European Centers for Disease Control and Prevention</i>
et al.	E colaboradores
FQ	Fluorquinolonas
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IC	Intervalo de confiança
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	Infecção de Corrente Sanguínea
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
MDR	Multi-resistente
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MβL	Metalo-β-lactamase

MH	<i>Mueller Hinton</i>
MPA	Mercaptopropiônico
NHSN	<i>National Healthcare Safety Network</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> – Razão de possibilidades
Pb	<i>base pair</i> , par de base
PDR	Pan-resistente
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PM	Padrão de peso molecular
Pmol	Picomol
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real
RPM	Rotações por Minuto
SENTRY	<i>SENTRY Antimicrobial Surveillance Program</i>
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris, EDTA
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TSDD	Teste de Sinergismo com Duplo Disco
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia / mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
β	Beta
χ²	Qui-quadrado
XDR	Extensivamente resistente

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes das bombas e ação preferencial a determinados tipos de substratos. FQ, Fluorquinolona; BL, Beta-lactâmico; TC, Tetraciclina; CF, Cefalosporina CP, Carbapenêmico; AG, Aminoglicosídeo.....21
- Figura 2.** Organograma da população estudada referente à bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa*.....43
- Figura 3.** Incidência do total de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa*/1000 pacientes-dia e daquelas por isolados resistentes aos carbapenêmicos entre as unidades hospitalares do HC-UFU.....45
- Figura 4.** Nível endêmico de bacteremia por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos por 1000 pacientes-dia no período de março de 2009 a dezembro de 2012.....47
- Figura 5.** Relação entre a dose diária definida dos antimicrobianos por 1000 pacientes-dia e o número de pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos por 1000 pacientes-dia no HC-UFU no período de estudo.....48
- Figura 6.** Curva de sobrevivência dos pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação ao grupo que recebeu terapia apropriada.....52
- Figura 7.** Dendrograma da análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), linhagens, genótipo e pulstipo das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue e aspirado traqueal. Escala representa as porcentagens de similaridade. Referenciada por Ferreira e colaboradores (2014).....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substratos antimicrobianos para os principais sistemas de efluxo em <i>P. aeruginosa</i>	22
Tabela 2. Linhagens controle utilizadas em cada experimento.....	30
Tabela 3. Primers específicos para detecção dos genes codificadores de carbapenemases.....	34
Tabela 4. Condições para amplificação nas reações de detecção dos genes codificadores de carbapenemases por PCR.....	35
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados na reação de qRT-PCR.....	37
Tabela 6. Caracterização dos isolados incluídos para análise de Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real.....	38
Tabela 7. Distribuição dos pacientes com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e daqueles com isolados resistentes aos carbapenêmicos entre as unidades hospitalares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	44
Tabela 8. Taxas e indicadores epidemiológicos de bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	46
Tabela 9. Fatores de risco associados com mortalidade hospitalar em 30 dias em pacientes com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	50

Tabela 10. Análise univariada e fatores de risco independentes associados com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multiresistente e extensivamente resistente em pacientes com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	53
Tabela 11. Fatores de risco independentes associados com resistência à diferentes categorias de antimicrobianos em pacientes com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	54
Tabela 12. Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente às diferentes categorias de antimicrobianos, multiresistente e extensivamente resistente.....	55
Tabela 13. Caracterização dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> quanto à produção de Metallo- β -lactamase, antibiótipo e perfil de resistência.....	57
Tabela 14. Caracterização dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenêmico quanto aos testes fenotípicos.....	58
Tabela 15. Caracterização dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quanto a hiperexpressão de bombas de efluxo, hiperprodução de AmpC e perda/redução de OprD.....	59
Tabela 16. Relação entre a associação dos mecanismos de resistência identificados entre os 14 isolados de <i>P. aeruginosa</i> testados no qRT-PCR e o perfil de resistência.....	60
Tabela 17. Perfil fenotípico e genotípico de resistência, sítio e data de isolamento das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> caracterizadas por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	63

RESUMO

Introdução: A disseminação de variantes de *Pseudomonas aeruginosa* associada à emergência de genótipos de resistência aos carbapenêmicos, é de grande preocupação no mundo todo. **Objetivos:** Realizar estudo epidemiológico-molecular da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de sangue. **Material e Métodos:** Para avaliação epidemiológica, foi realizado um estudo observacional prospectivo por meio de vigilância ativa no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU para detecção de pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa*, no período de maio/2009 a dezembro/2012. A pesquisa dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos baseou-se em métodos fenotípicos, teste de sinergismo com duplo disco e teste de Hodge, e genotípicos para detecção de carbapenemases, incluindo genes MBL (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} e *bla*_{SPM}) e genes OXA (*bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} e *bla*_{OXA-58}) por PCR multiplex e gene *bla*_{KPC} por PCR *end point*. A técnica do qRT-PCR foi utilizada para detecção dos mecanismos de resistência intrínsecos: hiperprodução de AmpC, hiperexpressão de bombas de efluxo (MexABOprM, MexXY, MexCDOprJ, MexEFOprN) e perda de porina OprD. Através do PFGE foi realizada a tipagem molecular dos isolados positivos para genes MBL. **Resultados:** 157 pacientes internados no HC-UFU com bacteremia por *P. aeruginosa* foram incluídos no estudo. No total, 162 episódios/isolados de bacteremia foram observados, sendo a UTI de adultos, a unidade hospitalar com maiores taxas de isolados resistentes aos carbapenêmicos. Foi observado um alto consumo de ceftriaxone, cefepime e meropenem, com tendência ascendente até o final do período de estudo, sem correlação positiva com isolados resistentes aos carbapenêmicos, entretanto foi observado um surto desses isolados em dezembro de 2010, predominantemente na UTI de adultos. A taxa de mortalidade entre os pacientes foi elevada (43,3%) e a análise multivariada mostrou que os preditores independentemente associados com óbito foram câncer e terapia antimicrobiana inapropriada, particularmente pelo uso de cefepime. Os fatores de risco associados com resistência aos antimicrobianos foram: tempo de hospitalização ≥ 30 dias, admissão na UTI, uso prévio de antimicrobianos, e presença de procedimentos invasivos, incluindo traqueostomia, hemodiálise e cateter urinário. Pacientes com bacteremia por isolados resistentes aos antimicrobianos tiveram maiores taxas de mortalidade hospitalar, com a terapia antimicrobiana inapropriada sendo um forte marcador de prognóstico ruim. A pesquisa de produção de MBL foi realizada em 56 isolados, com positividade de 21,4% pelo teste fenotípico, dos quais 75,0% tiveram *amplicon* consistente com genes pesquisados, sendo 66,7% do tipo *bla*_{SPM-1} e 33,3% *bla*_{VIM}. Dos 47 isolados resistentes aos carbapenêmicos e não-MBL, nenhum apresentou outro tipo de carbapenemase. 14 isolados foram incluídos na pesquisa de mecanismos de resistência através da técnica de qRT-PCR, com taxas de positividade de 71,4% para hiperprodução de AmpC e perda de porina OprD, e de 57,1% e 64,3% para hiperexpressão de MexABOprM e MexXY, respectivamente. A avaliação da relação clonal entre isolados contendo os genes MBL, apresentou alta similaridade naquelas contendo *bla*_{SPM}, o que não foi observado para aqueles contendo o gene *bla*_{VIM}. **Conclusões:** Ficou evidenciado que a terapia inapropriada é fator significativo para pior prognóstico entre os pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* resistente. Na ausência de carbapenemase efetiva, isolados de *P. aeruginosa* apresentam frequentemente associação de outros mecanismos de resistência. Além disso, foi evidenciado uma disseminação cruzada do clone *bla*_{SPM} e o primeiro relato de *bla*_{VIM} no HC-UFU.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteremia, resistência aos carbapenêmicos, carbapenemases, bombas de efluxo, porina OprD.

ABSTRACT

Introduction: The spread of *Pseudomonas aeruginosa* variants associated with the emergence of carbapenem resistance genotypes, is of great concern worldwide. **Objectives:** Molecular epidemiological study of carbapenem resistance in isolates of *P. aeruginosa* from blood. **Material and Methods:** We conducted a prospective observational study through active surveillance in the HC-UFU Microbiology Laboratory for detection of patients with *P. aeruginosa* bacteremia, from May/2009 to December/2012. The mechanisms of resistance to carbapenems were studied based on phenotypic methods, including Synergy Test with Double Disk and Hodge Test, and genotypic to detection of carbapenemase genes, including MBL genes (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} e *bla*_{SPM}) and OXA genes (*bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} e *bla*_{OXA-58}) by multiplex PCR and gene *bla*_{KPC} by *end point* PCR. The qRT-PCR technique was conducted to determine the intrinsic resistance mechanisms: overproduction of AmpC, overexpression of efflux pumps (MexABOprM, MexXY, MexCDOprJ, MexEFOprN) and loss of OprD porin. The PFGE was used to molecular typing of isolates presenting MBL genes. **Results:** 157 patients admitted to the HC-UFU with *P. aeruginosa* bacteremia were included. A total of 162 episodes/isolated bacteremia were observed, with the adult ICU presenting the highest rates of isolates resistant to carbapenems. A high consumption of ceftriaxone, cefepime and meropenem was observed, with an increasing trend until the end of the study period, and no positive correlation with carbapenems resistant isolates, however we observed an outbreak of these isolates in December 2010, predominantly in adult ICU. The mortality rate was high (43.3%) and the multivariate analysis showed that the predictors independently associated with death were patients with cancer and with inappropriate antimicrobial therapy, particularly from cefepime use. Risk factors associated with antimicrobial resistance were: hospital stay ≥ 30 days, ICU admission, prior use of antibiotics, and presence of invasive procedures, including tracheostomy, hemodialysis and urinary catheter. The mortality rates were higher among patients with resistant isolates. The inappropriate antibiotic therapy was a strong marker of worse prognosis. The MBL production was conducted in 56 isolated, with positivity of 21.4% by the phenotypic test, of which 75.0% presented amplicon consistent with MBL genes, being 66.7% of *bla*_{SPM-1} type and 33.3% of *bla*_{VIM}. Of the 47 non-MBL carbapenems resistant isolates, none had another type of carbapenemase, and 14 were included in the study of resistance mechanisms from qRT-PCR, with rates of AmpC overproduction and OprD porin loss of 71.4%, for both. The rates of MexABOprM and MexXY overexpression were 57.1% and 64.3%, respectively. The evaluation of the clonal relationship among isolates with MBL genes, showed high similarity of those isolates presenting *bla*_{SPM}, which was not observed for those containing the *bla*_{VIM} gene. **Conclusions:** Our results showed that inappropriate therapy is a significant worse prognosis factor among patients with bacteremia resistant *P. aeruginosa*. In the absence of effective carbapenemase, *P. aeruginosa* isolates presented association of other resistance mechanisms. Furthermore, this study showed a cross spread of *bla*_{SPM} clone and the first report of *bla*_{VIM} at HC-UFU.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteremia, carbapenem resistance, carbapenemase, efflux pumps, porin OprD.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública, responsável por considerável elevação dos custos hospitalares, além de contribuir para o aumento do tempo de internação, da morbidade e mortalidade nos serviços de saúde do mundo todo (BARSANTI & WOELTJE, 2009; WAWRZYNIAK et al., 2010; ANVISA, 2013a; ANVISA, 2013b). No Brasil, estima-se que 5 a 15% dos pacientes hospitalizados adquiram algum tipo de IRAS, com destaque para infecção de trato urinário (35 – 45%), seguido de infecção de trato respiratório (15 – 25%), bacteremia (10 – 20%) e infecção de sítio cirúrgico (14 – 16%) (ANVISA, 2013a; ANVISA, 2013b; OLIVEIRA et al., 2012).

A Infecção de Corrente Sanguínea (ICS) está entre as complicações infecciosas mais graves decorrente de hospitalização e cuidados médicos (ANVISA, 2013c) associada a altas taxas de mortalidade hospitalar (SABATIER et al., 2009; MASEDA et al., 2011; GAHLOT et al., 2014). Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento na incidência dessas infecções, refletindo, entre outros fatores, a difícil implementação de técnicas básicas de controle de infecção (SABATIER, 2009; MASEDA et al., 2011), a frequente utilização de procedimentos médicos invasivos (NNIS, 2001 e DIEKEMA et al., 2003), particularmente o uso de dispositivos intravasculares e a presença de ventilação mecânica, que são considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento de infecções (LEAO et al., 2007).

Cerca de 10% das IRAS são causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, com participação importante em infecções de trato urinário (12%), corrente sanguínea (10%) e sítio cirúrgico (8%), além de ser o principal agente de pneumonia nos hospitais brasileiros (40 - 50%) (POLLACK et al., 2003; KIFFER et al., 2005). Estudos epidemiológicos em hospitais de diferentes países relatam que as infecções por *P. aeruginosa* são, em sua maioria, endêmicas e de natureza exógena em pacientes colonizados/infectados, considerados principais reservatórios desse micro-organismo (BERTRAND et al., 2001; PELLEGRINO et al., 2002; THUONG et al., 2003; PARAMYTHIOTOU et al., 2004), além de fontes ambientais, com destaque para água e superfícies (RUIZ et al., 2004). Geralmente, essas infecções são de difícil tratamento decorrente das limitadas opções terapêuticas, em função da emergência e disseminação

de isolados clínicos resistentes aos agentes antimicrobianos (MAJUMDAR et al., 2004; PAGANI et al., 2005).

Nas bacteremias, do ponto de vista epidemiológico, os cocos Gram-positivos são mais frequentemente isolados, embora esta regra não possa ser expandida para países em desenvolvimento, como o Brasil, onde as condições ambientais favorecem a emergência de bacilos Gram-negativos (TUON et al., 2012), com participação importante de *Pseudomonas aeruginosa* entre os não fermentadores (MARIN et al., 2014; ORTEGA et al., 2014). A presença de bactéria na corrente sanguínea é de grande importância clínica, demonstrando que o hospedeiro não pôde controlar a infecção a partir de um foco primário ou pode não estar recebendo terapia empírica antimicrobiana apropriada. Sendo assim, a identificação de *P. aeruginosa* na corrente sanguínea, geralmente é um indicador de disseminação de infecção, além de um marcador de prognóstico ruim (SHORR et al., 2006), estando associados com elevadas taxas de mortalidade (LEAO et al., 2007).

Os índices de mortalidade de pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* relatados na literatura têm alcançado taxas superiores à 60% (ALIAGA et al., 2002; MARRA et al., 2006). Um estudo multicêntrico realizado em 49 hospitais dos Estados Unidos, durante um período de sete anos, detectou-se 24.179 casos de ICS hospitalar. Embora a *P. aeruginosa* tenha sido o sétimo agente isolado mais frequente, este micro-organismo liderou as taxas de mortalidade entre o total de pacientes (38,7%), pacientes internados em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (47,9%) e pacientes de outras enfermarias (27,6%) (WISPLINGHOFF et al., 2009). Os estudos tem destacado a gravidade do paciente e a resistência aos antimicrobianos de *P. aeruginosa* associada à terapêutica empírica inapropriada como importantes preditores de morte nestes pacientes (MICEK et al., 2005; SHORR et al., 2006; MARÍN et al., 2014).

É consenso que a resistência bacteriana tem sido um importante fator no aumento dos índices de mortalidade nos pacientes criticamente doentes (AZEVEDO et al., 2005), e que as infecções por germes resistentes vem aumentando expressivamente, tornando-se um problema de saúde pública, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Organização Mundial de Saúde (OMS), o CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*), as associações de Controle de Infecção Relacionadas à Assistência a Saúde (CCIHs), além da indústria farmacêutica internacional

(HAMBRAEUS, 2006). Neste contexto, destaca-se a importância clínica da *P. aeruginosa*, considerando seus níveis crescentes de resistência, relacionada à sua característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos e de carrear plamídeos e outros elementos genéticos de resistência (LIVERMORE et al., 2002; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Os carbapenêmicos aparecem como escolha terapêutica no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa*, entretanto seu uso tem sido ameaçado principalmente pelo aumento da incidência de isolados clínicos resistentes a esta classe de antibióticos (GALES et al., 2003; QUALE et al., 2006; GALES et al., 2012). O Programa de vigilância *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) avaliando 20 hospitais brasileiros, encontrou *P. aeruginosa* como patógeno Gram-negativo mais frequentemente isolado, com taxa de resistência de 64% para meropenem (KIFFER et al., 2005). No Brasil, grupos independentes de pesquisa tem relatado que as taxas de resistência ao imipenem entre isolados de *P. aeruginosa* variam de 30 a mais que 80% em alguns hospitais (ZAVASCKI et al., 2004; ZAVASCKI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009; BAUMGART et al., 2010).

Nos últimos anos, o problema da resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* tem sido notadamente complicado, pois vários estudos têm relatado um aumento na frequência de isolados com perfil multi-resistente (MDR), extensivamente resistente (XDR) e pan-resistente (PDR) (SOULI et al., 2008; HIRSCH et al., 2010; TAM et al., 2010; CABOT et al., 2011; KARAIKOS et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014). Um programa de vigilância europeu, o ECDC-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*), demonstrou aumento progressivo nas taxas de isolados de *P. aeruginosa* com perfil MDR, nos hospitais de Portugal, ao longo dos últimos anos: menor que 10% em 2007, 13,6% em 2008, 13,8% em 2009 e 2010, 16,2% em 2011, e de 18,1% em 2012 (ECDC, 2008; ECDC, 2009; ECDC, 2010; ECDC, 2011; ECDC, 2012; ECDC, 2013). Mais recentemente, MDR, XDR e PDR tiveram suas definições atualizadas pelo CDC e ECDC (*European Center for Disease Control and Prevention*) promovidas com o objetivo de padronização internacional destas terminologias, conforme publicado por Magiorakus e colaboradores (2012). MDR é definido como a resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos, XDR é a resistência a pelo menos um agente, incluindo todas as categorias, podendo excluir no máximo duas categorias, e PDR é a resistência a todos os agentes em todas as

categorias de antimicrobianos. Já considerando essas novas definições, um estudo recente publicado por nossa equipe identificou taxas de *P. aeruginosa* MDR e XDR de 47,5% e 25,8%, respectivamente, em isolados clínicos de bacteremia (DANTAS et al., 2014).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos citados na literatura destacam-se: transferência de pacientes entre unidades de atendimento médico ou da comunidade, internação em unidades de tratamento intensivo, maior frequência de uso de procedimentos invasivos, colonização prévia, tempo prolongado de hospitalização, além da baixa adesão dos profissionais de saúde às medidas de controle de infecção hospitalar (OLIVEIRA et al., 2012; PEREZ et al., 2007; DANTAS et al., 2014). Além disso, inúmeros estudos têm estabelecido o papel importante que o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos representa para ocorrência de micro-organismos com resistência múltipla aos antimicrobianos (GAYNES et al., 1997; WHITE et al., 2000; PATRICK et al., 2004).

Na tentativa de monitorar a emergência destes isolados resistentes, vários estudos tem explorado a relação entre o uso excessivo de antibióticos e a seleção de isolados resistentes aos antimicrobianos através da Dose Diária Definida (DDD) (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011), que é considerado um bom marcador utilizado para avaliação do consumo de antimicrobianos e evita o viés do paciente número, permitindo comparar taxas de micro-organismos e seus fenótipos de resistência. Adicionalmente, inúmeros estudos confirmam a relevância do número de DDD por 1000 pacientes/dia como uma unidade de medida para comparar uso de antimicrobianos entre países e regiões (MONNET et al., 2004). Em *P. aeruginosa*, vários estudos têm relacionado o uso abusivo de antimicrobianos com a aquisição de resistência, particularmente pelo DDD de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011).

1.2 Mecanismos de resistência aos carbapenêmicos

Alguns estudos tem demonstrado que o mecanismo de resistência adquirida aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode ser devido à produção de enzimas carbapenemases, incluindo aquelas pertencentes à classe A, a serino-carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), e classe D (Oxa-carbapenemase) da

classificação de Ambler (1980), entretanto, o problema ainda se concentra, principalmente, na inativação enzimática de antibióticos devido à produção de Metallo- β -Lactamases (MBLs), descrita como mecanismo responsável pelos elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos no Brasil (GALES et al., 2003; SADER et al., 2005; NEVES, et al., 2011).

MBLs pertencem à classe B na classificação estrutural das β -lactamases e possuem zinco no sítio ativo da enzima (AMBLER, 1980). Além da inativação por agentes quelantes de metais, como EDTA e ácido mercaptopropiônico, as MBLs tem como características funcionais a potente atividade de hidrolisar todos os β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases, à exceção do aztreonam (CROWDER et al., 1998; QUEENAN et al., 2007). A expressão dessas enzimas é associada a elementos genéticos móveis incluindo integrons, transposons e plasmídeos (WALSH et al., 2005), e até o momento, são conhecidos 10 subtipos de MBLs incluindo enzimas do tipo: IMP (*Imipenemase*) (WATANABE et al., 1991), VIM (*Verona Imipenemase*) (LAURETTI et al., 1999), GIM (*German Imipenemase*) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM (*Seoul Imipenemase*) (LEE et al., 2005), SPM-1 (*São Paulo Metallo-beta-lactamase*) (TOLEMAN et al., 2002), AIM (*Australian Imipenemase*) (YONG et al., 2007), KHM-1 (*Kyorin Health Science Metallo-beta-lactamase*), DIM-1 (*Dutch Imipenemas*) (POIREL et al., 2009) e TMB-1 (*Tripoli Metallo-beta-lactamase*) (EL SALABI et al., 2009).

A presença MBLs em isolados de *P. aeruginosa* tem sido relatada com frequência crescente no mundo todo, sendo as enzimas do tipo IMP e VIM as mais prevalentes globalmente, enquanto as demais ocorrem de maneira mais localizada. No Brasil, em isolados de *P. aeruginosa* produtores de MBL já foram descritos os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, sendo os dois primeiros com maior frequência (MENDES et al., 2004; LINCOPAN et al., 2005; SADER et al., 2005; MENDES et al., 2006). O problema maior ainda se concentra em isolados produtores de enzima do tipo SPM-1, que após ser detectada pela primeira vez numa amostra urinária de *P. aeruginosa* em São Paulo (TOLEMAN et al., 2002), tornou-se endêmica, sendo descrita em várias outras regiões do país (GALES et al., 2003; CIPRIANO et al., 2007; DANTAS et al., 2014).

Estudos brasileiros demonstram variações nas frequências de detecção destas enzimas entre as diferentes regiões do país. Sader e colaboradores (2004) e Zavascki e

colaboradores (2005) encontraram taxas de resistência elevadas ao imipenem (49,0% e 59,0%, respectivamente) e ceftazidima (40,5% e 49,0%, respectivamente), relacionadas com a presença de *P. aeruginosa* produtora de MBL do tipo SPM-1 recuperados em hospitais de diferentes regiões do Brasil. No Sul do país a enzima SPM-1 foi detectada em 19,6% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem ou ceftazidima (MARTINS et al., 2007). Outro estudo realizado num hospital universitário de São Paulo por Xavier e colaboradores (2010) detectou os genes *bla*_{SPM-1} em 14 isolados (23.7%) e *bla*_{IMP-1} em 1 isolado (1.7%), entre aqueles resistentes aos carbapenêmicos. Dentre os 14 isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM-1, 13 demonstraram o mesmo perfil clonal, evidenciando a transmissão cruzada do gene de resistência.

Na ausência de uma carbapenemase efetiva, a resistência aos carbapenêmicos pode estar relacionada à presença de mecanismos intrínsecos ou mutacionais, que inclui a produção cromossomal da β -lactamase AmpC e a alteração na permeabilidade da membrana externa, através da perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo (WALTHER-RASMUSSEN & HOIBY, 2007; LISTER et al., 2009). Estes mecanismos podem ser expressos isoladamente ou combinados, desempenhando papel importante na resistência múltipla aos antimicrobianos (FUSTÉ et al., 2013; KARAIKOS et al., 2014).

Os sistemas de bomba efluxo aparecem como causa importante de multi-resistência em *P. aeruginosa* e são, geralmente, agrupados em cinco famílias (NIKAIDO et al., 2012). Os sistemas de maior importância clínica nesse micro-organismo pertencem à família RDN ("*resistance-nodulation division*"), sendo eles: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY e MexEF-OprN, onde a denominação "Mex" vem do inglês "*multi-drug efflux pump*". Estas bombas de efluxo possuem uma organização genética determinada por operons, (LISTER et al., 2009; WOLTER et al., 2013), e os genes codificadores de cada componente da bomba, geralmente, estão localizados no cromossomo bacteriano. A organização estrutural destes sistemas se dá através de três componentes: i) proteína transportadora de membrana citoplasmática, que desempenha a função de bomba; ii) proteína de membrana externa (porina), que forma o canal extrusivo e iii) proteína de fusão localizada no espaço periplasmático que une os outros dois constituintes, ou seja, a bomba e o canal de extrusão (Figura 1) (ASKOURA et al., 2011; AESCHLIMANN, 2003; POOLE, 2005).

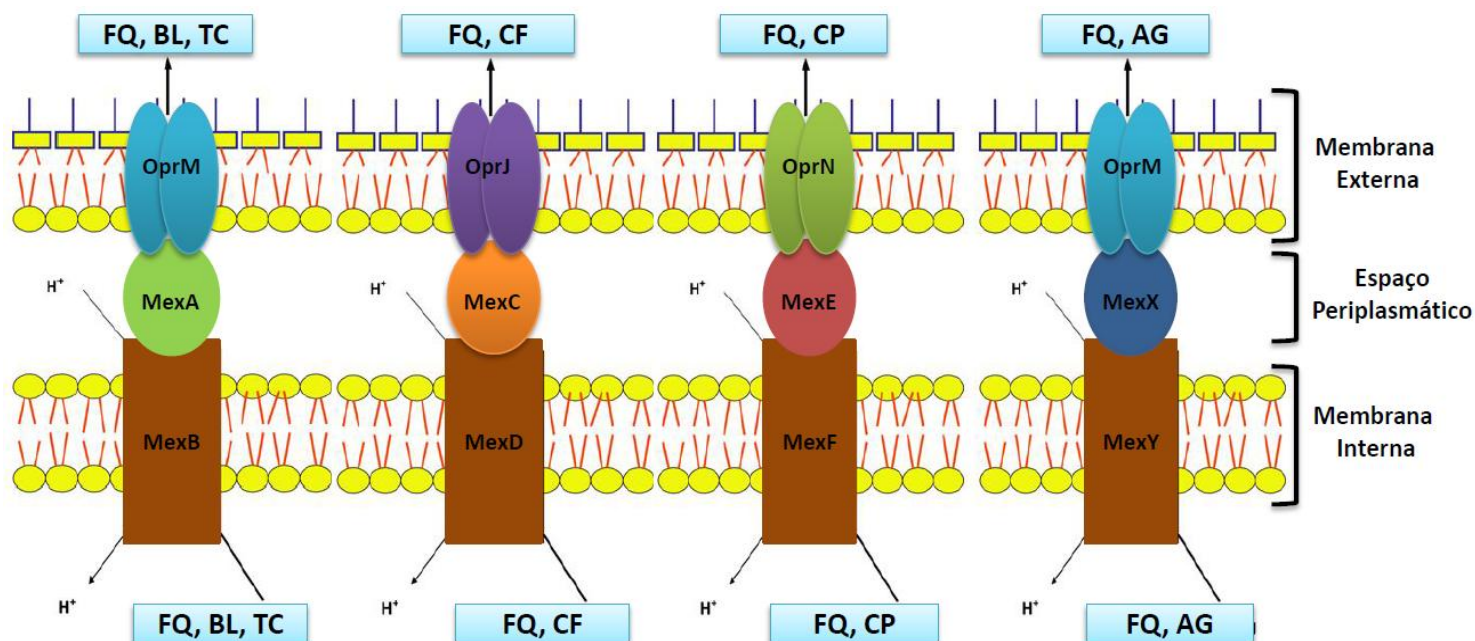


Figura 1. Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes das bombas e ação preferencial a determinados tipos de substratos. FQ, Fluorquinolona; BL, Beta-lactâmico; TC, Tetraciclina; CF, Cefalosporina CP, Carbapenêmico; AG, Aminoglicosídeo

Fonte: Adaptação de AESCHLIMANN, 2003; POOLE, 2005; NEVES et al., 2010; ASKOURA et al., 2011

Sabe-se que, a hiperexpressão dessas bombas está relacionada à resistência a uma ampla variedade de drogas antimicrobianas de ação antipseudomonas (Tabela 1), incluindo β -lactâmicos, fluorquinolonas e aminoglicosídeos, e vários estudos têm documentado elevada frequência na presença dessas bombas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, alcançando taxas superiores a 60% (XAVIER et al., 2010). O sistema MexAB-OprM foi o primeiro da família RDN caracterizado em *P. aeruginosa* (POOLE et al., 1993) e, atualmente, tem sido reafirmado como a bomba de maior relevância clínica, pois remove da célula uma ampla variedade de substratos, e parece ser o principal contribuinte, entre os demais, para o desenvolvimento do fenótipo de multi-resistência (Tabela 1) (LI et al., 2004; POOLE et al., 2007; LISTER et al., 2009; NEVES et al., 2010; XAVIER et al., 2010).

Tabela 1. Substratos antimicrobianos para os principais sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*

MexABOprM	MexCDOprJ	MexEF OprN	MexXY
Aztreonam	Cefepima	Cloranfenicol	Amicacina
Carbenicilina	Cefuroxima	Ciprofloxacina	Cefepima
Cefotaxima	Claranfenicol	Calavulanato	Cefotaxima
Ceftazidima	Ciprofloxacina	IMIPENEM	Ciprofloxacina
Cefuroxima	Eritromicina	Levofloxacina	Eritromicina
Cloranfenicol	Levofloxacina	Norfloxacina	Levofloxacina
Ciprofloxacina	Nafcilina	Sulbactam	Tetraciclina
Clavulanato	Norfloxacina	Trimetoprima	Tobramicina
Faropenem	Tetraciclina		
Levofloxacina	Travofloxacina		
MEROPENEM			
Nafcilina			
Norfloxacina			
Piperacilina			
Sulbactam			
Tetraciclina			
Trimetoprima			

*Adaptação de NEVES, 2010.

Além das bombas de efluxo mencionadas, a produção de β -lactamase cromossomal do tipo AmpC está frequentemente associada com a resistência intrínseca de *P. aeruginosa* (LIVERMORE et al., 2002; QUALE et al., 2006; LISTER et al., 2009). Na ausência de β -lactâmicos esta enzima é normalmente produzida em baixos níveis, entretanto, pode ser induzida a níveis significativamente elevados na presença de alguns antibióticos dessa classe, como os carbapenêmicos (LEE et al., 2012; VATCHEVA-DOBREVSKA et al., 2013). A hiperprodução dessa β -lactamase pode ocorrer por indução do gene *ampC* ou através de um processo de desrepressão, levando a um alto nível de expressão constitutiva, conferindo resistência a todos β -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos, mas certamente contribui para resistência a esta categoria quando acompanhado por um mecanismo adicional, como por exemplo, hiperprodução de bomba de efluxo ou perda de porina OprD (LISTER et al., 2009; XAVIER et al., 2010). Além disso, há controvérsias na literatura quanto à resistência aos carbapenêmicos através desse mecanismo, na qual estudos têm demonstrando aumento na susceptibilidade ao imipenem em cepas de *P. aeruginosa* com deleção do gene *ampC* (LISTER et al., 2009), sugerindo efetiva participação desta enzima na resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos.

A perda ou diminuição da expressão da proteína de membrana externa denominada porina D (OprD) está entre os mecanismos de resistência intrínseca mais estudados em *P. aeruginosa*. Esta porina parece servir como porta de entrada preferencial para os carbapenêmicos e sua perda confere resistência particularmente ao imipenem e pode levar a suscetibilidade reduzida ao meropenem (LIVERMORE et al., 2002; LISTER et al., 2009; POOLE et al., 2011; LEE et al., 2012). A perda de OprD em *P. aeruginosa* ocorre frequentemente durante terapia com imipenem e não confere resistência a outros β -lactâmicos a não ser aos carbapenêmicos, porém a associação desse mecanismo com a hiperexpressão de bombas de efluxo, por exemplo, também pode contribuir para multi-resistência (LIVERMORE et al., 2002). Um estudo clínico demonstrou emergência da resistência ao imipenem durante o tratamento das infecções com esta droga em aproximadamente 25% dos pacientes (ZANETTI et al., 2003). Quale e colaboradores (2006) encontraram diminuição da expressão de OprD em 28/33 (84,8%) dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes a esta classe de antimicrobianos, com a maioria dos isolados também apresentando associação com hiperprodução de AmpC e hiperexpressão de bombas de efluxo.

Os diversos mecanismos de resistência que os isolados de *P. aeruginosa* apresentam e as suas possíveis interações levam diferentes estudos a questionar a relação clonal entre os isolados. Nos últimos anos, a literatura vem destacando a disseminação global de diferentes variantes endêmicas e epidêmicas de *P. aeruginosa*, frequentemente associada à sua grande virulência, que confere maior vantagem adaptativa, e à emergência de novos genótipos de resistência aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2002; HOCQUET et al., 2003; CABOT et al., 2012). Os métodos de tipagem molecular, como o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* ou Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), são fundamentais para determinar se os organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados, além de auxiliar na detecção de surtos, na identificação da transmissão cruzada e fontes de infecção, como também no monitoramento e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde. O método de PFGE tem sido amplamente utilizado para classificação dos isolados em linhagens clonais e descrito em diversos estudos de epidemiologia molecular, considerando o seu alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (GALETTI, et al., 2010).

Para caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, além do PCR convencional para pesquisa de genes epidemiologicamente relevantes, a maioria dos trabalhos na literatura científica utilizam a metodologia do qRT-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real) para pesquisa de mecanismos que são relacionados ao aumento ou diminuição dos níveis de RNAm específicos. Em *P. aeruginosa*, estes estudos baseiam sua análise na comparação dos resultados de expressão das linhagens investigadas com os da linhagem padrão da cepa PAO1, permitindo assim, inferir quantitativamente a hiperprodução/hiperexpressão ou expressão reduzida de determinada proteína/gene (YONEDA et al., 2005; XAVIER et al., 2010).

Atualmente, as amostras de *P. aeruginosa* isoladas no HC-UFU apresentam índices de resistência aos carbapenêmicos bastante relevantes, e, portanto, faz-se necessários trabalhos que envolvam estudos de epidemiologia molecular, capazes de esclarecer questões relevantes, como a caracterização de clones e principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos. A principal hipótese do trabalho foi considerar a existência de outros mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* não produtora de Metallo- β -lactamase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo epidemiológico/molecular das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos associadas com bacteremias nosocomiais no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de bacteremias por *P. aeruginosa* diagnosticadas no HC-UFU.
- Analisar os aspectos epidemiológicos, principais fatores de risco intrínsecos e extrínsecos das bacteremias por *P. aeruginosa* resistente às diferentes categorias de antimicrobianos, *P. aeruginosa* MDR e XDR, bem como o impacto da resistência na evolução clínica dos pacientes.
- Avaliar os principais preditores de mortalidade e impacto da terapia antimicrobiana inapropriada na evolução clínica dos pacientes.
- Avaliar a dose diária definida (DDD) de cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, carbapenêmicos e fluorquinolonas e sua relação com as taxas de *P.aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos.
- Determinar a frequência de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase (MBL).
- Determinar os genes responsáveis por codificar MBL (*bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM} e *bla*_{SIM}) e OXA (*bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} e *bla*_{OXA-58}) por PCR multiplex e do gene *bla*_{KPC} por PCR *end point*.

- Determinar a frequência de outras carbapenemases nos isolados não produtores de MBL, incluindo a serino-carbapenemase KPC e oxa-carbapenemase (OXA), por técnicas fenotípicas e genotípicas.
- Avaliar a expressão gênica dos sistemas de efluxo (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM), da proteína de membrana externa (porina OprD) e da β -lactamase cromossômica AmpC pelo qRT-PCR em isolados não produtores de MBL.
- Avaliar a contribuição destes mecanismos para a resistência antimicrobiana.
- Determinar a relação clonal entre as linhagens produtoras de MBL por meio da técnica de PFGE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Hospital

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um 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 e Alto Paranaíba. Até recentemente, era o principal responsável por praticamente todo o atendimento hospitalar vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) do 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.

3.2 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional prospectivo através de vigilância ativa no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU para detecção de pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa*, no período de maio de 2009 a dezembro de 2012. Para avaliação dos fatores de risco e variáveis diretamente relacionadas aos pacientes, como características clínicas e demográficas, tratamento inadequado, mortalidade e outras, os dados foram analisados considerando o primeiro episódio bacteremia por *P. aeruginosa*. Foi conduzido um estudo de coorte para o total de pacientes internados com bacteremia por *P. aeruginosa* para detecção dos fatores de risco associados à resistência antimicrobiana, preditores de mortalidade hospitalar (30 dias) e impacto da terapia inadequada na evolução dos pacientes com bacteremia. Os demais episódios foram incluídos para análises da pesquisa dos mecanismos de resistência aos carbapenêms. As características demográficas, clínicas e epidemiológicas dos pacientes foram obtidas através da revisão de prontuários médicos utilizando uma ficha individual, seguindo o modelo do NHSN (*National Healthcare Safety Network*) (ANEXO I).

3.3 Definições

Infecção relacionada à Assistência à Saúde (IRAS): é qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital. As IRAS também podem se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que estejam relacionadas com a internação ou com os procedimentos realizados durante a internação (RODRIGUES; RICHTMANN, 2008).

Bacteremia (primária e secundária): de acordo com o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), bacteremia é definida como a presença de bactérias na corrente sanguínea comprovadas laboratorialmente através de hemocultura positiva. A bacteremia é classificada como primária quando não é relatado outro foco da infecção, podendo ter origem desconhecida ou relacionada ao uso do cateter venoso central, comprovada através da cultura positiva de mesma etiologia da ponta do cateter, e secundária quando clinicamente relacionada a outro sítio anatômico de infecção, como pulmão, trato urinário, infecção de sítio cirúrgico, entre outros (CDC, 2002; BAUMGART et al., 2010).

Average Severity of Illness Score (ASIS): calculado para avaliar a gravidade clínica de cada paciente, os pontos são atribuídos de forma proporcional a complexidade do tratamento e gravidade observada do paciente (ROSENTHAL et al., 2006).

***Pseudomonas aeruginosa* Multi-resistente:** resistência a pelo menos um agente antimicrobiano dentro de 3 ou mais categorias: Aminoglicosídeos (gentamicina e amikacina), Carbapenêmcios (imipenem e meropenem), Cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), Fluorquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), Penicilinas/Inibidores de β -lactamses (piperacilina/tazobactam), Monobactâmicos (aztreonam) e Polimixinas (colistina e polimixina B) (MAGIORAKOS et al., 2012).

***Pseudomonas aeruginosa* Extensivamente-resistente:** resistência a pelo menos um agente antimicrobiano incluindo todas as categorias mencionadas, podendo ser excluída até duas categorias (MAGIORAKOS et al., 2012).

Terapia antimicrobiana inapropriada: micro-organismo isolado com resistência *in vitro* ao antimicrobiano usado no tratamento do paciente e/ou ausência de terapia durante 24 horas ou mais após o diagnóstico microbiológico da infecção (GILBERT et al., 2007).

Uso prévio de antimicrobianos: foi considerado quando o paciente recebeu terapia com qualquer antibiótico durante pelo menos 72h observada em um período de até 30 dias prévio ao diagnóstico microbiológico da infecção.

Mortalidade hospitalar (30 dias): evolução para o óbito em até 30 dias após o diagnóstico de infecção (LODISE et al., 2007).

Cálculo das taxas e Densidade de Incidência

$$\text{Infecção/1000 pacientes-dia} = \frac{\text{Nº total de infecções}}{\text{Nº pacientes-dia}} \times 1000$$

Dose Diária Definida de antimicrobiano por 1000/pacientes-dia (DDD/1000 pacientes-dia): foram selecionados para cálculos de uso por 1000 pacientes/dia os seguintes antibióticos: cefalosporinas (ceftriaxone e cefepime), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), fluorquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), como proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000) A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

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

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

^A **Pacientes-dia:** P x L x T

P= Período de tempo em observação na unidade; L= Leitos disponíveis na unidade; T= índice de ocupação no tempo considerado (%)

Para o cálculo do DDD, o relatório do consumo dos antibióticos foi obtido na farmácia do HC-UFU.

3.4 Amostras bacterianas

Foram avaliadas *P. aeruginosa* isoladas de material clínico (sangue) recuperadas junto ao Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. As amostras foram re-cultivadas e estocadas a -20°C para posteriores avaliações microbiológicas e moleculares no Laboratório de Microbiologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (MICROMOL-ICBIM-UFU). As amostras controle que foram utilizadas nos experimentos estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Linhagens controle utilizadas em cada experimento

Linhagem controle	Experimento
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Controle positivo para <i>P. aeruginosa</i> , Teste “D”
<i>P. aeruginosa</i> 101-4704	PCR - <i>bla</i> _{IMP}
<i>P. aeruginosa</i> A1254	PCR - <i>bla</i> _{VIM}
<i>A. baumannii</i> YMC03/9/T104	PCR - <i>bla</i> _{SIM}
<i>P. aeruginosa</i> 75-5671	PCR - <i>bla</i> _{GIM}
<i>P. aeruginosa</i> 48-1997	TSDD ¹ ; PCR ² - <i>bla</i> _{SPM}
<i>A. baumannii</i> 1144	PCR - <i>bla</i> _{OXA51} , <i>bla</i> _{OXA23} , <i>bla</i> _{OXA40} <i>bla</i> _{OXA48}
<i>K. pneumoniae</i> ^a	PCR - <i>bla</i> _{KPC} , Teste de hodge
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Teste de Hodge
PAO1	Controle qRT-PCR ³

^aAmostra clínica previamente isolada no HC-UFU e molecularmente caracterizada no MICROMOL-ICBIM.

¹Teste de Sinergismo com Duplo Disco; ²Reação em Cadeia da Polimerase; ³Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativo.

3.5 Coleta e Hemocultura

A coleta do material clínico (sangue) foi realizada por punção periférica pelos profissionais do setor de coleta do hospital e a hemocultura foi realizada no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU através do sistema automatizado *BacT/ALERT*® (BioMérieux).

3.6 Identificação

A identificação dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada utilizando-se o sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux) no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. Brevemente, os isolados clínicos foram suspensos em solução salina 0,45% com turbidez compatível à escala de 0,50 a 0,63 de McFarland, medida em turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado automaticamente. Durante o período de incubação (7-10 horas) os cartões foram lidos a cada 15 minutos através de um sistema óptico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados foram analisados pelo *software* do aparelho através de algoritmos e reportados automaticamente.

3.7 Testes de Sensibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* também foi realizada utilizando-se o sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux) no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. Brevemente, os isolados foram suspensos em solução salina 0,45% com turbidez compatível à escala de 0,50 a 0,63 de McFarland e em seguida, diluídos conforme as recomendações do fabricante. Os cartões foram inseridos no aparelho e automaticamente preenchidos com as suspensões bacterianas. No cartão, os antimicrobianos são encontrados em duas a quatro concentrações diferentes. Cada poço com o antibiótico teste é avaliado automaticamente a cada 15 minutos durante 18 horas. Esses dados são usados para gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, o MIC (do inglês, “*Minimum Inhibitory Concentration*”) de cada antibiótico é estimado. Esse cálculo é realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano independente da espécie do micro-organismo.

3.8 Armazenamento das bactérias

Os isolados de *P. aeruginosa* provenientes de sangue, identificados no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (MICROMOL). Foram então cultivados em TSA (*Tryptic Soy Agar*) pela técnica de esgotamento para obtenção de culturas pura e, posteriormente, armazenada em tubos criogênicos contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 15% de glicerol, seguindo-se de incubação a 37°C por 24 horas. A suspensão resultante foi estocada à temperatura de -20°C (KONEMAN et al., 2001).

3.9 Técnicas Fenotípicas

3.9.1 Teste de Hodge – Carbapenemase (LEE et al., 2001, com modificações)

Uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland de *E.coli* ATCC 25922 foi preparada em caldo TSB, diluída (1:10) e, em seguida, uma alíquota foi semeada em placa de *Petri* contendo ágar *Mueller-Hinton* (MH) de maneira a obter um crescimento confluyente. No centro da placa foi adicionado um disco de meropenem (10µg) e o isolado a ser testado foi semeado estriadamente (por cima da *E. coli*) da borda do disco até a periferia da placa. Após incubação *overnight* a 37°C, a presença de uma distorção – endentação – na zona de inibição da *E. coli* próximo a borda do inóculo da amostra teste foi interpretado como teste positivo para presença de atividade carbapenemase.

3.9.2 Teste de Sinergismo com Duplo-Disco (TSDD) - Fenótipo Metallo-β-Lactamase (LEE et al., 2003, com modificações)

Os isolados foram suspensos em caldo TSB com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland e, em seguida, uma alíquota foi semeada em placa de *petri* contendo ágar MH de maneira a obter crescimento confluyente. Foram adicionados sobre o ágar discos de ceftazidima (30µg) e imipenem (30µg) como indicadores, posicionados ao lado de discos esterilizados de papel-filtro contendo as seguintes quantidades de agentes quelantes: 3µL de solução de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) e outro contendo 10µL de solução de ácido-etileno-diamino-tetracético (EDTA) 0,1M. As distâncias pré-

determinadas entre os discos de antibiótico e os discos contendo quelantes foram: 20 mm para o disco com 2-MPA e 15 mm para o disco com EDTA. Após incubação *overnight* a 37°C, a observação de distorção e/ou aumento no halo de inibição em torno dos discos indicadores caracterizou o teste positivo para a presença de MBL.

3.9.3 Teste de disco antagonismo ou teste “D” - Fenótipo AmpC-induzido (DUNNE; HARDIN, 2005)

Os isolados foram suspensos em caldo TSB com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland e, em seguida, uma alíquota foi semeada em placa de *Petri* contendo ágar MH de maneira a se obter crescimento confluyente. Foram adicionados sobre o ágar discos de imipenem (30µg) como indutor ao centro da placa e os seguintes discos de antibióticos (substratos): ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), ceftoxitina (30µg), piperacilina/tazobactam (10/100µg) equidistantes 25 mm do indutor (de centro a centro do disco,). Após incubação *overnight* a 37°C, a observação de um antagonismo entre o indutor e um dos substratos, caracterizado pela forma de um “D”, com uma zona de inibição ≥ 20 mm na área induzida do substrato, caracterizou o teste como positivo para a produção induzível da AmpC.

3.10 Técnicas Moleculares

3.10.1 PCR *end point* e multiplex PCR

A detecção dos genes codificadores de Metallo-β-lactamase (MBL) e OXA-carbapenemase (OXA) foi realizada utilizando-se o método de PCR multiplex, segundo o protocolo de Xavier e colaboradores, 2010 e Woodford, 2010, respectivamente. O gene *bla_{KPC}* foi determinado por meio de PCR *end point*, segundo o protocolo de Galleti, 2010. Os *primers* específicos utilizados e as referências dos protocolos seguidos nas reações estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Primers específicos para detecção dos genes codificadores de carbapenemases

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>blaIMP</i>	IMPgen-F1	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	188	XAVIER, 2010
	IMPgen-R1	CCAAACYACTASGTTATC		
<i>blaVIM</i>	VIMgen-F2	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	
	VIMgen-R2	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>blaGIM</i>	GIM-F1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72	
	GIM-R1	CGGAACGACCATTGGAATGG		
<i>blaSIM</i>	SIM-F1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	569	
	SIM-R1	TGGCCTGTTCCCATGTGAG		
<i>blaSPM</i>	SPM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798	
	SPM-R1	CCTTTTCCGCGACCTTGATC		
<i>blaOXA-51</i>	OXA51-F1	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	WOODFORD, 2010
	OXA51-R1	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>blaOXA-23</i>	OXA23-F2	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	
	OXA23-R2	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
<i>blaOXA-40</i>	OXA40-F1	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	496	
	OXA40-R1	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>blaOXA-58</i>	OXA58-F1	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	
	OXA58-R1	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>blaKPC</i>	KPC-F1	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG	860	GALLETI, 2010
	KPC-R1	GTTGACGCCCAATCCCTCGA		

3.10.1.1 Extração do DNA por lise térmica

Para a extração do DNA genômico de *P. aeruginosa*, os isolados foram cultivados em ágar MacConkey por 18-24 horas. Foram selecionadas colônias puras e isoladas que foram ressuspensas e lavadas em 1mL de tampão Tris-EDTA [1X] (TE) contido em tubos de 1,5 mL. Após centrifugação a 12000xg por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactérias ressuspensado novamente para outra lavagem em 1mL de tampão TE [1X]. Após nova centrifugação a 12000xg por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 1mL de tampão TE para a etapa de fervura.

Os tubos foram então fervidos a 100°C por 10 minutos em banho maria ou termobloco e novamente centrifugados a 12000xg por 2 minutos. Foi recuperado 500µL do sobrenadante com DNA. O DNA extraído foi quantificado em relação a sua concentração, expressa em ng/µL, através da medida de absorbância 280nm em espectrofotômetro (NanoDrop®), e, concomitantemente, analisados quanto a pureza, determinada pela razão 260/280 nm. Após a leitura, o DNA extraído considerado puro, ou seja, dentro do limiar entre 1.9 e 2.1, foi armazenado a -20°C até o momento da utilização.

3.10.1.2 Amplificação

Para a amplificação dos genes foi utilizado 1µL da suspensão do DNA extraído anteriormente. A reação foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura, solução tampão da Taq [10X] diluído para uma concentração final de [1X], 0,05 U de Taq DNA polimerase com MgCl₂ (Promega Corporation), desoxirribonucleotídeos (dNTPs) 0,2 mM (Promega Corporation) e 0,5µM dos *primers* específicos. A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler* com as condições descritas na tabela 4.

Tabela 4. Condições para amplificação nas reações de detecção dos genes codificadores de carbapenemases por PCR

	Multiplex para genes MBL ¹	Multiplex para genes OXA ²	PCR para KPC ³
Desnaturação inicial	94°C por 5 min	94°C por 5 min	95°C por 5 min
Desnaturação	94°C por 25 seg.	94°C por 30 seg.	95°C por 1 min
Anelamento	53°C por 40 seg.	52°C por 45 seg.	61°C por 1 min
Extensão	72°C por 50 seg.	72°C por 30 seg.	72°C por 1 min
Extensão final	72°C por 6 min	72°C por 10 min	72°C por 10 min

¹XAVIER et al, 2010; ²WOODFORD, 2010; ³GALLETI, 2010.

3.10.1.3 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos da reação foi realizada através da eletroforese em gel de agarose aplicando-se 5 µL dos produtos da PCR. O gel de agarose foi preparado a 1,5% utilizando tampão Tris-ÁcidoBórico-EDTA (TBE) [0,5x] acrescido com 1 µL de SYBR® Safe (Invitrogen) para cada 20 mL de gel produzido. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (BioAmerica Inc). A eletroforese foi conduzida em voltagem constante de 90V, durante 90 minutos, e o gel foi fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

3.10.2 Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real - qRT-PCR (XAVIER et al., 2010, com modificações)

Utilizando-se os pares de *primers* descritos na tabela 5, a quantificação relativa da expressão dos genes que codificam componentes dos sistemas de efluxo, *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*; do gene *oprD* que codifica a proteína de membrana externa e *ampC* foi conduzida para 14 isolados não-MBL (caracterizados na tabela 6) pela técnica de qRT-PCR e comparada com a expressão da cepa PAO1 (amostra referência/calibradora). O gene *rpsL* foi utilizado como controle endógeno da reação para normalização dos dados de expressão transcricional dos genes alvo.

Tabela 5. *Primers* utilizados na reação de qRT-PCR

Genes	Sistema ou Proteína alvo	Primer	Sequência 5' - 3'
<i>mexB</i>	MexAB-OprM	mexB-F mexB-R	GTGTTCGGCTCGCAGTACTC AACCGTCGGGATTGACCTTG
<i>mexD</i>	MexCD-OprJ	mexD-F mexD-R	CGAGCGCTATTCGCTGC GGCAGTTGCACGTCGA
<i>mexF</i>	MexEF-OprN	mexF-F mexF-R	CGCCTGGTCACCGAGGAAGAGT TAGTCCATGGCTTGCGGGAAGC
<i>mexY</i>	MexXY	mexY-F mexY-R	CCGCTACAACGGCTATCCCT AGCGGGATCGACCAGCTTTC
<i>oprD</i>	OprD	oprD-F oprD-R	TCCGCAGGTAGCACTCAGTTC AAGCCGGATTCATAGGTGGTG
<i>ampC</i>	AmpC	ampC-F ampC-R	CTGTTCGAGATCGGCTC CGGTATAGGTCGCGAG
<i>rpsL</i>	-	rpsL-F rpsL-R	GCAAGCGCATGGTCGACAAGA CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA

Tabela 6. Caracterização dos isolados incluídos para análise de Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real

Isolado	Número RT-PCR ¹	Data isolamento	Clínica	Resistência CBP ²	PCR ⁴ MBL	Fenótipo AmpC	Perfil de resistência
PA8	1	26/07/2010	Clínica Médica	+	-	-	CAZ ⁵ , PPTAZ ⁶ , IMI ⁷ , CIP ⁹ , LEV ¹⁰ , GEN ¹¹ , AZT ¹²
PA11	2	17/10/2010	UTI ³ adulto	+	-	+	CPM ¹³ , IMI, MER ⁸ , CIP, GEN, AMK ¹⁴ , AZT
PA14	3	17/12/2010	UTI adulto	+	-	+	CAZ, CPM, PPTAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AMK, AZT
PA20	4	18/02/2011	UTI adulto	+	-	+	CPM, IMI, MER, CIP, GEN, AMK, AZT
PA21	5	31/01/2011	Cirúrgica	+	-	+	CAZ, CPM, PPTAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AZT
PA25	6	06/03/2011	Clínica Médica	+	-	+	CAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AZT
PA27	7	29/04/2011	UTI adulto	+	-	-	CAZ, CPM, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AMK
PA29	8	07/06/2011	UTI adulto	+	-	+	IMP, MER
PA31	9	11/07/2011	Cirúrgica	+	-	+	IMP
PA35	10	19/11/2011	UTI adulto	+	-	+	CAZ, CPM, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AMK, AZT
PA46	11	08/06/2012	UTI adulto	+	-	-	CAZ, CPM, IMI, MER
PA47	12	02/07/2012	Cirúrgica	+	-	+	IMI
PA49	13	22/07/2012	Cirúrgica	+	-	+	IMI, MER
PA51	14	14/08/2012	Pronto Socorro	+	-	+	CAZ, CPM, PPTAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN

¹qRT-PCR, Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real; ²CBP, Carbapenêmicos; ³UTI, Unidade de Terapia Intensiva; ⁴PCR MBL, Reação em Cadeia de Polimerase para Metallo-β-lactamase; ⁵CAZ, Ceftazidima; ⁶PPTAZ, Piperacilina/Tazobactam; ⁷IMP, Imipenem; ⁸MER, Meropenem; ⁹CIP, Ciprofloxacina ¹⁰LEV, Levofloxacina; ¹¹GEN, Gentamicina; ¹²AZT, Aztreonam; ¹³CPM, Cefepime; ¹⁴AMK, Amicacina

+ ou – (Positivo ou Negativo para resistência aos carbapenêmicos; genes MBL e fenótipo AmpC pelo teste

3.10.2.1 Extração de RNA total

O RNA total dos isolados foi obtido a partir de uma suspensão bacteriana em fase exponencial de crescimento (OD_{600} de 0,6-1,0) e extraído utilizando o *Kit SV Total RNA Isolation System* (Promega Biotecnologia®), seguindo as recomendações do fabricante. Durante o processo de extração do RNA total as amostras foram tratadas com desoxiribonuclease (DNase) para eliminar a possível contaminação com DNA residual bacteriano. As amostras de RNA total foram quantificadas em relação a sua concentração, expressa em ng/ μ L, através da medida de absorbância 260 e 280nm em espectrofotômetro (NanoDrop®), e, concomitantemente, as amostras foram analisadas quanto a pureza determinada pela razão A260/280. As amostras de RNA total que foram situadas dentro do limiar entre 1,9 e 2,1 foram consideradas puras e, então, armazenadas a -80 °C para posterior processamento e análise.

3.10.2.2 Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 5 μ g do RNA total extraído utilizando o kit *GoScript Reverse Transcription System* (Promega Biotecnologia®), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, acrescentou-se ao RNA experimental 0.5 μ g de Primer Oligo (dT)₁₅ e incubou-se a 70°C durante 5 minutos. Ao término do aquecimento, as amostras foram imediatamente resfriadas em água com gelo por pelo menos 5 minutos e mantidas em gelo até o momento da adição do *mix* de reação de transcrição reversa.

O *mix* de reação da enzima Transcriptase Reversa foi preparado em gelo contendo água livre de nuclease, tampão de reação da enzima, cloreto de magnésio (MgCl₂), dNTPs, inibidor de ribonuclease e a enzima, à concentrações determinadas pelo fabricante. A combinação de RNA-primer foi adicionada ao *mix* da enzima e então colocada em termociclador com as seguintes condições: anelamento inicial a 25° C durante 5 minutos e extensão a 42° C durante até uma hora. As amostras foram então incubadas a 70° C por 10 minutos para inativação da enzima transcriptase reversa. O cDNA foi mantido a -20° C antes de prosseguir com o PCR quantitativo.

3.10.2.3 Reação de qRT-PCR

A quantificação relativa da expressão dos genes estudados foi realizada pela técnica de qRT-PCR no Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia (CREDESH) da UFU. O princípio do método baseia-se na detecção da fluorescência no tubo de reação à medida que a dupla fita de DNA é gerada.

A reação de PCR em tempo real foi preparada utilizando o kit *VeriQuest Fast SYBR Green qPCR Master Mix* (Affymetrix®) para um volume final de 25 µL, contendo 10 pmol de cada primer (anteriormente descritos na tabela 5) e 2 µL do cDNA. As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, acompanhadas de um controle de ausência de contaminação de material genético, utilizando um termociclador em tempo real (Applied Biosystem, modelo 7300®), com a seguinte programação: 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C por 30 segundos, de acordo com informações técnicas do fabricante. A realização da curva de dissociação dos *primers*, ou curva de “melting”, foi adicionada ao final da termociclagem para confirmação da especificidade dos *primers*, ou seja, de que não houve a formação de produtos inespecíficos, garantindo a formação de um único produto (única sequência de DNA).

3.10.2.4 Análise da expressão gênica

Considerando uma eficiência de 100% dos *primers* (XAVIER, et al, 2010) a expressão relativa dos genes-alvo foi obtida pelo método do Ct comparativo, também denominado delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), segundo PFAFFL, 2001 e LIVAK & SCHMITTGEN, 2001. Neste modelo matemático, o valor de ΔCt foi obtido pela subtração do valor de cada gene-alvo pelo valor da média de Ct do gene *rpsL* (controle interno); o valor de $\Delta\Delta Ct$ foi obtido pela subtração do valor da média de Ct da amostra desconhecida pelo valor da média de Ct da amostra de referência (PAO1). O valor de Quantificação Relativa final (RQ) foi obtido pela elevação negativa do valor de $\Delta\Delta Ct$ na base 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Dessa maneira, o resultado da expressão relativa indica quantas vezes um gene é expresso em uma amostra, em relação à expressão desse mesmo gene para a cepa utilizada como referência (PAO1).

Os sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY foram considerados hiperexpressos quando os níveis transcricionais de *mexB*, *mexD*,

mexF e *mexY* foram pelo menos 2, 100, 100 e 4 vezes maior em relação à expressão dos genes da amostra de referência PAO1. A redução na expressão da porina OprD e a hiperprodução de AmpC foram considerados positivos quando a expressão de *ampC* e *oprD* foram ≥ 10 vezes e $\leq 70\%$, respectivamente, em relação a cepa PAO1.

3.10.3 Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A escolha dos isolados para essa análise foi baseada nos resultados obtidos no PCR para os genes codificadores das metalo- β -lactamases.

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 3 mL de caldo TSB e incubada *overnight* a 37° C, sob agitação a 200 rpm. Após o período de incubação, a medida da densidade óptica da suspensão bacteriana resultante foi ajustada para 0,9 a 1,10 (OD_{640nm}). Uma alíquota de 200 μ L da suspensão celular foi transferida para um tubo *eppendorf* centrifugada a 12.000 xg e 4 °C por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuscitado em 200 μ L de tampão TE, e 200 μ L de agarose *low melting point* 2,2% (Ludwig Biotec) preparada em tampão TE foi adicionada em cada tubo para confecção dos blocos. Os blocos foram mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos até a solidificação.

Os blocos de agarose foram transferidos para tubos contendo 5 mL de solução de lise (50 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA pH 8,0; Sarcosyl 1%) acrescido de proteinase K na concentração final de 1 mg/mL. Os tubos foram mantidos sob leve agitação (aproximadamente 70 rpm) durante 4 horas a 55° C. Após essa etapa, seguiu-se para a lavagem dos blocos, a solução de lise foi retirada e adicionou-se 10 mL de tampão TE [1X]. Os tubos foram mantidos na estufa a 37° C sob leve agitação, durante 30 minutos. A etapa de lavagem se repetiu por pelo menos 5 vezes sendo a última *overnight*.

Para digestão do DNA, uma pequena parte do bloco de agarose (2 mm) foi incubada em 40 μ L da solução tampão da enzima *SpeI* 1X (Vivants) e mantida a 37 °C por 2 horas. Essa solução foi desprezada, e uma nova solução acrescida de 30 U da enzima de restrição *SpeI* foi adicionada. A reação foi incubada a 37 °C por 4 horas.

Para a corrida eletroforética, foi preparado gel de agarose 1% (Agarose Campo Pulsado, Agargen) em TBE [0,5X]. Os blocos de agarose já digeridos foram dispostos no pente e o peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs) foi colocado após a solidificação do gel, diretamente nos poços. A corrida eletroforética foi realizada em aparelho Chef DRIII System (Bio Rad, USA), utilizando-se solução tamponante TBE [0,5X], nas seguintes condições: pulso inicial de 5 segundos e final de 40 segundos, ângulo de 120°, 6 V/cm, a temperatura de 12° C durante 21 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 1µg/mL sob leve agitação por 45 minutos, e descorado em água destilada pelo mesmo período de tempo.

O perfil eletroforético de macrorrestrrição foi analisado utilizando o software BioNumerics versão 5.01 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética dos isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice e o dendrograma foi construído segundo o método UPGMA (do inglês, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). Isolados com similaridade genética superior a 80% foram considerados do mesmo tipo clonal.

3.11 Análise Estatística

Os fatores de risco foram avaliados individualmente contra uma variável resposta (análise univariada) através de tabelas de contingência do tipo dois por dois (2 x 2) utilizando-se o teste do χ^2 para comparação entre os valores quando o n foi maior que 5 e o teste exato de Fisher quando o n foi menor ou igual a cinco. Para comparar variáveis quantitativas foram utilizados os testes *t* de *Student* ou U de Mann Whitney, quando apropriado. Os fatores de risco significativos na análise univariada foram avaliados através de análise multivariada por meio de regressão logística múltipla. O Coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para análise da relação entre o consumo de antimicrobianos e a incidência de bacteremia por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier foi construída e a análise da significância foi obtida através do teste Log-Rank. A significância estatística foi definida por um valor de $P \leq 0,05$ utilizando os programas estatísticos Graph Pad Prism 5.0® e Bioestat 5.0®.

3.12 Análise pelo Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob os números de protocolo 550/09 e 47897 (ANEXO II).

4. RESULTADOS

4.1. População de estudo

No período de maio/2009 a dezembro/2012, 157 pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com bacteremia por *P. aeruginosa* foram incluídos no estudo. No total, 161 episódios/isolados de bacteremia foram observados (Apêndice I). O estudo epidemiológico-molecular e os experimentos realizados com breves resultados estão resumidos na figura 2.

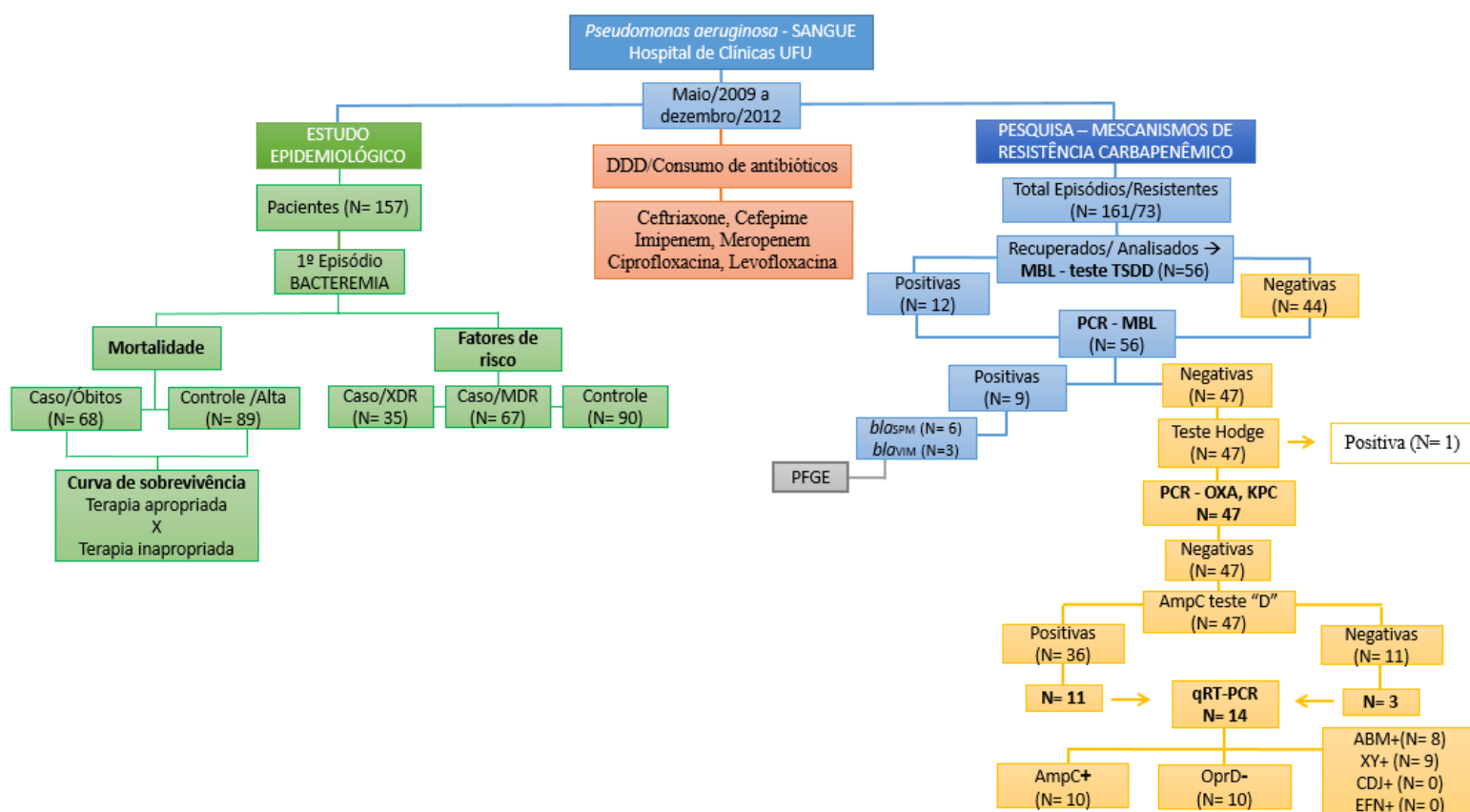


Figura 2. Organograma da população estudada referente à bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa*. MDR, Multi-resistente; XDR, Extensivamente resistente; MBL, Metallo- β -Lactamase; TSDD, Teste de Sinergismo com Duplo-Disco; PCR, Reação em Cadeia de Polimerase; OXA, Oxacilinase tipo carbapenemase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; qRT-PCR, Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real quantitativo. AmpC+, Hiperprodução de AmpC, OprD-, Perda de porina OprD, ABM+, XY+, CDJ+ e EFN+, Hiperexpressão de bombas de efluxo.

4.2. Estudo epidemiológico – Pacientes, fatores de risco e mortalidade

A distribuição dos pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* entre as unidades hospitalares do HC-UFU está descrita na tabela 7. Do total de 157 pacientes incluídos no estudo, 46 (29,3%) foram admitidos na Unidade de Terapia Intensiva de adultos (UTI adultos), seguido de Unidades Cirúrgicas (N= 36; 22,9%) e Clínica Médica (N= 17; 27,2%). A maioria dos pacientes que tiveram bacteremia por *P. aeruginosa* resistente à carbapenêmico (considerando 1º episódio) (70/157; 44,6%) apresentou a mesma distribuição por unidades hospitalares, nas seguintes proporções: 26 (37,1%) na UTI de adultos, 21 (30,0%) em Unidades Cirúrgicas e 14 (20,0%) na Clínica Médica.

Tabela 7. Distribuição dos pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* e daqueles com isolados resistentes aos carbapenêmicos entre as unidades hospitalares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Unidade hospitalar	Total N = 157 (%)	Resistente Carbapenêmicos N = 70 (%)
UTI¹ adulto	46 (29,3)	26 (37,1)
Unidades Cirúrgicas	36 (22,9)	19 (27,1)
Clínica Médica	27 (17,2)	11 (15,7)
Unidade de Oncologia	14 (8,9)	3 (4,3)
Pediatria	13 (8,3)	1 (1,4)
Pronto Socorro	10 (6,4)	6 (8,6)
UTI Pediátrica	1 (0,6)	1 (1,4)
UTI Neonatal	3 (1,9)	0 (-)
Outras	7 (4,5) ²	3 (4,3) ³

¹Unidade de Terapia Intensiva

²4 Moléstia Infecciosa, 2 Unidade de Transplante e 1 Unidade de Queimados

³3 Moléstia Infecciosa

Quando foi feita a análise da incidência dos episódios de bacteremia por 1000 pacientes/dia entre as unidades hospitalares, observou-se que a maior incidência de isolados de *P. aeruginosa* de bacteremia foi na UTI de adultos (1,9/1000 pacientes-dia), seguido de Unidade de Oncologia (0,5/1000 pacientes-dia), Clínica Médica (0,39/1000 pacientes-dia) e Pediatria (0,32/1000 pacientes-dia); e daqueles isolados resistentes aos carbapenêmicos foi na UTI de adulto (0,55/1000 pacientes-dia), seguido de Clínica Médica (0,2/1000 pacientes-dia, ambos), Moléstia Infecciosa (0,16/1000 pacientes-dia) e Unidades Cirúrgicas (0,15/1000 pacientes-dia) (Figura 3).

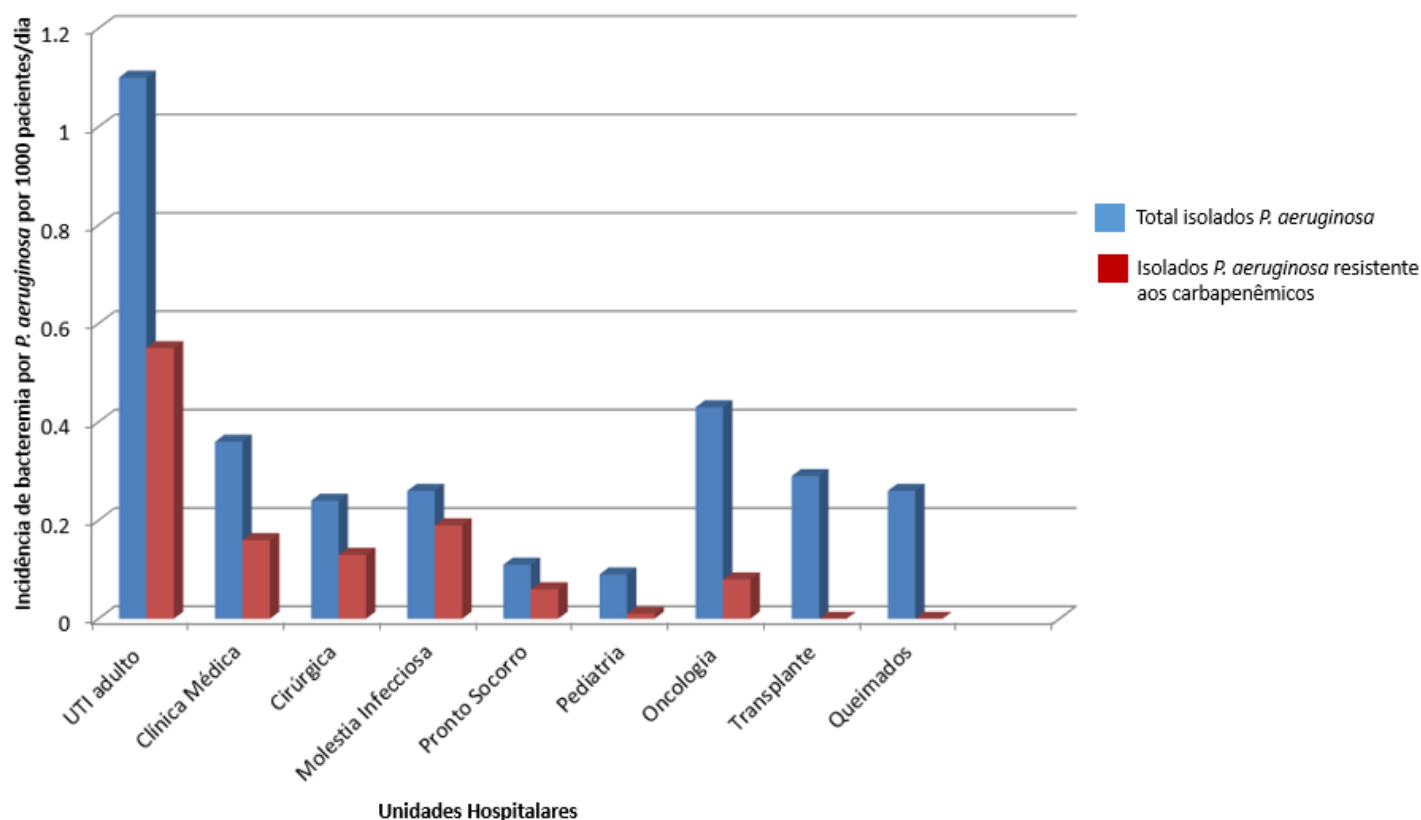


Figura 3. Incidência do total de bacteremia por *P. aeruginosa*/1000 pacientes-dia e daquelas por isolados resistentes aos carbapenêmicos entre as unidades hospitalares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Durante o período de estudo de 44 meses, a taxa por 1000 pacientes-dia de bacteremia por *P. aeruginosa* e daquelas por isolados resistentes aos carbapenêmicos foi de 13,21 e 6,34, respectivamente, sendo que de maio a dezembro de 2009 a taxa foi de

0,74; 1,58 no ano de 2010, aumentando para 2,44 em 2011. O número total de pacientes-dia foi 538,4 e a média do número de pacientes-dia com bacteremia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos foi $5,66 \pm 2,44$. As taxas de mortalidade para o total de 157 pacientes e para aqueles com bacteremia por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (N= 70) foi de 43,3% e 50,0%, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Taxas e indicadores epidemiológicos de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos no Hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Variáveis	Indicadores
Paciente-dia	538,4
Pacientes-dia com bacteremia por <i>P.aeruginosa</i> resistente a CBP (média \pm desvio padrão)	$5,66 \pm 2,44$
Bacteremia por <i>P. aeruginosa</i> total/1000 pacientes-dia	13,21
Bacteremia por <i>P. aeruginosa</i> resistente CBP/1000 pacientes-dia	6,34
Mortalidade total em 157 pacientes	43,3%
Mortalidade total em 70 pacientes com isolados resistentes a CBP	50,0%

CBP, Carbapenêmicos

A taxa de ocorrência de bacteremia por *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos/1000 pacientes-dia no mês de dezembro de 2010 foi mais alta do que o limite de controle superior estabelecido em 3σ acima da média de incidência dos casos de infecção, o que pode ser descrito como um surto (Figura 4). A taxa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmico foi de 0,66/1000 pacientes-dia no mês de dezembro/2010 e caiu para 0,18/1000 pacientes-dia no final de fevereiro de 2011, quando foi observado o término do surto de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmico e início de um período de endemicidade no hospital (média de 0,16 *P. aeruginosa*/1000 pacientes-dia). No período do surto, os pacientes estavam internados principalmente em UTI de adultos, e alguns em Unidades Cirúrgicas.

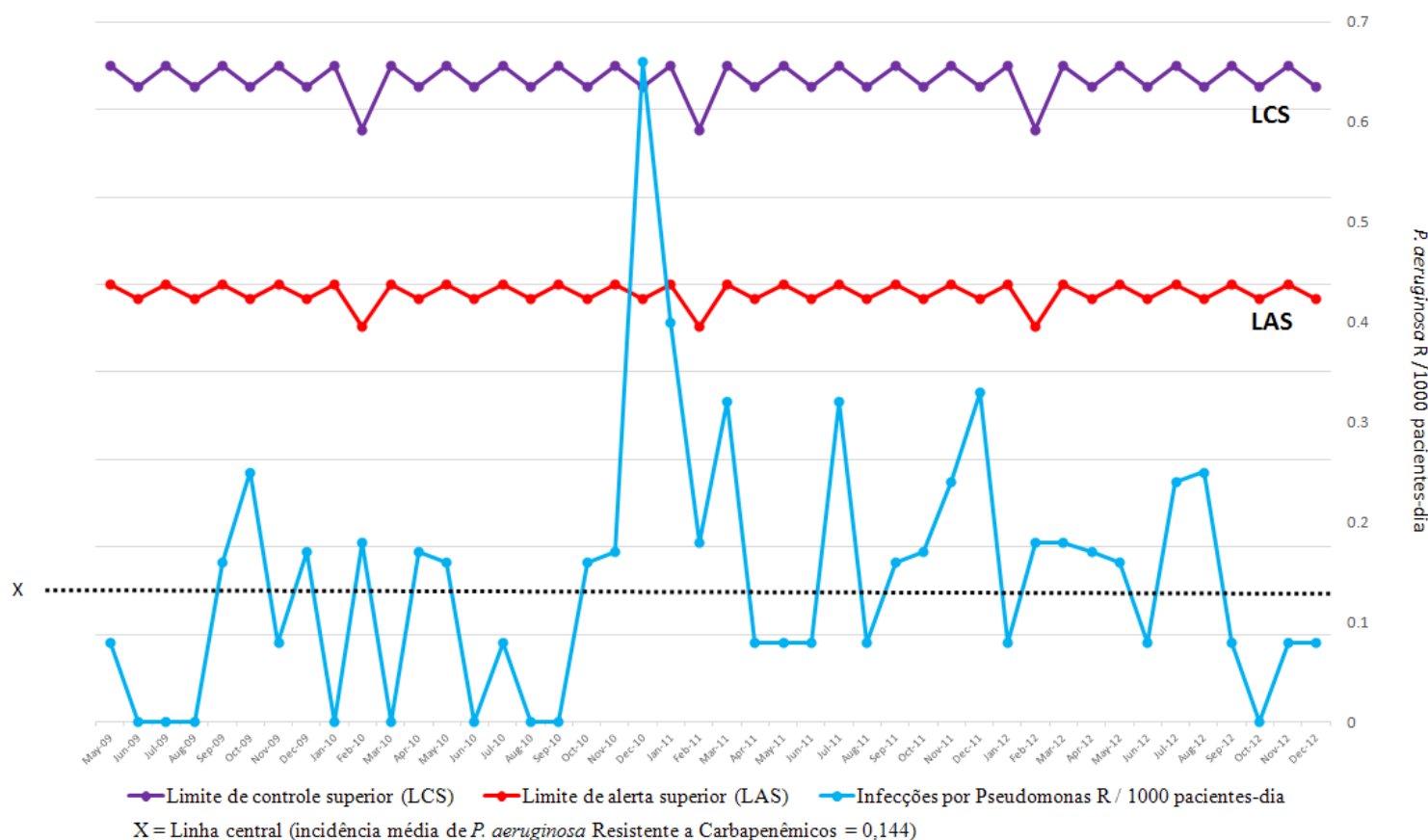


Figura 4. Nível endêmico de bacteremia por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos por 1000 pacientes-dia no período de março de 2009 a dezembro de 2012.

A figura 5 traz a relação entre a dose diária definida dos antimicrobianos/1000 pacientes-dia e o número de pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos/1000 pacientes-dia. Foi observado alto consumo de ceftriaxone, cefepime e meropenem no período de estudo com tendência ascendente entre o início e o final do período estudado (Apêndice II). Não foi observada correlação positiva entre o aumento na incidência de isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos e o consumo de antibióticos.

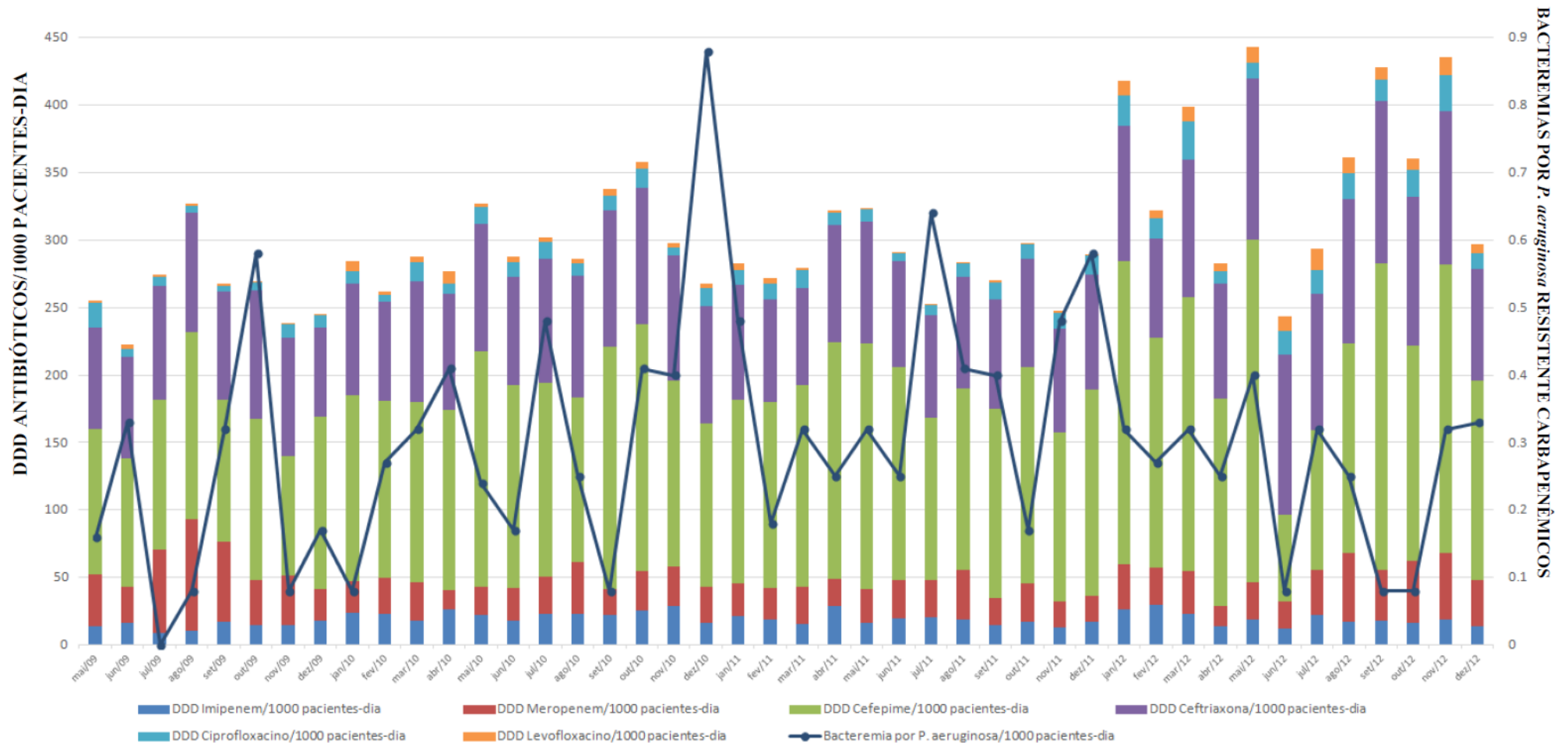


Figura 5. Relação entre a dose diária definida dos antimicrobianos por 1000 pacientes-dia e o número de pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos por 1000 pacientes-dia no Hospital de Clínicas Universidade Federal de Uberlândia no período de estudo.

As características clínico-demográficas relevantes da população estudada e os fatores de risco associados com a mortalidade hospitalar estão apresentados na tabela 9, (referenciada na dissertação de Ferreira e colaboradores, 2014). A idade média dos pacientes foi de 51 anos (0 – 89), sendo a maioria do gênero masculino (N= 105; 66,8%), e o tempo médio de internação foi de 57 dias. Cerca de 76% dos pacientes apresentaram bacteremia primária, sendo a maioria (N= 98; 62,4%) com foco desconhecido e 13,8% (N= 21) relacionada ao uso do Cateter Venoso Central (CVC). Entre as secundárias (N= 38; 24,2%), o trato respiratório foi a origem mais frequente (N= 27; 17,2%), seguida de trato urinário (N= 6; 3,8%). O uso de procedimentos invasivos foi frequente na população estudada (N=139; 88,5%), com destaque para uso de Ventilação Mecânica (N= 89; 56,7%), CVC (N= 125; 79,6%), sonda nasogástrica ou nasoenteral (N= 109; 69,4%) e cateter urinário (N= 101; 64,3%). Aproximadamente 44% (N= 69) dos pacientes passaram por cirurgia e as principais comorbidades observadas foram: insuficiência renal crônica (N= 40; 25,5%), cardiopatia (N= 35; 22,3%) e câncer (N= 32; 20,4%).

O resultado dos fatores de risco associados com mortalidade hospitalar através da análise multivariada evidenciou que os preditores independentemente associados aos pacientes que foram ao óbito em 30 dias incluíram doença de base grave, como câncer ($P= 0,012$; OR= 3,18), bem como pacientes que receberam terapia antimicrobiana inapropriada ($P= 0,0026$; OR= 3,23). A maioria dos pacientes (N= 81; 56,6%) tiveram ASIS ≥ 4 , caracterizando uma população crítica e semelhante entre os grupos alta e óbito, sem diferença estatística. A taxa de mortalidade hospitalar para os pacientes que receberam terapia inapropriada foi de 47,1%, contra 19,1% para pacientes que receberam terapia apropriada, corroborando com o resultado da curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier*, que demonstrou que o grupo de pacientes que receberam terapia antimicrobiana inapropriada teve menor probabilidade de sobrevivência e em menor tempo (Figura 6).

Tabela 9. Fatores de risco associados com mortalidade hospitalar em 30 dias em pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Fatores de Risco	Total N=157(%)	Óbito N= 68 (%)	Alta N=89 (%)	Univariada OR ¹ (IC ² 95%)	P ³	Multivariada OR (IC 95%)	P
Idade-média	51.36±25.10	56.10 ±22.74	47.73 ±26.31	-	0.065	-	-
Gênero Masculino	105 (66.8)	44 (64.7)	61 (68.5)	0.84 (0.43-1.64)	0.737	-	-
Gênero Feminino	52 (33.1)	24 (35.3)	28 (31.5)	1.18 (0.60-2.31)	0.737	-	-
Tempo de hospitalização-média (dias)	57.01±56.93	30.90 ±26.34	76.97 ±65.48	-	0.0001*	-	-
Unidade de Terapia Intensiva	74 (47.1)	32 (47.1)	42 (47.2)	0.99 (0.52-1.87)	0.884	-	-
Cirurgia	69 (43.9)	30 (44.1)	39 (43.8)	1.01 (0.53-1.91)	0.9	-	-
Procedimentos Invasivos	139 (88.5)	61 (89.7)	78 (87.6)	1.22 (0.44-3.35)	0.88	-	-
Ventilação Mecânica	89 (56.7)	40 (58.8)	49 (55.0)	1.16 (0.61-2.21)	0.756	-	-
Traqueostomia	70 (44.6)	32 (47.1)	38 (42.6)	1.19 (0.63-2.25)	0.701	-	-
Cateter Urinário	101 (64.3)	48 (30.6)	53 (59.5)	1.63 (0.83-3.19)	0.206	-	-
Cateter Venoso Central	125 (79.6)	57 (83.8)	68 (76.4)	1.60 (0.71-3.59)	0.345	-	-
Dreno cirúrgico	24 (15.3)	12 (17.6)	12 (13.5)	1.37 (0.57 3.28)	0.62	-	-
SNG⁴/ SNE⁵	109 (69.4)	53 (33.7)	56 (62.9)	2.08 (1.01-4.26)	0.064	-	-
Hemodiálise	39 (24.8)	21 (13.4)	18 (20.2)	1.76 (0.84-3.65)	0.178	-	-
Nutrição Parenteral	25 (15.9)	10 (14.7)	15 (16.8)	0.85 (0.35-2.03)	0.885	-	-
Comorbidades	123 (78.3)	61 (89.7)	62 (69.6)	3.79 (1.53-9.36)	0.004*	2.42 (0.89-6.60)	0.083
Cardiopatia	35 (22.3)	18 (26.5)	17 (19.1)	1.52 (0.71-3.24)	0.365		
Câncer	32 (20.4)	21 (13.4)	11 (12.3)	3.16 (1.40-7.15)	0.007*	3.18 (1.28-7.90)	0.012*
Diabetes Mellitus	21 (13.4)	11 (16.2)	10 (11.2)	1.52 (0.60-3.83)	0.506	-	-
Insuficiência Renal Crônica	40 (25.5)	22 (32.3)	18 (20.2)	1.88 (0.91-3.89)	0.122	-	-
HIV⁶	10 (6.4)	8 (11.8)	2 (2.2)	5.80 (1.18-8.27)	0.020*	4.54 (0.80-5.70)	0.086
ASIS⁷ ≥ 4	81 (56,6)	39 (57.3)	42 (47.2)	1.50 (0.79-2.84)	0.270	-	-

Bacteremia Primária	119 (75.8)	46 (67.6)	73 (82.0)	0.45 (0.21-0.96)	0.057	0.76 (0.19-3.12)	0.711
Relacionada ao CVC⁸	21 (13.8)	6 (8.8)	15 (16.8)	0.47 (0.17-1.30)	0.219	-	-
Desconhecida	98 (62.4)	40 (58.8)	58 (85.3)	0.76 (0.39-1.46)	0.517	-	-
Bacteremia Secundária	38 (24.2)	22 (32.3)	16 (17.9)	2.18 (1.03-4.58)	0.06	-	-
Trato respiratório	27 (17.2)	17 (25.0)	10 (11.2)	2.63 (1.11-6.20)	0.040*	2.20 (0.45-10.90)	0.325
Trato urinário	6 (3.8)	2 (2.9)	4 (4.4)	0.64 (0.11-3.62)	0.698	-	-
Outros⁹	5 (3.2)	3 (4.4)	2 (2.2)	2.00 (0.32-2.36)	0.652	-	-
Terapia Inapropriada	49 (31.2)	32 (47.1)	17 (19.1)	3.76 (1.84-7.66)	0.0003*	3.23 (1.50-6.94)	0.0026*

¹Do inglês “*Odds Ratio*”; ²Intervalo de Confiança; ³Valor de *P*; ⁴Sonda Nasogástrica; ⁵Sonda Nasoenteral; ⁶Do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”; ⁷Do inglês “*Average Severity of Illness Score*”; ⁸Cateter Venoso Central; ⁹Líquido ascítico, abscesso, secreção de ferida, secreção ocular, liquor; **P* ≤ 0.05 - Estatisticamente significante)

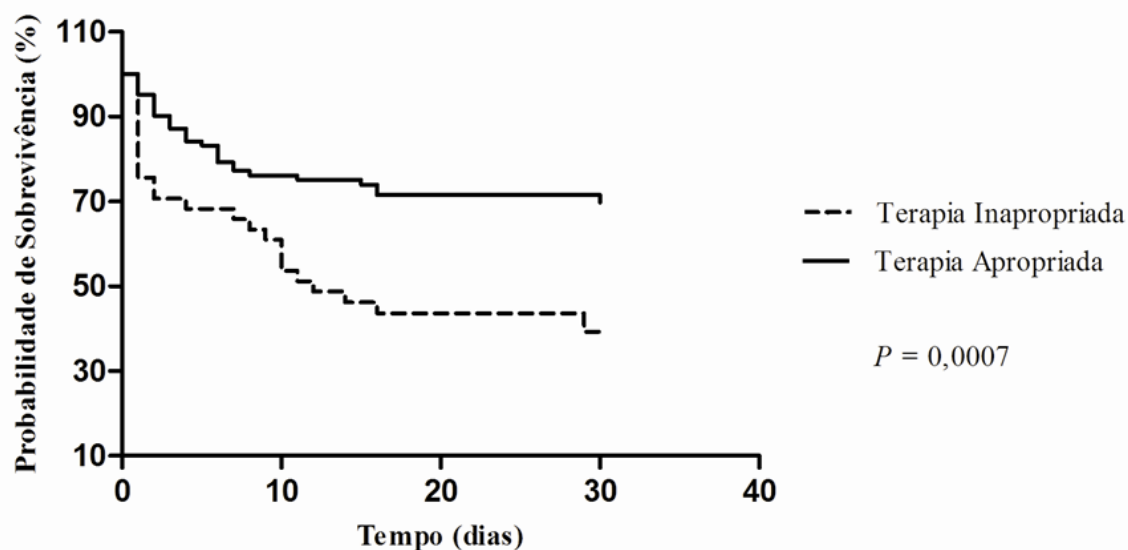


Figura 6. Curva de sobrevivência dos pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação ao grupo que recebeu terapia apropriada.

Os fatores de risco associados com o desenvolvimento de bacteremia por *P. aeruginosa* multi-resistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR) estão apresentados na tabela 10. Através da análise multivariada foram identificados como fatores de risco comuns e independentemente associados à XDR e MDR, o uso prévio de carbapenêmicos ($P= 0,001/\text{OR}= 3,48$ e $P= 0,02/\text{OR}= 2,22$, respectivamente) e presença de traqueostomia ($P= 0,02/\text{OR}=2,97$ e $P= 0,05/\text{OR}=2,19$, respectivamente). Outros fatores de risco independentes para MDR foram: admissão em Unidade de Terapia Intensiva ($P= 0,02$; $\text{OR}= 2,19$) e tempo de internação igual ou superior a 30 dias prévio à infecção ($P= 0,05$; $\text{OR}= 1,95$).

Na tabela 11 estão descritos os fatores de risco independentemente associados com resistência às diferentes categorias de antimicrobianos. As taxas de resistência para cefepime, carbapenêmicos, piperacilina/tazobactam, fluoquinolonas e aminoglicosídeos foram 38,8 (61/157), 44,6 (70/157), 28,7 (45/157), 40,8 (64/157) e 39,5% (62/157), respectivamente. Pela análise univariada, inúmeros fatores comuns foram encontrados como estatisticamente significantes, entretanto, depois de ajustadas as características através da regressão logística múltipla, as variáveis independentes comumente associadas foram: uso prévio de antimicrobianos, principalmente carbapenêmicos; e o uso de procedimentos invasivos como: presença de hemodiálise e cateter urinário nos grupos resistente a carbapenêmico e a aminoglicosídeo, respectivamente.

Tabela 10. Análise univariada e fatores de risco independentes associados com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente e extensivamente resistente em pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Variáveis	XDR ¹ N = 35 (%)	MDR ² N = 67 (%)	Sensível N = 90 (%)	Análise XDR		Análise MDR	
				Univariada P ⁶ (OR ⁷)	Multivariada P (OR)	Univariada P (OR)	Multivariada P (OR)
Idade – média (variação)	56,06 (2-89)	56,58 (2-89)	49,09 (0-88)	0,42 (-)	-	0,10 (-)	-
Gênero Masculino	22 (62,9)	44 (65,7)	61 (67,8)	0,75 (0,80)	-	0,91 (0,91)	-
Gênero Feminino	13 (37,1)	23 (34,3)	29 (32,2)	0,75 (1,24)	-	0,91 (1,10)	-
Tempo hospitalização ≥ 30 dias prévio à infecção	17 (48,6)	31 (46,6)	32 (35,6)	0,25 (1,71)	-	0,02 (2,19)*	0,05 (1,95)*
Admissão UTI³	17 (48,6)	39 (58,2)	35 (38,9)	0,43 (1,48)	-	0,02 (2,19)*	0,02 (2,19)*
Cirurgia	19 (54,3)	34 (50,7)	35 (38,9)	0,17 (1,87)	-	0,18 (1,62)	-
Uso prévio antimicrobianos	31 (88,6)	57 (85,1)	67 (74,4)	0,13 (2,66)	-	0,01 (2,81)*	0,57 (1,29)
Cefalosporina 3ª geração	13 (37,1)	29 (43,3)	39 (43,3)	0,66 (0,77)	-	0,87 (1,00)	-
Cefepime	12 (34,3)	26 (38,8)	35 (38,9)	0,78 (0,82)	-	0,84 (1,00)	-
Carbapenêmicos	22 (62,9)	39 (58,2)	37 (41,1)	0,04 (2,42)*	0,001 (3,48)*	0,05 (2,00)*	0,02 (2,22)*
Fluorquinolonas	7 (20,0)	13 (19,4)	7 (7,8)	0,05 (2,96)*	0,51 (0,71)	0,05 (2,85)*	0,43 (1,42)
Aminoglicosídeos	4 (11,4)	5 (7,5)	7 (7,8)	0,49 (1,53)	-	0,81 (0,96)	-
Procedimentos Invasivos	33 (94,3)	62 (92,5)	77 (85,5)	0,23 (2,79)	-	0,23 (2,09)	-
Ventilação mecânica	24 (68,6)	45 (67,2)	44 (48,9)	0,04 (2,28)*	0,61 (0,77)	0,03 (2,14)*	0,39 (1,42)
Traqueostomia	22 (62,9)	39 (58,2)	31 (34,4)	0,007 (3,22)*	0,02 (2,97)*	0,005 (2,55)*	0,05 (2,19)*
Cateter urinário	27 (77,1)	49 (73,1)	52 (57,8)	0,07 (2,52)	-	0,06 (1,99)	-
Cateter venoso central	30 (85,7)	54 (80,6)	71 (78,9)	0,53 (,61)	-	0,95 (1,11)	-
Dreno cirúrgico	8 (22,8)	10 (15,0)	14 (15,6)	0,07 (2,36)	-	0,90 (0,95)	-
SNG/SNE⁴	24 (68,6)	50 (74,6)	59 (65,6)	0,91 (1,15)	-	0,29 (1,55)	-
Hemodiálise	13 (37,1)	21 (31,3)	18 (20,0)	0,07 (2,36)	-	0,14 (1,83)	-
Nutrição parenteral	4 (11,4)	9 (13,4)	16 (17,8)	0,55 (0,60)	--	0,60 (0,72)	-

¹Extensivamente-resistente; ²Multi-resistente; ³Unidade de Terapia Intensiva; ⁴Sonda Naso-Gástrica/ Sonda Naso-Enteral; ⁶Valor de P; ⁷Odds Ratio;

*P ≤ 0,05 – Estatisticamente significativa

Tabela 11. Fatores de risco independentes associados com resistência às diferentes categorias de antimicrobianos em pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Variáveis	Univariada <i>P</i> ¹ (OR ²)	Multivariada <i>P</i> (OR)
Cefepime [N= 61 (38,8%)]		
Admissão Unidade Terapia Intensiva	0,05 (1,97)	0,31 (1,43)
Cirurgia	0,02 (2,19)	0,17 (1,61)
Tempo estadia ≥ 30 dias prévio infecção	0,03 (2,13)	0,11 (1,74)
Uso prévio antimicrobianos	0,03 (2,87)	0,15 (2,09)
Uso prévio Cefepime	0,05 (2,03)	0,88 (0,94)
Uso prévio Carbapenêmicos	< 0,0001 (4,09)	0,02 (2,24)*
Ventilação mecânica	0,05 (2,05)	0,97 (0,99)
Carbapenêmicos [N=70 (44,6%)]		
Admissão Unidade Terapia Intensiva	0,001 (3,09)	0,46 (0,72)
Cirurgia	0,0004 (3,46)	0,11 (1,98)
Tempo estadia ≥ 30 dias prévio infecção	< 0,0001 (4,32)	0,14 (1,79)
Uso prévio Cefepime	< 0,0001 (4,19)	0,29 (0,61)
Uso prévio Carbapenêmicos	< 0,0001 (0,97)	0,01 (2,90)*
Uso prévio Fluorquinolonas	0,02 (3,38)	0,48 (0,68)
Uso prévio Aminoglicosídeos	0,05 (4,13)	0,31 (2,05)
Ventilação mecânica	0,02 (2,19)	0,74 (1,19)
Traqueostomia	0,0008 (3,16)	0,13 (2,01)
Cateter venoso central	0,03 (2,44)	0,58(0,73)
Hemodiálise	0,0001 (4,61)	0,0004 (5,36)*
Piperacilina/Tazobactam [N=45 (28,7%)]		
Admissão Unidade Terapia Intensiva	0,02 (2,36)	0,19 (1,63)
Cirurgia	0,09 (1,93)	0,13 (1,77)
Uso prévio antimicrobianos	0,03 (3,58)	0,02 (3,97)*
Uso prévio Cefepime	0,0002 (3,78)	0,79 (0,90)
Ventilação mecânica	0,004 (3,20)	0,07 (2,31)
Traqueostomia	0,002 (3,14)	0,19 (1,75)
Fluorquinolonas [N= 64 (40,8%)]		
Admissão UTI	0,03 (2,07)	0,09 (1,77)
Uso prévio Cefepime	0,02 (2,21)	0,54 (0,80)
Uso prévio Carbapenêmicos	< 0,0001 (4,45)	0,04 (2,06)*
Uso prévio Fluorquinolonas	0,03 (3,17)	0,68 (1,20)
Traqueostomia	0,02 (2,23)	0,84 (1,08)
Cateter urinário	0,001 (3,37)	0,07 (1,94)
Aminoglicosídeos [N=62 (39,5%)]		
Admissão Unidade Terapia Intensiva	0,0006 (3,31)	0,47 (1,31)
Tempo estadia ≥ 30 dias prévio infecção	0,03 (2,14)	0,25 (1,55)
Uso prévio Cefepime	0,03 (2,17)	0,61 (0,82)
Uso prévio Carbapenêmicos	< 0,0001 (4,15)	0,92 (1,03)
Uso prévio Fluorquinolonas	0,001 (5,74)	0,18 (1,99)
Traqueostomia	0,02 (2,22)	0,30 (1,52)
Cateter urinário	0,001 (3,59)	0,01 (2,87)*

¹Valor de *P*; ²Odds ratio **P* ≤ 0,05 - Estatisticamente significante

A terapia antimicrobiana e a evolução clínica dos pacientes com 1º episódio confirmado de bacteremia por *P. aeruginosa* foram avaliadas e estão descritas na tabela 12. Os pacientes caracterizados como grupo resistente, tiveram taxas significativas de terapia antimicrobiana inapropriada, particularmente pelo uso de cefepime ($P= 0,002$; $OR= 3,24$) e naqueles que apresentaram isolados MDR e XDR ($P= 0,02$; $OR= 2,66$, ambos). Em relação a evolução clínica, pacientes com bacteremia por isolados resistentes aos antimicrobianos tiveram maiores taxas de mortalidade hospitalar e tempo de hospitalização significativamente maior, incluindo todas as categorias de antimicrobianos avaliadas, bem como para pacientes do grupo com isolados MDR.

Tabela 12. Terapia antimicrobiana e evolução clínica de pacientes com bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antimicrobianos, MDR e XDR.

Antimicrobianos	Grupo Resistente n/n (%)	Grupo Sensível n/n (%)	P^4 (OR ⁵)
Cefepime			
Terapia inapropriada ¹	24/61 (39,3)	16/96 (16,7)	0,002 (3,24)*
Mortalidade 30 dias	31/61 (50,8)	37/96 (38,5)	0,17 (1,65)
Hospitalização prolongada ²	31/61 (50,8)	32/96 (33,3)	0,04 (2,07)*
Piperacilina/Tazobactam			
Terapia inapropriada ¹	7/45 (15,6)	30/112 (26,8)	0,19 (0,50)
Mortalidade 30 dias	23/45 (51,1)	45/112 (40,2)	0,28 (1,56)
Hospitalização prolongada ²	27/45 (60,0)	36/112 (32,1)	0,002 (3,17)*
Carbapenêmicos			
Terapia inapropriada ¹	22/70 (31,4)	18/87 (20,7)	0,17 (1,76)
Mortalidade 30 dias	35/70 (50,0)	33/87 (37,9)	0,17 (1,64)
Hospitalização prolongada ²	39/70 (55,7)	24/87 (27,6)	0,0006 (3,30)*
Fluorquinolonas			
Terapia inapropriada ¹	13/64 (20,3)	21/93 (22,6)	0,88 (0,87)
Mortalidade 30 dias	28/64 (43,7)	40/93 (43,0)	0,94 (1,03)
Hospitalização prolongada ²	34/64 (53,1)	29/93 (31,2)	0,009 (2,50)*
Aminoglicosídeos			
Terapia inapropriada ¹	10/62 (16,1)	20/95 (21,0)	0,57 (0,72)
Mortalidade 30 dias	29/62 (46,8)	39/95 (41,0)	0,58 (1,26)
Hospitalização prolongada ²	33/62 (53,2)	30/95 (31,6)	0,01 (2,47)*
Multiresistente			
Terapia inapropriada ³	32/67 (47,8)	17/90 (18,9)	0,02 (2,66)*
Mortalidade 30 dias	32/67 (47,8)	32/90 (35,6)	0,16 (1,66)
Hospitalização prolongada ²	34/67 (50,7)	29/90 (32,2)	0,02 (2,17)*
Extensivamente resistente			
Terapia inapropriada ³	17/35 (48,6)	32/122 (26,2)	0,02 (2,66)*
Mortalidade 30 dias	16/35 (45,7)	52/122 (42,6)	0,89 (1,13)
Hospitalização prolongada ²	18/35 (51,4)	45/122 (36,9)	0,17 (1,81)

¹Terapia inapropriada por cada antibiótico e/ou ausência de terapia; ²Tempo de hospitalização ≥ 45 dias; ³Terapia inadequada total (qualquer antimicrobiano e/ou ausência de terapia); ⁴ $P \leq 0,05$; ⁵Odds ratio

* P Estatisticamente significativa

4.3. Pesquisa dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos

A tabela 13 caracteriza os isolados de *P. aeruginosa* quanto à produção de Metallo- β -lactamase e o perfil de resistência aos antimicrobianos. Do total de 73 isolados resistentes aos carbapenêmicos, 56 (72,7%) foram recuperados e analisados. A taxa de produção de MBL pelo teste fenotípico foi de 21,4% (N= 12), dos quais 9 (75,0%) tiveram *amplicon* consistente com genes MBL, sendo 6 do tipo *bla_{SPM}* (66,7%) e 3 do tipo *bla_{VIM}* (33,3%). Em relação aos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, 6 antibiótipos (R1 – R6) foram identificados entre os isolados que foram fenotipicamente positivos para MBL.

Os resultados dos testes fenotípicos realizados no estudo estão apresentados na tabela 14. Entre os 12 isolados (21,4%) fenotipicamente positivos para produção de MBL, a maioria (N= 8; 66,7%) foi positiva para ambos os agentes quelantes, EDTA e 2-MPA, simultaneamente. Os 47 isolados de *P. aeruginosa* negativos para genes MBL, foram avaliados para atividade carbapenemase através do teste de Hodge, entretanto apenas um isolado foi fenotipicamente positivo, não sendo detectado nenhum outro gene relacionado à produção de carbapenemase pelo PCR (*bla_{KPC}* e *bla_{OXA}*). A produção de AmpC foi elevada entre os isolados (36/47; 76,6%) principalmente para os substratos ceftazidima (31/36; 86,1%) e piperacilina/tazobactam e (32/36; 88,9%).

Tabela 13. Caracterização dos isolados de *P. aeruginosa* quanto à produção de Metallo- β -lactamase, antibiótipo e perfil de resistência

Ano	PA ¹ resistentes CBP ² n (%)	PA resistentes CBP Analisadas n (%)	TSDD ³ positivas n (%)	PCR ⁴ Pb/gene (isolados)	Antibiótipo	Perfil de Resistência
2009	8 (11,0)	6 (75,0)	1	Negativa (1)	R2	Ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, ampicilina, aztreonam
2010	16 (21,9)	10 (62,5)	2	Negativa (1)	R1	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, ampicilina, aztreonam
				382/ <i>bla</i> _{VIM} (1)	R6	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina
2011	29 (39,7)	21 (72,4)	5	382/ <i>bla</i> _{VIM} (1)	R3	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, aztreonam
				382/ <i>bla</i> _{VIM} (1)	R3	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, aztreonam
				827/ <i>bla</i> _{SPM} (1)	R5	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina
				827/ <i>bla</i> _{SPM} (2)	R1	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, ampicilina, aztreonam
2012	20 (27,4)	19 (95,0)	4	827/ <i>bla</i> _{SPM} (4)	R4	Ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, ampicilina
Total	73 (100,0)	56 (72,7)	12 (21,4)	9 (75,0)	R1-R6	-

¹*Pseudomonas aeruginosa*, ²Carbapenêmicos, ³Teste Sinergismo Duplo-Disco, ⁴do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 14. Caracterização dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmico quanto aos testes fenotípicos

Teste/Enzima			Testadas	<i>P. aeruginosa</i> resistente carbapenêmico	
			Total	Positivo N (%)	Negativo N (%)
Teste Sinergismo Duplo-Disco/ MBL¹	com		56	12 (21,4)	44 (66,7)
EDTA ²			12	3 (25,0)	9 (75,0)
MPA-2 ³			12	1 (8,33)	11 (91,7)
EDTA e 2-MPA			12	8 (66,7)	4 (33,3)
Teste de Hodge/ Carbapenemase			47	01 (2,1)	46 (97,8)
Teste de Antagonismo (“D”)/AmpC			47	36 (76,6)	11 (23,4)
CAZ ⁴			36	31 (86,1)	5 (13,9)
PPTAZ ⁵			36	32 (88,9)	4 (11,1)
CTX ⁶			36	11 (55,6)	25 (69,4)
CFX ⁷			36	0 (-)	36 (100,0)

¹MBL, Metallo-β-lactamase; ²EDTA, Ácido-etileno-diamino-tetracético; ³Ácido 2-mercaptopropiônico;

⁴CAZ, Ceftazidima; ⁵PPTAZ; Piperacilina/Tazobactam; ⁶CTX, Cefotaxima; ⁷Cefoxitina

Dos 47 isolados resistentes aos carbapenêmicos e não-MBL, 14 foram incluídos na pesquisa de a hiperexpressão de bombas de efluxo, hiperprodução de AmpC e perda/redução de porina OprD, através da técnica de qRT-PCR (Tabela 15). Entre os 11 isolados positivos no teste fenotípico para AmpC, 8 (72,7%) foram positivos para hiperprodução da enzima pelo qRT-PCR, e foi encontrado dois isolados com hiperprodução entre os 3 fenotipicamente negativos incluídos na análise. A frequência de isolados com hiperprodução de AmpC e perda/redução de porina OprD foi de 71,4% (10/14), ambos, e as bombas MexABOprM e MexXY foi de 57,1% (8/14) e 64,3% (9/14), respectivamente.

Tabela 15. Caracterização dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* quanto a hiperexpressão de bombas de efluxo, hiperprodução de AmpC e perda/redução de OprD

Isolado n°	Hiperprodução de AmpC		Hiperexpressão Sistemas de efluxo				Perda OprD	Perfil de resistência (MDR/XDR)
	Teste D ³	AmpC+	ABM+	XY+	EFN+	CDJ+	OprD-	
1	-	+	-	+	-	-	+	CAZ ⁵ , PPTAZ ⁶ , IMI ⁷ , CIP ⁹ , LEV ¹⁰ , GEN ¹¹ , AZT ¹² (MDR)
2	+	+	-	+	-	-	-	CPM ¹³ , IMI, MER ⁸ , CIP, GEN, AMK ¹⁴ , AZT (MDR)
3	+	-	+	+	-	-	+	CAZ, CPM, PPTAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AMK, AZT (XDR)
4	+	-	+	-	-	-	+	CPM, IMI, MER, CIP, GEN, AMK, AZT (MDR)
5	+	+	+	+	-	-	+	CAZ, CPM, PPTAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AZT (XDR)
6	+	+	+	+	-	-	+	CAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AZT (MDR)
7	-	+	+	+	-	-	-	CAZ, CPM, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AMK (MDR)
8	+	+	+	-	-	-	+	IMP, MER (-)
9	+	+	-	-	-	-	+	IMP (-)
10	+	-	-	+	-	-	+	CAZ, CPM, IMI, MER, CIP, LEV, GEN, AMK, AZT (XDR)
11	-	-	+	+	-	-	-	CAZ, CPM, IMI, MER (MDR)
12	+	+	-	-	-	-	+	IMI (-)
13	+	+	-	-	-	-	+	IMI, MER (-)
14	+	+	+	+	-	-	-	CAZ, CPM, PPTAZ, IMI, MER, CIP, LEV, GEN (XDR)
Total N (%)	11 (78,0)	10 (71,4)	8 (57,1)	9 (64,3)	0 (-)	0 (-)	10 (71,4)	-

¹Multi-resistente; ²Extensivamente resistente; ³Teste fenotípico para hiperprodução de AmpC; ⁴Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em Tempo Real; ⁵Ceftazidima;

⁶Piperacilina-Tazobactam; ⁷Imipenem; ⁸Meropenem; ⁹Ciprofloxacina; ¹⁰Levofloxacina; ¹¹Gentamicina; ¹²Aztreonam; ¹³Cefepime; ¹⁴Amicacina

AmpC+, Hiperprodução de AmpC; ABM+, Hiperexpressão de MexABOprM; XY+, Hiperexpressão de MexXY; EFN+, Hiperexpressão de MexEFOprN; CDJ+, Hiperexpressão de MexCDOprJ; OprD-, Perda ou redução de porina OprD

+ ou - (Positivo ou Negativo)

A tabela 16 mostra a relação entre o número de isolados MDR/XDR e aqueles que não apresentaram esse perfil com os mecanismos de resistência observados isoladamente e em associação. A maioria dos isolados com perfil MDR/XDR apresentaram associação de 3 ou mais mecanismos de resistência com predomínio da presença de hiperprodução de AmpC e perda de porina OprD entre os isolados não MDR/XDR (N= 4) e resistentes apenas aos carbapenêmicos. Destes, 3 isolados apresentaram os maiores níveis de expressão de ampC, acima de 100 vezes maior em relação à cepa PAO1 (Apêndice II e III).

Tabela 16. Relação entre a associação dos mecanismos de resistência identificados entre os 14 isolados de *P. aeruginosa* testados no qRT-PCR e o perfil de resistência

Determinantes de Resistência	Total (N= 14) (Nº isolados OprD-)	MDR/XDR N= 10 (%)	não-MDR/XDR N= 4 (%)
AmpC+	3 (3)	-	3 (75,0)
XY+	1 (1)	1 (10,0)	-
ABM+	1 (1)	1 (10,0)	-
AmpC+, ABM+	1 (1)	-	1 (25,0)
AmpC+, XY+	2 (1)	2 (20,0)	-
ABM+, XY+	2 (1)	2 (20,0)	-
AmpC+, ABM+, XY+	4 (2)	4 (40,0)	-

OprD-, Redução/perda de porina OprD; AmpC+, Hiperprodução de AmpC; ABM+ e XY+, Hiperexpressão de MexABOprM e MexXY; MDR, Multi-resistente; XDR, Extensivamente-resistente

4.4. Tipagem molecular

Todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos com gene para MBL confirmados pela técnica de PCR foram incluídos na análise de tipagem molecular. A similaridade genética entre as amostras foi realizada pela técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), e em função do custo, foram incluídos dez isolados de *P. aeruginosa*, sendo 6 contendo o gene *bla_{SPM}*, 3 *bla_{VIM}* e um isolado contendo *bla_{IMP}*. O isolado contendo o gene *bla_{IMP}* pertence a uma amostra clínica de secreção traqueal recuperada no ano 2012, que faz parte da nossa coleção e foi propositalmente incluída na análise clonal. Não foi possível determinar o perfil de macrorrestrição de um isolado contendo o gene *bla_{SPM}*, devido a degradação do DNA.

Os resultados obtidos geraram o dendrograma de similaridade genética apresentado na figura 7. No total, foram encontrados seis perfis genotípicos distintos de *P. aeruginosa*, diferenciadas entre si por um coeficiente de similaridade acima de 80%, dois correspondendo as amostras contendo o gene *bla_{SPM}* (A e B) e quatro correspondendo as amostras contendo o gene *bla_{VIM}* (C, D e F) e *bla_{IMP}* (E). Apenas o clone A apresentou 4 subtipos (A1, A2, A3 e A4).

Observou-se a disseminação do clone A na UTI e Unidades Cirúrgicas no mesmo período de isolamento das amostras, assim como disseminação policlonal das amostras contendo o gene *bla_{VIM}*, na Unidades Cirúrgicas e Clínica Médica. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que todas as amostras de *P. aeruginosa* analisadas no PFGE apresentaram perfil de MDR ou XDR. As amostras contendo o gene *bla_{SPM}* pertencentes ao clone A apresentaram o mesmo perfil de resistência, sendo todas classificadas como XDR, enquanto a amostra do pulsotipo B foi classificada como MDR (Tabela 17).



Figura 7. Dendrograma da análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), linhagens, genótipo e pulsotipo das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue e aspirado traqueal. Escala representa as porcentagens de similaridade. Referenciada por Ferreira e colaboradores (2014).

Tabela 17. Perfil fenotípico e genotípico de resistência, sítio e data de isolamento das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* caracterizadas por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Gene <i>bla</i>	Pulsotipo PFGE ¹	Sítio	Clínica	Data de isolamento	MDR ² /XDR ³
VIM	F	sangue	Clínica Médica	06/07/2011	XDR
VIM	D	sangue	Unidade Cirúrgica	31/01/2011	XDR
VIM	C	sangue	Clínica Médica	17/11/2010	MDR
SPM	B	sangue	Unidade Cirúrgica	26/03/2011	MDR
SPM	A4	sangue	Unidade Cirúrgica	07/08/2012	XDR
SPM	A3	sangue	Unidade Cirúrgica	06/09/2011	XDR
SPM	A2	sangue	UTI ⁴ adulto	30/03/2012	XDR
SPM	A1	sangue	UTI adulto	10/09/2011	XDR

¹PFGE; Pulsed-Field Gel Electrophoresis; ²MDR, Multi-resistente; ³XDR, Extensivamente resistente; ⁴UTI, Unidade de Terapia Intensiva

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a incidência de IRAS graves, com destaque para infecções de corrente sanguínea e pneumonias associadas a procedimentos invasivos, aumentou significativamente em todo o mundo (FALAGAS et al., 2007; PELEG et al., 2010), com destaque para a participação de bactérias Gram-negativas, atualmente responsáveis por taxas maiores que 40% entre os isolados de infecção de corrente sanguínea (BLOT et al., 2002; ARTERO et al., 2010; GUDIOL et al., 2013). Essas infecções tornaram-se motivo de grande preocupação, particularmente em indivíduos com comorbidades graves, nos quais se observa aumento significativo das taxas de mortalidade (VIDAL et al., 1996; MARRA et al., 2006; MORATA et al., 2012). O tratamento dessas infecções é complicado em função das elevadas taxas de resistência à maioria dos antimicrobianos, que continuam a emergir rapidamente, fazendo com que novas alternativas de tratamento não estejam disponíveis (QUEIROZ et al., 2012). *Pseudomonas aeruginosa* é considerado um dos patógenos mais problemáticos entre as bactérias Gram-negativas causadoras de infecções hospitalares, principalmente por sua extraordinária capacidade de aquisição, emergência e disseminação de resistência (LIVERMORE et al., 2002; NEVES et al., 2008).

Dados da literatura demonstram que as taxas de mortalidade total entre pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* variam de 18 a 62% (VIDAL et al., 1996; MICEK et al., 2005), destacando resistência antimicrobiana, terapia inapropriada e gravidade das doenças de base como fatores de risco para pior evolução dos pacientes (KANG et al., 2005; LODISE et al., 2007; SUAREZ et al., 2010; MORALES et al., 2012; VOORIN'T HOLT et al., 2014). Mesmo após os dados serem ajustados para a gravidade da doença e condições de base através do *score* ASIS, nossos resultados mostraram taxa elevada, de 43,3%, na mortalidade em 30 dias, estando independentemente associada aos pacientes com câncer e pacientes que receberam terapia antimicrobiana inapropriada. Nosso estudo confirmou ainda que pacientes com isolados resistentes tiveram pior evolução clínica e associação com terapia antimicrobiana inapropriada, demonstrada aqui como um forte fator de risco para óbito. Similarmente, estudos prévios mostraram que pacientes com infecção por isolados de *P. aeruginosa* e que receberam terapia antimicrobiana inapropriada tiveram evolução desfavorável em mais de 40% dos casos (KANG et al., 2003; JOO et al., 2011).

Neste estudo, nós investigamos uma coorte de 157 pacientes com bacteremia causadas por *P. aeruginosa*, dos quais, 44,6% tiveram isolados resistentes aos carbapenêmicos, 42,7% apresentaram isolados com perfil multi-resistente e 22,3% com perfil extensivamente-resistente. Um estudo multicêntrico na América Latina evidenciou taxas significativas de susceptibilidade reduzida ao meropenem de 53,8% dos isolados da Argentina, 46,7% do Brasil, 33,3% do Chile e 28,8% de isolados do México (GALES *et al.*, 2012). No Brasil, estudos de vigilância e grupos de pesquisa independentes no Sul e Centro do país, tem demonstrado uma tendência ascendente nas taxas de resistência ao imipenem entre os anos de 2001, 2004 e 2009, nos quais foram encontradas frequências de 30,2%, 58,9% e 82,7%, respectivamente (SADER *et al.*, 2001; ZAVASCKI *et al.*, 2004; GOLÇALVES *et al.*, 2009). Nestes casos, o panorama atual de antibioticoterapia restringe-se a alternativas terapêuticas com fármacos considerados problemáticos devido a sua alta toxicidade, como por exemplo, as polimixinas (polimixina B e colistina), as quais muitas vezes não se encontram disponíveis comercialmente no Brasil (LEVIN *et al.*, 1999; FURTADO *et al.*, 2007). Todos isolados do presente estudo foram sensíveis a polimixina, entretanto, a presença de isolados clínicos com reduzida susceptibilidade a esta classe de antimicrobianos tem sido relatada na literatura (FRANCO *et al.*, 2010; LAUPLAND *et al.*, 2005). Foram evidenciadas ainda frequências elevadas de resistência a ceftazidima, piperacilina/tazobactam e fluorquinolonas, sugerindo a co-existência de diferentes mecanismos de resistência.

Geralmente, em países em desenvolvimento, é maior a densidade de uso de antibióticos, particularmente em unidades de cuidados intensivos (MOREIRA *et al.*, 2009). Este alto consumo de antimicrobianos resulta na maior incidência de bactérias multi-resistentes e extensivamente-resistentes, aliada a maior disseminação horizontal desses micro-organismos, justificada, em parte, pela falta de recursos humanos e financeiros e falhas na implementação de práticas de controle e prevenção. Os pacientes adultos internados nessas unidades apresentam maior risco para aquisição de IRAS do que pacientes admitidos nas outras unidades hospitalares (McGOWAN *et al.*, 1987; MEYER *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007). No nosso estudo, a maioria dos pacientes estava na UTI de adultos e em unidades cirúrgicas, sendo que na primeira foi demonstrada a maior incidência de episódios de bacteremia por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. Os nossos dados ratificaram a maioria dos fatores de

risco citados na literatura como relacionados à aquisição de bacteremia por *P. aeruginosa* resistente aos antimicrobianos, que incluem o uso abusivo de antimicrobianos, maior tempo de hospitalização, admissão em unidades de cuidados intensivos, presença de procedimentos invasivos, com destaque para dispositivos intravenosos e ventilação mecânica, e origem secundária da infecção, principalmente pulmão (VITKAUSKIENE et al., 2010; TUON et al., 2012).

Atualmente, estima-se que 40% dos pacientes hospitalizados recebem tratamento com algum tipo de antimicrobiano e em, aproximadamente, 50% dos casos, este uso é desnecessário (WANNMACHER et al., 2004; MANDELL et al., 2005). Além disso, a terapia empírica se faz com a combinação de vários antibióticos com espectro de ação abrangente, que ao exercer pressão seletiva, favorecem a emergência e disseminação de bactérias resistentes (SHLAES et al., 1999). Neste contexto, a avaliação do consumo de antibióticos no hospital é usualmente recomendada por órgãos como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e “*National Healthcare Safety Network*” (NHSN), avaliando-se a Dose Diária Definida, o que permite comparações úteis entre o consumo de antibióticos e as taxas de micro-organismos e seus fenótipos de resistência (CURTIS et al., 2004).

Como mencionado, a terapia com antibióticos pode contribuir para o aumento das taxas de infecção por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011). Além disso, sabe-se que, tanto o uso prévio de antimicrobianos, quanto seu uso durante a internação, está relacionado com o aumento das infecções por isolados resistentes (LEMMEN et al., 2000; LEPPER et al., 2002). Um estudo recente demonstrou que indivíduos expostos à terapia antimicrobiana com fluorquinolonas têm maiores chances de adquirir *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos quando comparados aos não expostos (LIN et al., 2014). Em outro estudo, Samonis e colaboradores (2014) demonstraram que o uso prévio de fluorquinolonas foi independentemente associado à infecção por *P. aeruginosa* extensivamente-resistente. No nosso estudo, o consumo de cefalosporinas de amplo espectro predominou entre os antibióticos prescritos, com grandes variações no período observado, entretanto, o uso de carbapenêmicos, imipenem e meropenem, também foi elevado. Adicionalmente, de modo geral, a densidade de uso de antibióticos no HC-UFU foi bem mais alta quando comparada com a de outros países (MEYER et al., 2003;

NISS et al., 2004), mas sem relação significativa com maior incidência de isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos nesta casuística.

Variações nas taxas de incidência de infecções em ambientes hospitalares são comuns durante a vigilância epidemiológica (ARANTES et al., 2003). No nosso estudo foi possível identificar um surto de bacteremia por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, particularmente em pacientes internados na UTI de adultos, no mês de dezembro de 2010, no qual a taxa destes isolados ultrapassou o limite de controle superior, estabelecida 3σ acima da incidência média desses casos, e apesar de não observarmos correlação positiva com o consumo de antimicrobianos, a literatura enfatiza a importância desse alto consumo para o aparecimento de resistência entre os micro-organismos (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011). Além disso, o aumento nas taxas de infecção no mês de dezembro pode ter sido influenciada pela diminuição da quantidade de profissionais de saúde na unidade, associada ao aumento da carga de trabalho e menor adesão às medidas básicas de controle de infecção, como por exemplo, a higienização das mãos, entre outras.

É importante salientar que a DDD é uma unidade técnica para medida, mas não reflete, necessariamente, a dose diária recomendada ou prescrita (CURTIS et al., 2004; MULLER et al., 2006), entretanto, expressa desta maneira, fornece boa estimativa do consumo percentual de antimicrobianos em um determinado período, e pode ser uma ferramenta para esclarecimento do problema da resistência em nível local, o que de certa forma pode contribuir, juntamente com a conscientização dos profissionais de saúde, para uso mais apropriado de antimicrobianos (BATISTÃO, 2010). Vale ressaltar a urgência de mudanças na política de uso de antimicrobianos nos hospitais, que é um desafio de grande complexidade, pois existem vários fatores que afetam o seu uso, assim como nas estratégias utilizadas.

P. aeruginosa tem uma ampla variedade de mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos a diferentes antimicrobianos (LISTER et al., 2009; BREIDENSTEIN et al., 2011). A resistência aos carbapenêmicos resulta frequentemente da produção de β -lactamases, particularmente aquelas que hidrolisam carbapenêmicos, como as metalo- β -lactamases (SADER et al., 2005; BREIDENSTEIN et al., 2011; VAN DER BIJ et al., 2011; VAN DER BIJ et al., 2012). A prevalência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos produtoras fenotipicamente de MBL em estudos brasileiros alcança taxas superiores a 50% em diferentes regiões geográficas,

com a enzima SPM-1, descrita pela primeira vez em 2002 por Tolleman e colaboradores, sendo a mais prevalente entre os isolados do país (GONÇALVES et al., 2009; GALETTI, 2010). Entretanto, outras MBLs, incluindo as do tipo VIM e IMP, também já foram identificadas em isolados de *P. aeruginosa* no Brasil (SADER et al., 2005; FRANCO et al., 2010; XAVIER et al., 2010).

No estudo de Zavascki e colaboradores (2006) foi demonstrado que a presença de *P. aeruginosa* produtora de MBL aumentou o risco da ocorrência de terapia antimicrobiana inadequada, com consequente aumento da mortalidade. Este aspecto não foi avaliado no nosso estudo, mas detectamos uma porcentagem relativamente alta (9/12; 75%) de genes MBL entre os isolados fenotipicamente positivos, com 66,7% de *bla*_{SPM-1} e 33,3% *bla*_{VIM}, sendo a grande maioria (8/9; 88,9%) com fenótipo extensivamente resistente. Nossos resultados revelaram ainda uma importante mudança na epidemiologia de isolados de *P. aeruginosa* no HC-UFU a partir do ano de 2005, no qual foi encontrado apenas isolados produtores de SPM-1 (CEZÁRIO et al., 2009), e a partir de 2011, relatando a emergência e disseminação de isolados produtores de MBL do tipo VIM. Não conseguimos encontrar genes MBL em 25% (3/12) dos isolados os quais foram detectados sua produção fenotipicamente, podendo ser inferido a presença de MBL nestes isolados, porém não amplificável com os iniciadores utilizados. Entretanto, mais pesquisas deverão ser feitas para determinar o exato mecanismo de resistência. Vale ressaltar ainda que, foi observada resistência ao aztreonam em três isolados com genes MBL, indicando que mecanismos adicionais de resistência aos β -lactâmicos podem estar presentes nestes isolados.

Ao avaliar a relação clonal entre as amostras contendo os genes *bla*_{SPM} e *bla*_{VIM}, observou-se alta similaridade (maior que 80%) entre os isolados contendo *bla*_{SPM}, o que não foi observado para aqueles contendo o gene *bla*_{VIM}. A presença de um clone de *P. aeruginosa* multi-resistente persistindo por longos períodos (semanas a meses) em diferentes unidades do hospital reforça a ideia da transmissão cruzada e disseminação de genes de resistência entre os pacientes hospitalizados, evidenciando a necessidade de aprimorar as estratégias de prevenção e controle de infecção, incluindo políticas para utilização de antimicrobianos e o possível isolamento dos pacientes com *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. Assim como a transmissão cruzada de cepas *bla*_{SPM}, observou-se uma disseminação policlonal daquelas contendo gene *bla*_{VIM}, sugerindo a

co-existência de diferentes clones de *P. aeruginosa* multi-resistente em um mesmo ambiente.

Em uma primeira etapa caracterizamos a resistência aos carbapenêmicos quanto à produção de MBL em um contexto fenotípico, a partir do uso de inibidores específicos, e genotípico, a partir da detecção de genes MBL por PCR *multiplex* e *end point*. A seguir, a pesquisa para mecanismos de resistência aos carbapenêmicos foi investigada com maiores detalhes naqueles isolados negativos para produção de MBL, usando ensaio fenotípico para presença de outra carbapenemase (teste de Hodge), e genotípico para genes associados à produção de OXA-carbapenemase e carbapenemase do tipo KPC. Em 14 isolados ainda foi realizado a pesquisa genotípica, através da análise da expressão quantitativa dos genes relacionados aos mecanismos de resistência intrínseca, pelo qRT-PCR. Nos isolados negativos para MBL, não foi detectado nenhum gene relacionado às outras carbapenemases, e apenas um resultado positivo foi observado através do teste de Hodge. Estes resultados sugerem que, na ausência de uma carbapenemase eficiente, outros mecanismos de resistência coexistam nesses isolados, incluindo hiperprodução da cefalosporinase AmpC e alterações na permeabilidade da membrana externa através da perda/redução da porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo.

De todas as bombas de efluxo já descritas em *P. aeruginosa*, destacam-se MexABOprM, MexCDOprJ, MexXY e MexEFOprN entre os sistemas mais bem caracterizados e associados com resistência a uma variedade de antimicrobianos em isolados clínicos (LISTER et al., 2009; NIKAIDO et al., 2012) e são, atualmente, relacionados com fenótipos multi-resistente, uma vez que a presença de um só sistema pode transportar múltiplos substratos (NEVES et al., 2010; ASKOURA et al., 2011). Muitos estudos ressaltam ainda, o aumento na Concentração Inibitória Mínima aos antimicrobianos, a partir da associação entre estes sistemas de efluxo com outros mecanismos de resistência bacteriana (XAVIER et al., 2010; CABOT et al., 2011; CLÍMACO, 2011). No nosso estudo, todos os isolados testados em qRT-PCR e caracterizados com hiperexpressão de bomba de efluxo, apresentaram algum outro tipo de mecanismo de resistência associado e, além disso, ficou evidente que os fenótipos MDR e/ou XDR estiveram presentes principalmente entre os isolados que apresentaram associação de três ou mais mecanismos resistência, exceto a presença de MBL.

Segundo estudos prévios, no Brasil, as bombas de efluxo mais frequentemente detectadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* incluem os sistemas MexABOprM e o MexXY, que são expressas constitutivamente e desempenham papel importante na resistência aos carbapenêmicos, além de abranger uma maior variedade de antimicrobianos em relação as bombas MexCDOprJ e MexEFOprN, as quais apresentam um perfil mais restrito de substratos (NEVES et al., 2010; PEREIRA, 2013). No nosso estudo não foi observada expressão aumentada dos genes *mexD* e *mexF* entre os isolados investigados, e a frequência da hiperexpressão de MexABOprM e MexXY foi de 57,1% e 64,3%, respectivamente. Um trabalho recente realizado com isolados clínicos de *P. aeruginosa* multi-resistentes provenientes de hospitais na Tailândia revelou que 92,06% destes hiperexpressavam o sistema MexABOprM e 63,49% o sistema MexXY (KHUNTAYAPORN et al., 2013). No Brasil, outro estudo que avaliou essa hiperexpressão em isolados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de sangue, observou a presença de MexABOprM e MexXY em 27,1% e 50,8% dos isolados, respectivamente (XAVIER et al., 2010).

A maioria de nossos isolados com perfil resistente a gentamicina e amicacina, apresentaram expressão aumentada do gene *mexY*, ou seja, dos 14 isolados testados, 9 (64,3%) foram resistentes a gentamicina e 6 (66,7%) hiperexpressavam MexXY. Portanto, no nosso estudo, a expressão elevada dessa bomba de efluxo pode ser a causa predominante de resistência à gentamicina entre os isolados de *P. aeruginosa*, estando de acordo com relatos de estudos prévios, nos quais destacam a importância desse mecanismo na resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos aminoglicosídeos (PEREIRA, 2013; GUÉNARD et al., 2014; LAU et al., 2014). Nos outros 3 isolados resistentes aos aminoglicosídeos e MexXY negativos, acredita-se na produção de enzimas que inativam esta classe de antimicrobianos, como as aminoglicosídeo-acetil-transferases, ou outro mecanismo de resistência (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999).

Além disso, a literatura enfatiza ainda que, entre os substratos da bomba MexABOprM inclui-se o meropenem, mas não o imipenem, devido a diferenças em sua estrutura molecular (LIVERMORE et al., 2002; LI et al., 2003). Nossos resultados demonstraram uma associação parcial entre resistência ao meropenem e hiperexpressão de *mexB*, uma vez que 72,7% (8/11) dos isolados resistentes ao meropenem apresentaram hiperexpressão desse sistema. Além disso, entre os 4 isolados de *P. aeruginosa* resistentes apenas aos carbapenêmicos, particularmente ao imipenem, e

considerados não multi ou extensivamente resistentes, apenas um isolado apresentou hiperexpressão de MexABOprM. Entretanto, esse isolado apresentou também perda de OprD e hiperprodução de AmpC, sendo assim, novos testes devem ser realizados para confirmação do mecanismo efetivo, e caso haja a confirmação destes mecanismos, uma explicação para este evento poderia ser um RNAm produzindo enzimas defeituosas ou não funcionais, uma vez que não houve resistência a nenhuma outra categoria de antimicrobiano. Nos outros 3 isolados foi observado perda de porina OprD em associação com hiperprodução de AmpC, demonstrando um impacto considerável desses mecanismos sobre a resistência aos carbapenêmicos, estando de acordo com estudo anterior, que encontrou relação significativa entre a resistência a esses antimicrobianos e os mecanismos mencionados (POOLE et al., 2011). Vale ressaltar ainda que nestes 4 isolados mencionados, a expressão do gene *ampC* foi extremamente elevada quando comparada aos demais isolados, com níveis bem acima do ponto de corte (acima de 100 vezes mais que a PAO1).

De acordo com a literatura, um dos achados mais consistente para resistência aos carbapenêmicos, particularmente ao imipenem, tem sido a impermeabilidade da membrana devido à perda de porina OprD (LIVERMORE, 2001; LISTER, 2002; BONOMO, SZADO, 2006; LISTER et al., 2009; LEE et al., 2012; FUSTÉ et al., 2013), e vários autores tem relatado frequências superiores a 80% deste mecanismo entre isolados clínicos de *P. aeruginosa* (XAVIER et al., 2010). Aqui, evidenciamos também taxa expressiva de redução na expressão do gene *oprD* em 71,4% dos isolados. Além disso, a associação entre multi-resistência com a perda de porina OprD em isolados clínicos de *P. aeruginosa* tem sido relatada, principalmente pelo efeito sinérgico a outros mecanismos de resistência (CLÍMACO, 2011). No nosso estudo essa associação foi bem caracterizada, considerando isolados MDR/XDR com perda de porina OprD, os quais apresentaram concomitantemente hiperexpressão de bombas de efluxo e hiperprodução de AmpC.

De acordo com a literatura, a produção de β -lactamase cromossômica do tipo AmpC em *P. aeruginosa* é produzida em níveis basais, entretanto, pode ter sua produção induzida a níveis elevados por alguns antimicrobianos, como carbapenêmicos e inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (LIVERMORE, 2002; BONOMO, SZADO, 2006; LISTER et al., 2009). Este fenômeno tem sido relatado em 14 a 56% dos pacientes tratados com drogas antipseudomonas, combinações de

penicilina-inibidor, aztreonam e de cefalosporinas de espectro estendido (LISTER et al., 2009). Nosso estudo demonstrou frequência elevada de isolados com hiperexpressão de AmpC, semelhante às taxas apresentadas em outros estudos no país (XAVIER, 2010), o que pode ser justificado pelo alto consumo de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos no HC-UFU.

Vale ressaltar que diferenças nas taxas destes mecanismos de resistência avaliados por qRT-PCR são extremamente variáveis na literatura, justificada, principalmente, pelas variações nos pontos de corte para expressão aumentada ou reduzida dos genes de resistência, que são previamente estabelecidos para definir cada nível de expressão. No nosso estudo, esses pontos foram determinados a partir dos trabalhos de Xavier e colaboradores (2010).

Estudos similares a este devem ser frequentemente incentivados com o propósito de fornecer o devido suporte para as Comissões de Controle de Infecções Hospitalares, aos profissionais de saúde e aos órgãos nacionais competentes, no que diz respeito a epidemiologia local e nacional, necessário ao controle das IRAS. O cenário atual mostra uma rápida disseminação de bactérias com resistência múltipla aos antimicrobianos, limitando significativamente as opções terapêuticas disponíveis, sendo assim, conhecer os mecanismos de resistência em uma bactéria importante epidemiologicamente, como a *Pseudomonas aeruginosa*, é de extrema relevância na elaboração de estratégias relacionadas à adequação do tratamento com drogas antimicrobianas e na elaboração de um conjunto de medidas para controle das IRAS.

6. CONCLUSÕES

- Nossos resultados revelaram, além da caracterização de um surto por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, que o HC-UFU é um ambiente altamente propício para a disseminação de clones desse patógeno com perfil MDR e/ou XDR, como aqueles produtores de SPM-1, considerando a elevada densidade de uso de antimicrobianos.
- Foi observado maior risco de morte entre os pacientes com bacteremia por *P. aeruginosa* que apresentavam doença de base grave (câncer) e que receberam terapia antimicrobiana inapropriada.
- Não foi detectado nenhum outro gene relacionado a outras carbapenemases pesquisadas, como OXA-carbapenemase e KPC, entre os isolados MBL negativos.
- Na ausência de MBL, foi observado que a resistência aos carbapenêmicos é explicada pela hiperexpressão dos sistemas MexABOprM e MexXY, hiperprodução de AmpC e perda de porina OprD, que, quando expressos em associação, contribuem para os perfis MDR e XDR. Adicionalmente, não foi detectada expressão aumentada dos genes *mexD* e *mexF* através dos *breakpoints* utilizados no estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Outras conclusões importantes podem ser mencionadas, incluindo:

- A alta densidade de uso de antibióticos foi observada particularmente para cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e carbapenêmicos, e, apesar de não ter sido encontrada correlação positiva com o aumento na incidência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos/1000 pacientes-dia, existe a necessidade de revisão na política de uso de antimicrobianos no HC-UFU.
- Uso prévio de antimicrobianos, principalmente carbapenêmicos, presença de procedimentos invasivos, admissão na UTI e maior tempo de hospitalização prévio a infecção foram fatores de risco que contribuíram significativamente para resistência aos antibióticos.
- Observou-se a disseminação de um clone de *P. aeruginosa* contendo o gene *bla_{SPM}* com evidências indiretas da sua disseminação cruzada no HC-UFU, e policlonal daquelas contendo o gene *bla_{VIM}*.
- A produção de MBL não foi o mecanismo com maior frequência entre os isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. A hiperexpressão dos sistemas MexXY e MexABOprM foi confirmada em 64,3% e 57,1% dos isolados MBL negativos, respectivamente.
- A frequência da perda de porina OprD e hiperprodução de AmpC foi elevado e predominou entre os isolados de *P. aeruginosa* não MDR, ou seja, resistente apenas ao imipenem e/ou meropenem, sugerindo importante papel neste fenótipo.
- Em 4 isolados de *P. aeruginosa* não MDR e resistente apenas ao imipenem e /ou meropenem, apresentaram elevada expressão do gene *ampC* quando comparada aos demais isolados (níveis ≥ 100 vezes mais em relação a PAO1).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 289, n. 1036, p. 321 – 331, 1980.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Volume 4, Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, Brasília, 2013a.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 2, Série Controle Externo da Qualidade, Brasília, 2013b.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 3, Principais Síndromes Infecciosas, Brasília, 2013c.

ALIAGA, L.; MEDIAVILLA, J.D.; COBOF, A. Clinical index predicting mortality with *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 615-619, 2002.

AESCHLIMANN, J.R. The Role of Multidrug efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-negative Bacteria. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 7, p. 916-924, 2003.

ARANTES, A.; CARVALHO, E.S.; MEDEIROS E.A.; FARTH, C.K.; MANTESE, O.C. Use of statistical process control charts in the epidemiological surveillance of nosocomial infections. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 768-774, 2003.

ARTERO, A.; ZARAGOZA, R.; CAMARENA, J.J.; SANCHO, S.; GONZALEZ, R.; NOGUEIRA, J.M. Prognostic factors of mortality in patients with community-

acquired bloodstream infection with severe sepsis and septic shock. **Journal of Critical Care**, v. 25, n. 2, p. 276-281, 2010.

ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ABUJAMEL, T.; TAHER, I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal of Medicine**, v.13, n.6, 2011.

AZEVEDO, F.M. Micro-organismos multiresistentes. In: OLIVEIRA, A.C. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

BARSANTI, M. C. & WOELTJE, K. Infection prevention in the intensive care unit. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 703-725, 2009.

BATISTÃO, D.W.F. **Epidemiologia e fatores de risco associadas à colonização por VRE e MRSA em uma unidade de terapia intensiva de adultos**. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

BAUMGART, A.M.; MOLINARI, M.A.; SILVEIRA, A.C. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 433-436, 2010.

BERTRAND, X.; THOUVEREZ, M.; PARTRY, C.; BALVAY, P.; TALON, D. *Pseudomonas aeruginosa*: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolates in the intensive care unit. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 12, p. 706-708, 2001.

BLOT, S.; VANDEWUDE, K.; DE BACQUER, D.; COLARDYN, F. Nosocomial bacteremia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients: clinical outcome and length of hospitalization. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 1600-1606, 2002.

BONOMO, R.R.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 49-56, 2006.

BREIDENSTEIN, E.B.; de la FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. Functional classification scheme for β -lactamases and It's correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

CABOT, G.; OCAMPO-SOSA, A.A.; DOMÍNGUEZ, M.A.; GAGO, J.F.; JUAN, C.; TUBAU, F.; RODRIGUEZ, C.; MOYA, B.; PEÑA, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; OLIVER, A. Genetic Markers of Widespread Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.12, p. 6349-6357, 2012.

CABOT, G.; OCAMPO-SOSA, A.A.; TUBAU, F.; MACIA, M.D.; RODRÍGUEZ, C.; MOYA, B.; ZAMORANO, L.; SUÁREZ, C.; PEÑA, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; OLIVER, A. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1906-1911, 2011.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.; JONES, R.; SCHMIDT, F.; WALSH, T. Molecular Characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclasse of Metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654-4662, 2004.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections**. Mortality and Morbidity Weekly Reports, v. 51, n. RR-10, p. 1-36, 2002.

CEZÁRIO, R. C.; DUARTE DE MORAIS, L.; FERREIRA, J. C.; COSTA-PINTO, R. M.; DA COSTA DARINI, A. L.; GONTIJO-FILHO, P. P. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 5, p. 269-274, 2009.

CIPRIANO, R.; VIERIRA, V.V.; FONSECA, E.L.; RANGEL, K. FREITAS, F.S.; VINCENTE, A.C. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Peusomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. **Microbial Drug Resistant**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.

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

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Doc M100-S17, v. 28, n. 1, 2007.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Doc M100-S20, v. 30, n. 1, 2010.

CROWDER, M.W.; WALSH, T.R.; BONAVID, L.; PETTIT, M.; SPENCER, J. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 42, n. 4, 921-926, 1998.

CURTIS, C.; MARRIOT, J. LANGLEY, C. Development of a prescribing indicator for objective quantification of antibiotic useage in secondary care. **The Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, v. 54, n. 2, p. 529-533, 2004.

DANTAS, R.C.; FERREIRA, M.L.; GONTIJO-FILHO, P.P.; RIBAS, R.M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and

impact of resistance on outcome. **Journal of Medical Microbiology**. v. 63, n. 12, p. 1679-1687, 2014.

DIEKEMA, D.J.; BEEKMANN, S.E.; CHANPIN, K.C.; MOREL, K.A.; MUNSON, E.; DOERN, G.V. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3655-3660, 2003.

DUNNE, W. M. Jr., HARDIN, D. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patients isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. and *Serratia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5945-5949, 2005.

EL SALABI, A.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R. Novel subclasse of a group B1 metallo-beta-lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. **49th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemoterapy (ICAAC)**. San Francisco, CA, USA. Set 12-15, Poster C1-1365, 2009.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2007**. Bilthoven, 2008.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2008: on-going surveillance of *S. pneumonia*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa***. Bilthoven, 2009.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**. Stockholm, 2010.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**. Stockholm, 2011.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**. Stockholm, 2012.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**. Stockholm, 2013.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 630-636, 2007.

FERREIRA, M.L. Estudo epidemiológico molecular da resistência a carbapenêmicos e fluorquinolonas e sua associação com Sistema de Secreção Tipo III em *Pseudomonas aeruginosa*. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

FRANCO, M.R.; CAIAFFA-FILHO, H.H.; BURATTINI, M.N.; ROSSI, F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics**, v. 65, n. 9, p. 825-829, 2010.

FURTADO, G.H.; D'AZEVEDO, P.A.; SANTOS, A.F.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; MEDEIROS, E.A. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p.315-319, 2007.

FUSTÉ, E.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, L.; SEGURA, C.; GAINZA, E.; VINUESA, T.; VIÑAS, M. Carbapenem-resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1317-1325, 2013.

GAHLOT, R.; NIGAM, C.; KUMAR, V.; YADAV, G; ANUPURBA, S. Catheter-related bloodstream infections. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 4, n. 2, p. 162–167, 2014.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from latin America: results from

SENTRY Antimicrobial Suveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infections Diseases**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GALES, A.C., MENEZES, L.C., SILBERT, S., SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

GALETTI, R. **Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos**. 2010. 49 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

GAYNES, R. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospitals. **Infectious Disease Clinical North America**, v. 11, n. 4, p. 757-765, 1997.

GILBERT, D. N.; SANDE, M. A.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. **The Sanford guide to antimicrobial therapy 2007**, Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Incorporated, 37th ed., 2007.

GONÇALVES, D.C.; LIMA, A.B.; LEAO, L.S.; FILHO, J.R.; PIMENTA, F.C.; VIERIRA, J.D. Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Goiânia, State of Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 4, p. 411-414, 2009.

GONÇALVES, P.S.; MARQUES, M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, O. Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a

Portuguese Central Hospitas: 10-Years Survey. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 2-7, 2014.

GUERNARD, S.; MULLER, C.; MONLEZUN, L.; BENAS, P.; JEANNOT, K.; PLESIAT, P. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 58, n. 1, p. 221-228, 2014.

GUDIOL, C.; BODRO, M.; SIMONETTI, A.; TUBAU, F.; GONZALES-BARCA, E.; CISNAL, M.; DOMINGO-DOMANECH, E.; JIMENEZ, L.; CARRATALA, J. Changing aetiology, clinical features, antimicrobial resistance, and outcomes of bloodstream infection in neutropenic cancer patients. **Clinical Microbiology of Infectious**, v. 19, n. 5, p. 474-479, 2013.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **Journal of Hospital Infectious**, v. 64, n. 3, p. 217-223, 2006.

HARBARTH, S.; FERRIÈRE, K.; HUGONNET, S.; RICOU, B.; SUTER, P.; PITTET, D. Epidemiology and prognostic determinants of bloodstream infections in surgical intensive care. **Archives of Surgery**, v. 137, n. 12, p. 1353-1359, 2002.

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patientoutcomes. **Expertert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v .10, n. 4, p. 441-451, 2010.

HOCQUET, D.; BERTRAND, X.; KOHLER, T.; TALON, D.P.; PLÉSIAT. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n.6, p. 1887-1894, 2003.

JOO, EJ, KANG, C.I.; HÁ, Y.E.; KANG, S.J.; PARK, S.Y.; CHUNG, D.R.; PECK, K.R.; LEE, N.Y.; SONG, J.H. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. **Microbiology Drug Resistant**, v. 17, p. 305-312, 2011.

KANG, C.; KIM, S.; KIM, ET AL. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. **Clinical of Infectious Diseases**, v .37, n. 6, p.745-751, 2003.

KANG, C.I.; KIM, S.H.; PARK, W.B.; LEE, K.D.; KIM, H.B.; KIM, E.C. ET AL.; Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p.760-766, 2005.

KARAIKOS, I.; GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 10, p. 1351-1370, 2014.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

KHUNTAYAPORN, P.; MONTAKANTIKUL, P.; SANTANIRAND, P.; KIRATISIN, P.; CHOMNAWANG, M.T. Molecular investigation of carbapenem resistance among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated clinically in Thailand. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 3, p.170-178, 2013.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J.; WINN, W. C. J. **Bacilos Gram-negativos não-fermentadores**. Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido, 5ª edição, Editora Medsi, Rio de Janeiro, p. 264-329, 2001.

LAU, C.H.; HUGHES, D.; POOLE, K. MexY-promoted aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a putative proximal binding pocket in aminoglycoside recognition. **Mbio**, v. 5, n. 2, 2014.

LAUPLAND, K.B. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. **Journal of Infectious Disease**, v. 192, n. 9, p.1606-1612, 2005.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-B-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEAO, L.A.N.O.; PASSOS, X.S.; REIS, C.; VALADAO, L.M.A.; SILVA, A.R.R.; PIMENTA, F.C. Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 537-540, 2007.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H. B.; KIM, Y. A .;YONG, D. AND YUM, J. H. Modified Hodge and EDTA-disc synergy tests to screen metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 2, p. 88-91, 2001.

LEE, J.Y.; KO, K.S. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **International Journal Antimicrobial**, v. 40, n. 2, p. 168-172, 2012.

LEE, K.; LIM, Y.S.; YONG, D.; YUM, J. H. AND CHONG, Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **J. Clinical Microbiology and Infection**, v. 41, n. 10, p. 4623-4629, 2003.

LEE, K. YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, blaSIM-

1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LI, X.Z.; NIKEIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 64, n. 2, p. 159-204, 2004.

LEMMEN, S.W.; HAFNER, H.; KOTTERIK, S.; LUTTICKEN, R.; TOPPER, R. Influence of an infectious disease service on antibiotic prescription behaviour and selection of multiresistant pathogens. **Journal of Infectious Disease**, v. 28, n. 6, p. 384-387, 2000.

LEPPER, P.M.; GRUSA, E.; REICHL, H.; HOGEL, J.; TRAUTMANN, M. Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2920-2925, 2002.

LEVIN, S.S.; BARONE, A.A.; PENCO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.; MANRIQUE, E.I.; COSTAS, S.F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 1008-1011, 1999.

LI, X.; POOLE, K.; NIKAIDO, H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 27-33, 2003.

LIN, K.Y.; LAUDERDALE, T.L.; WANG, J.T.; CHANG, S.C. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. **Journal of Microbiology and Immunology Infectious**, v. 14, p. 1-8, 2014.

LINCONPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.1, p. 516-519, 2005.

LISTER, P.D. Chromosomally-encoded resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*: therapeutic implications. **American Journal of Pharmacogenomics**, v. 2, n. 4, p. 235-243, 2002.

LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Bacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v. 25, n. 4, p.402–408, 2001.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? **Clinical Infection Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 47, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The B-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 413-420, 2006.

LODISE, T. P. J.R.; PATEL N.; KWA, A.; GRAVES, J.; FURUNO, J.P; GRAFFUNDER, E.; LOMAESTRO, B.; MCGREGOR, J.C. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3510–3515, 2007.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively

drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MAJUMDAR, S.; KIRBY, A.; BERRY, N.; WILLIAMS, C.; HASSAN, I.; EDDLESTON, J.; BURNIE, J.P.; An outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit, Letter to editor, **Journal of Hospital Infection Atlanta**, v. 58, n. 2, p. 160-161, 2004.

MANDELL, G.L.; VENNET, J.E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6a ed. Elsevier Churchill Livingstone, v.1, cap. 43, 2005.

MARRA, A.R.; PEREIRA, C.A.; GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; CAL, R.G.; DE SOUZA, J.M.; EDMOND, M.B.; FARO, C.; WEY, S.B. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 388-390, 2006.

MARÍN, M.; GUDIOL, C.; GARCIA-VIDAL, C.; ARDANUY, C.; CARRATALÀ, J. Bloodstream infections in patients with solid tumors: epidemiology, antibiotic therapy, and outcomes in 528 episodes in a single cancer center. **Medicine (Baltimore)**, v. 93, n. 3, p. 143-149, 2014.

MARTINS, A.F.; ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; BARTH, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamase in hospitals from southern Brazil. **Infection**, v. 35, n. 6, p. 457-460, 2007.

MASEDA G. E.; ALVAREZ, J.; GARNACHO-MONTERO J.; JEREZ V.; LORENTE L.; RODRÍGUEZ O. Update on catheter related bloodstream infections in ICU patients. **Enfermedades Infecciosas e Microbiologia Clínica**, v. 29, n. 4, p.10-15, 2011.

McGOWAN, J.E.Jr. Is antimicrobial resistance in hospital microorganisms related to antibiotic use? **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 63, n. 3, p. 253-268, 1987.

MENDES, R.E. CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Metallo-beta-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.A.; RIBEIRO, J.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMO-16 and fused from aminoglycoside-resistant gene aac(6')-Ib': report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4693-4702, 2004.

MEYER, E.; JONAS, D.; SCHWAB, F.; RUEDEN, H. GASTMEIER, P.; DASCHNER, F.D. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Infection**, v. 47, n. 4, p. 208-215, 2003.

MICEK, S.T.; LLOYD, A.E.; RITCHIE, D.J.; REICHLEY, R.M.; FRASER, V.J.; KOLLEF, M.H. *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1306-1311, 2005.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: Activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727-737, 1999.

MONNET, D.L.; MÖLSTAD, S.; CARS, O. Defined daily doses of antimicrobials reflect antimicrobial prescriptions in ambulatory care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1109-1111, 2004.

MORALES, E.; COTS, F.; SALA, M.; COMAS, M.; BELVIS, F.; RIU, M.; SALVADÓ, M.; GRAU, S.; HORCAJADA, J.P.; MONTERO, M.M.; CASTELLS, X. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **BMC Health Services Research**, v. 12, n. 122, p. 1-8, 2012.

MORATA, L.; COBOS-TRIGUEROS, N.; MARTÍNEZ, J.A.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARCO, F.; STERZIK, H.; NÚÑEZ, R.; HERNÁNDEZ, C.; MENSA, J. Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4833-4837, 2012.

MOREIRA, M.R.; GUIMARÃES, M.P.; RODRIGUES, A. A. A.; GONTIJO-FILHO, P. P. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 39-44, 2013.

MULLER, A.; MONNET, D.L.; TALON, D.; HENON, T.; BERTRAND, X. Discrepancies between prescriber daily doses and WHO defined daily doses of antibacterials at a university hospital. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 585-591, 2006.

NNIS, National Nosocomial Infection Surveillance System Report, Data summary from January 1992 – June 2001, issued August 2001, **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 6, p. 404-421, 2001.

NNIS, National Nosocomial Infection Surveillance System Report, Data summary from January 1992 – June 2004, issued October 2004, **American Journal Infection Control**, v. 32, n. 8, p. 470-485, 2004.

NEVES, P.R., et al. Multirresistência mediada por metalo-beta-lactamase, porinas, bombas de efluxo e metilases, em isolados clinicos de *Pseudomonas aeruginosa*. In: XI CONGRESSO Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 12, p. 30, 2008.

NEVES, P.R. **Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isoaldos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NIKAIDO, H.; PAGES, J.M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 36, n. 2, p. 340-363, 2012.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.

OKEKE IN. **Poverty and root causes of resistance in developing countries.** In: Sosa AJ, Byarugaba DK, Amabile-Cuevas CF, Hsue PR, Kariuk S, Okeke I, editors. Antimicrobial resistance in developing countries. 1 ed. London: Springer; 2010.

ONG, D.S.Y.; JONGERDEN, I. P.; BUITING, A. G.; MAURINE, A.; LEVERSTEIN-VAN, H.; SPEELBERG, B.; KESECIOGLU, J.; BONTEN, M.J.M. Antibiotic exposure and resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacter species in intensive care units. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 11, p. 2458-2463, 2011.

ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ J.A.; ROVIRA, M.; ESTEVE, J.; MENSA, J. Epidemiology and outcome of bacteraemia in neutropenic patients in a single institution from 1991-2012. **Epidemiology and Infection**, v. 30, p. 1-7, 2014.

OLIVEIRA, A.C.; PAULA A.O.; IQUIAPAZA, R.A.; LACERDA, A.C.S. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 89-86, 2012.

PAGANI, L.; COLINON, C.; MIGLIAVACCA, R.; LABONIA, M.; DOCQUIER, J.D.; NUCLEO, E.; SPALLA, M.; LI BERGOLI, M.; ROSSOLINI, G.M. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3824-3828, 2005.

PARAMYTHIOTOU, E.; ICET J.C.; TIMSIT, J.F.; VANJAK, D.; PAUGAM-BURTZ, C.; TROUILLET, J.L.; BELLOC, S.; KASSIS, N.; KARABINIS, A., ANDREMONT A. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity, **Clinical Infections Diseases**, United States, v. 38, n. 5, p. 670-677, 2004.

PATRICK, D.M.; MARRA, F. HUTCHINSON, J.; MONNET, D.L.; NG, H.; BOWIE, W.R. Per Capita antibiotic consumption: how does a North American jurisdiction compare with Europe? **Clinical Infectious Disease**, v. 39, n. 1, p. 11-17, 2004.

PELLEGRINO, F.L.P.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, S.M.G.; NOUER, S.A.; OLIVEIRA, M.P.; SAMPAIO, J.L.M.; FREITAS, A.L.P.; AMAIN, E.L.T.; RILY, L.W.; MOREIRA, B.M. Ocorrence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in diferente hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2420-2424, 2002.

PEREIRA, D.C. **Sistemas de efluxo MexABOprM e MexXY e produção de carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa*: efeito na resistência aos carbapenêmicos.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

PEREZ, F.; HUJER A. M.; HUJER K. M.; DECKER, B.K.; RATHER, P.N.; BONOMO, R.A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 10, p. 3471-3484, 2007.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. Characterization of blaDIM-1, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)**, Helsinki, Finlândia, Pôster 0309, 2009.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MENDEL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R.; editors. **Principles and practice of infectious disease**. 4 ed. New York: Churchill Living stones, p. 1980-1995, 2003.

POOLE, K. KREBES, K.; MCNALLY, C.; NESHAT, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an *ellux* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7372, 1993.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of medicine**, v. 32, n. 3, p. 162-176, 2007.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontier in Microbiology**, v. 2, n. 65, p.1-13, 2011.

QUALE, J.; BRATU, S.; GUPTA, J.; LANDMAN, D. Interplay of efflux system, *ampC* and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1633-1641, 2006.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

QUEIROZ, G.M.; SILVA, L.M.; PIETRO, R.C.L.R.; SALGADO, H.R.N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132-138, 2012.

RODRIGUES, E.; RICHTMANN, R. IrAS: **Infecção relacionada à assistência à saúde-Orientações Práticas**. São Paulo: Sarvier, 2008.

ROSENTHAL, V.D.; MAKI, D.G.; SALOMAO, R.; MORENO, C.A.; MEHTA, Y.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L.E.; ARIKAN, O.A.; ABOUQAL, R.; LEBLEBICIOGLU, H.; INTERNATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION CONTROL CONSORTIUM. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. **Annals of Internal Medicine**, v. 145, n. 8, p. 582-591, 2006.

RUIZ,L.; DOMINGUEZ,M.A.; RUIZ,N.; VIÑAS,M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting, **Archives of Medical Research**, v. 35, n. 3, p. 251-257, 2004.

SABATIER C.; PEREDO R.; VALLÉS J. Bacterial bloodstream infections in critical patients. **Medicina Intensiva**, v.33, n.7, p.336-345, 2009.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.1, p. 25-79, 2004.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas*

aeruginosa in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 1, p. 73-76, 2005.

SAMONIS, G.; VARDAKAS, K.Z.; KOFTERIDIS, D.P.; DIMOPOULOU, D.; ANDRIANAKI, A.M.; CHATZINIKOLAOU, I.; KATSANEVAKI, E.; MARAKI, S.; FALAGAS, M.E. Characteristics, risk factors and outcomes of adult cancer patients with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Infection**, v. 42, n. 4, p. 721 – 728, 2014.

SANTOS, E.F.; LAURIA-PIRES, L.; PEREIRA, M.G.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, I.P.; MAIA, M.O. Use of Antimicrobial Agents in a Intensive Care Unit in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 355-359, 2007.

SHLAES, D.M. Role of Antimicrobial Stewardship in Prevention and control of antibiotic resistance. **Current Infectious Disease Reports**, v. 1, n. 4, p. 334-337, 1999.

SHORR, A.F.; MPH, M.D.; TABAK, W.P. et al. Healthcare-associated bloodstream infection: A distinct entity? Insights from a large U.S. database. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p. 2588-2595, 2006.

SOULI, M., GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 47, p. 1-11, 2008.

SUAREZ, C.; PENA, C.; GAVALDA, L.; TUBAU, F.; MANZUR, A.; DOMINGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 73-78, 2010.

TAM, V.H.; ROGERS, C.A.; CHANG, K.T.; WESTON, J.S.; CAEIRO, J.P.; GAREY, K.W. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.9, p.3717-3722, 2010.

THOUNG, M.; ARVANITI, K.; RUIMY, R.; de la SALMONIERE, P.; SACNVIC-HANIEG, A.; LUERT, J.C.; REGINER, B. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* risk factors for carriage acquisition in intensive care unit, **The Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 4, p. 274-282, 2003.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: resport from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TUON, F.F.; GORTZ, L.W.; ROCHA, J.L. Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy, **Brazillian Journal of Infectious Disease**, v. 16, n. 4, p. 351-356, 2012.

VAN DER BIJ, A.K.; VAN DER ZWAN, D.; PEIRANO, G.; SEVERIN, J.A.; PITOUT, J.D.; VAN WESTREENEN, M.; GOESSENS, W.H. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: the nationwide emergence of a single sequence type. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. 369-372, 2012.

VAN DER BIJ, A.K.; VAN MANSFELD, R.; PEIRANO, G.; GOESSENS, W.H.; SEVERIN, J.A.; PITOUT, J.D.; WILLEMS, R.; VAN WESTREENEN, M. First outbreak of VIM-2 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in The Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 6, p. 513-518, 2011.

VATCHEVA-DOBREVSKA, R.; MULET, X.; IVANOV, I.; ZAMORANO, L.; DOBREVA, E.; VELINOV, T.; KANTARDJIEV, T.; OLIVER, A. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 5, p. 355-361, 2013.

VIDAL, F.; MENSA, J.; ALMELA, M.; MARTINEZ, J.A.; MARCO, F.; CASALS, C.; GATELL, J.M.; SORIANO, E.; JIMENEZ DE ANTA, M.T. Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia with special emphasis on the influence of antibiotic treatment. Analysis of 189 episodes. **Archives of Internal Medicine**, v. 156, p. 2121-2126, 1996.

VITKAUSKIENĖ, A.; SKRODENIENĖ, E.; DAMBRAUSKIENĖ, A.; MACAS, A.; SAKALAUSKAS, R. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 7, p.490-495, 2010.

VOOR IN 'T HOLT, A.F.; SEVERIN, J.A.; LESAFFRE, E.M.; VOS, M.C. Carbapenem use and medical devices highest risk factors for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2626-2637, 2014.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; PAIREL, L.; NORDMAN, P. Metallo-beta-lactamases: the Quiet before the Storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 470-482, 2007.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, Brasília, v. 1, n. 4, 2004.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 147-151, 1991.

WAWRZYNIAK, K.; MIKUCKA, A.; DEPULA, A.; GOSPODAREK, E.; KUSZA, K. Occurrence of alert pathogens in the clinical materials and consumption of antibiotics in the ICU, in the years 2007 and 2008. **Critical Care**, v.14, n.1, P53, 2010.

WHITE, R.L.; FRIEDRICH, L.V.; MIHM, L.B.; BOSSO, J.A. assessment of the relationship between antimicrobial usage and susceptibility: differences between the hospital and specific patient-care areas. **Clinical Infectious Disease**, v.31, n.1, p.16-23, 2000.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.309-317, 2004.

WHO, World Health Organization, Collaborating center for drugs statistics methodology. anatomical Therapeutic Chemical (ATC), Classification index with Defined Daily Doses (DDD), Oslo, Norway, 2000. (disponível no site www.whocc.no).

WOLTER, D.J.; LISTER, P.D. mechanisms of beta-lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 2, p. 209-222, 2013.

WOODFORD, N. **Rapid Characterization of β -lactamases by Multiplex PCR**. In: Gillespie, s. h.; McHugh, T. D. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology, v. 642, p. 181-192, 2010.

XAVIER, D.E.; PICÃO, R.C.; GIRARDELLO, R.; FEHLBERG, L.C.; GALES, A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 217- 223, 2010.

YONEDA, K.; CHIKUMI, H.; MURATA, T.; GOTOH, N.; YAMAMOTO, H.; FUJIWARA, H.; NISHINO, T.; SHIMIZU, E. Measurement of *Pseudomonas*

aeruginosa multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 1, p. 125-131, 2005.

YONG, D.; BELL, J.M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. A Novel Sub-Group Metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 Emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. **47th Interscience Conference in Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**. Chicaco, IL, USA, Pôster C1-539, 2007.

ZANETTI, G.; BALLY, F.; GREUB, G.; GARBINO, J.; KINGE, T.; LEW, D.; ROMAND, J.A.; BILLE, J.; AYMOND, D.; STRATCHOUNSKI, L.; KRAWCZYK, L.; RUBISTEIN, E.; CHALER, M.D.; CHIOLERO, R.; GLAUSER, M.P.; COMETTA, A. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of Nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, porspective, randomized study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3442-3447, 2003.

ZAVASCKI, A.P.; CRUZ, R.P.; GOLDANI, L.Z. High rate of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil. **Infectious Control of Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 805-807, 2004.

ZAVASCKI, A.P.; GASPARETO, P.B.; MARTINS, A.F.; GONCALVES, A.L.; BARTH, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1148-1151, 2005.

ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L.; GONÇALVES, A. L.; MORO, A. L.; FERNANDES, J. F.; MARTINS, A. F.; RAMOS, F.; GOLDANI, L. Z. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 387–392, 2006.

Apêndice I

Pacientes com mais de um episódio de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* diagnosticados durante o período de estudo

Paciente N°	Unidade Hospitalar	Episódio 1 (S ou R CBP)	Episódio 2 (S ou R CBP)	Episódio 3 (S ou R CBP)
1181	Unidade Queimados	11/07/2010 (S)	31/07/2010 (S)	X
7128	Clínica Médica	21/07/2010 (S)	16/08/2010 (R)	X
1189	UTI	21/08/2011 (R)	12/02/2011 (R)	18/03/2011 (R)

Episódios diferentes foram considerados quando de um intervalo mínimo de 15 dias

Apêndice II – DDD de cada antimicrobiano/mês, de junho/2009 a dezembro/2012

Período	Imipenem	Meropenem	Cefepime	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Levofloxacina
jun/09	16.3	27.1	95	74.8	6.0	3.2
jul/09	8.9	62.2	110.3	84.8	6.1	2.3
ago/09	10.4	82.7	138.6	88.3	5.0	1.6
set/09	17.4	59.1	105.1	80	4.0	1.7
out/09	15.2	32.9	119.4	95.4	5.6	1.2
nov/09	15	36.5	88.3	87.5	9.9	1.1
dez/09	17.9	23.3	127.9	65.9	9.5	0.7
jan/10	24.4	22.8	138.2	82.3	9.4	7.0
fev/10	23.1	26.4	131.1	73.4	5.3	2.9
mar/10	18.4	28.5	132.8	89.7	14.3	3.6
abr/10	26.9	13.8	133.6	86.2	7.1	9.2
mai/10	22.6	20.7	174.3	94.4	12.2	3.1
jun/10	18.3	24.1	150.2	80.4	10.6	3.7
jul/10	23.3	27.5	143.6	91.4	12.5	3.3
ago/10	23.4	38.3	122	89.6	9.5	3.2
set/10	22.6	19.3	179.2	100.5	10.8	5.1
out/10	25.9	28.6	182.8	101.4	13.9	5.3
nov/10	28.6	29.5	138.1	92.5	5.3	4.1
dez/10	16.8	26.7	120.4	87.1	13.1	3.6
jan/11	21.4	24.1	136.4	84.8	10.71	5.1
fev/11	18.9	23.5	137.4	76.3	11.16	4.4
mar/11	15.5	27.5	149.8	71.6	13.11	2.2
abr/11	29.3	19.6	175.7	86.5	9.13	1.8
mai/11	16.5	25.3	181.4	90.3	8.86	1.3
jun/11	19.5	28.8	157.8	78.1	5.69	1.2
jul/11	20.6	27.4	120.5	75.9	7.3	0.63
ago/11	18.7	36.8	134.4	83	9.86	0.79
set/11	14.6	19.9	140.6	80.7	12.5	1.5
out/11	17.1	28.8	159.6	80.9	10.09	0.94
nov/11	13	19.3	125.3	76.9	11.18	2.1
dez/11	17.1	19.5	152.8	84.8	14.5	0.69
jan/12	26.9	32.9	224.8	99.7	22.7	11.0
fev/12	29.5	27.6	170.8	72.8	15.1	6.0
mar/12	23.3	31.2	203.1	101.7	28.7	10.9
abr/12	14.2	14.9	153.4	84.9	9.3	5.8
mai/12	19.2	27.3	254.1	118.5	12.2	11.8
jun/12	12.0	20.7	63.6	118.8	17.9	10.4
jul/12	22.7	33.4	103.1	101.1	17.4	15.4
ago/12	17.4	50.9	155.1	107.2	19.1	11.6
set/12	17.9	37.7	226.7	120.9	15.5	9.0
out/12	16.8	45.6	159.7	109.5	20.3	8.5
nov/12	18.7	49.9	212.9	113.7	26.8	13.7
dez/12	13.9	34.1	147.7	83.1	11.2	6.9

Apêndice III - Expressão gênica relativa (RQ) dos 14 isolados de *P. aeruginosa* em comparação à cepa de referência *P. aeruginosa* PAO1

Isolado N.	Genes					
	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexF</i>	<i>mexD</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>
1	1,503	5,845	0,213	33,614	20,010	0,110
2	1,270	19,615	0,600	0,050	31,6011	1,650
3	6,448	14,029	5,516	1,124	0,476	0,040
4	28,112	0,073	18,614	0,006	9,793	0,003
5	52,167	34,088	85,678	1,475	90,141	0,149
6	5,399	13,453	9,202	2,875	65,343	0,241
7	24,063	53,449	3,118	22,816	258,339	0,879
8	30,036	1,810	0,182	0,254	140,672	0,182
9	2,061	1,342	0,938	5,752	273,420	0,015
10	1,194	12,337	25,315	11,246	9,104	0,035
11	58,556	10,945	3,913	0,295	5,782	1,253
12	1,744	3,754	2,919	0,114	236,811	0,043
13	1,690	1,086	12,556	3,215	191,028	0,001
14	64,729	40,850	34,478	29,681	239,933	0,737

Apêndice IV – Gráficos da Expressão Relativa dos genes *mexB*, *mexY*, *mexF*, *mexD*, *ampC* e *oprD*

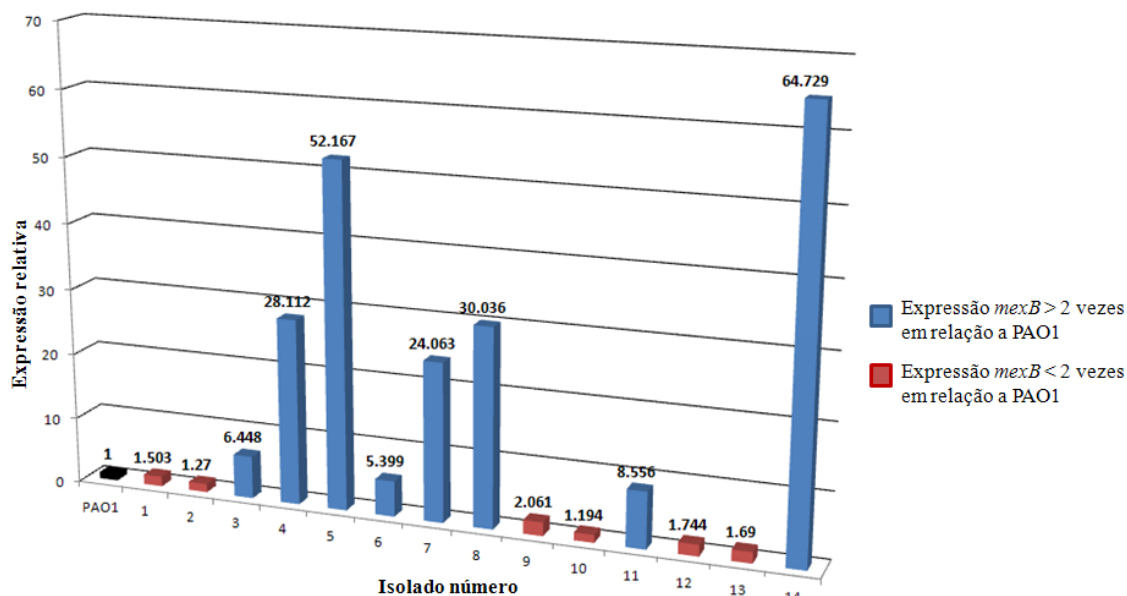


Figura 1. Expressão relativa de *mexB* dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a cepa de referência PAO1.

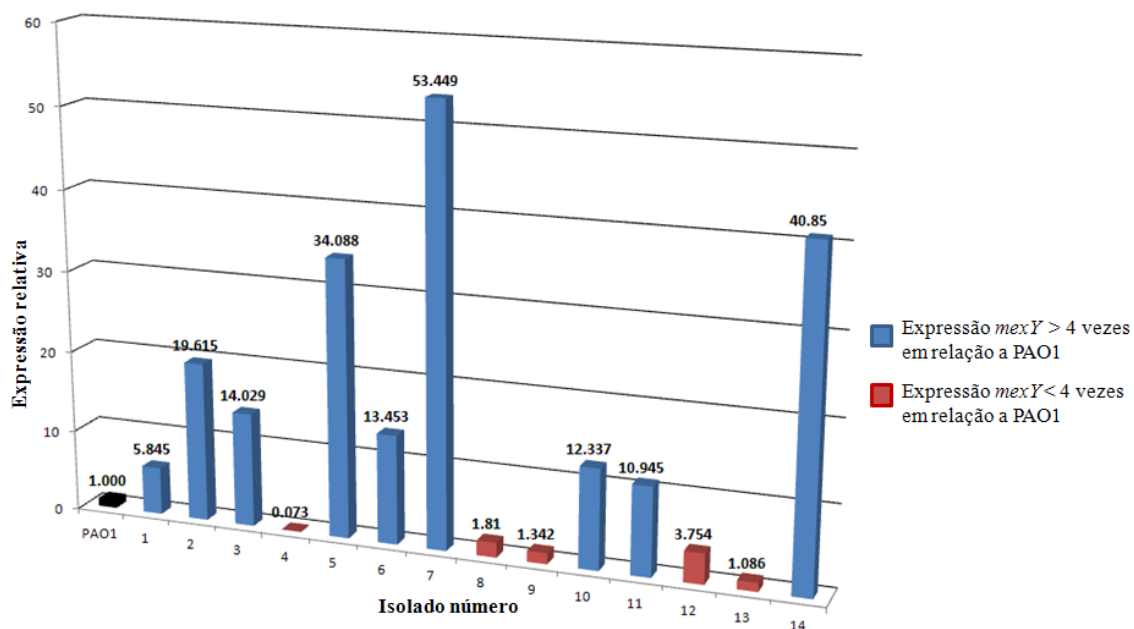


Figura 2. Expressão relativa de *mexY* dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a cepa de referência PAO1.

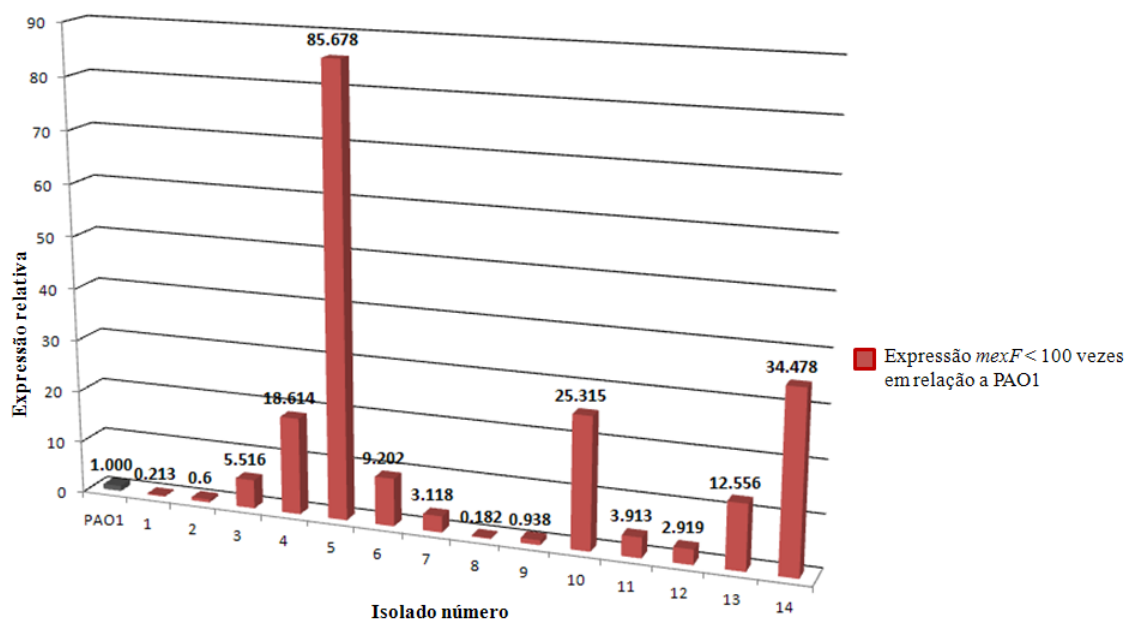


Figura 3. Expressão relativa de *mexF* dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a cepa de referência PAO1.

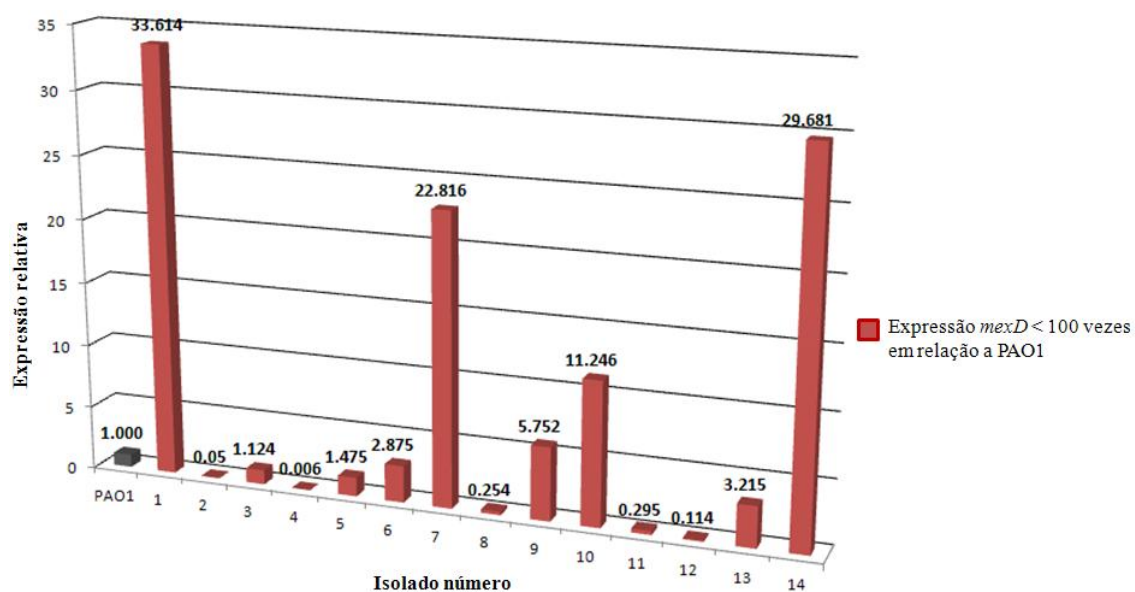


Figura 4. Expressão relativa de *mexD* dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a cepa de referência PAO1.

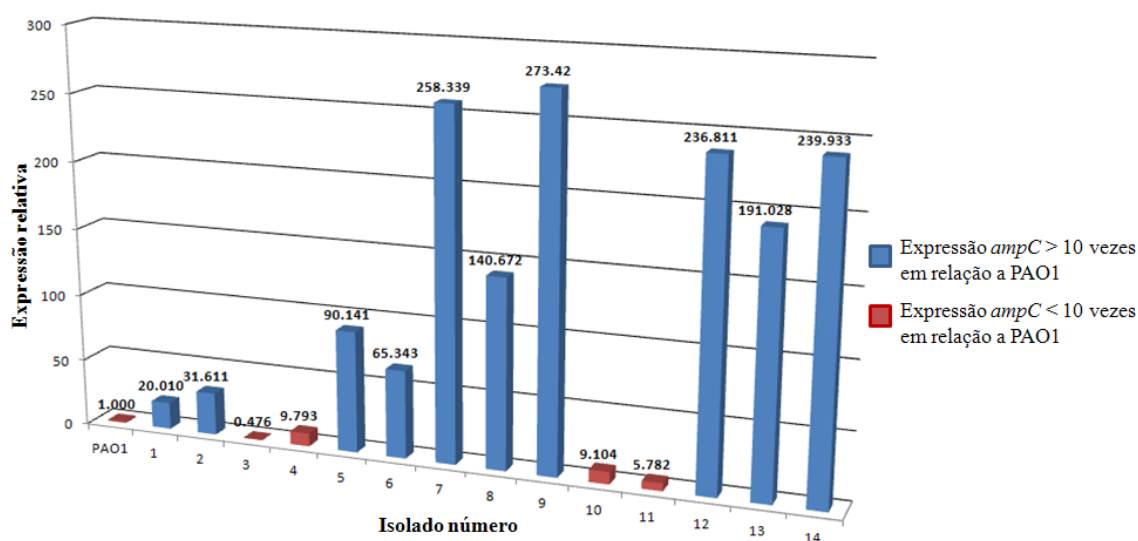


Figura 5. Expressão relativa de *ampC* dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a cepa de referência PAO1.

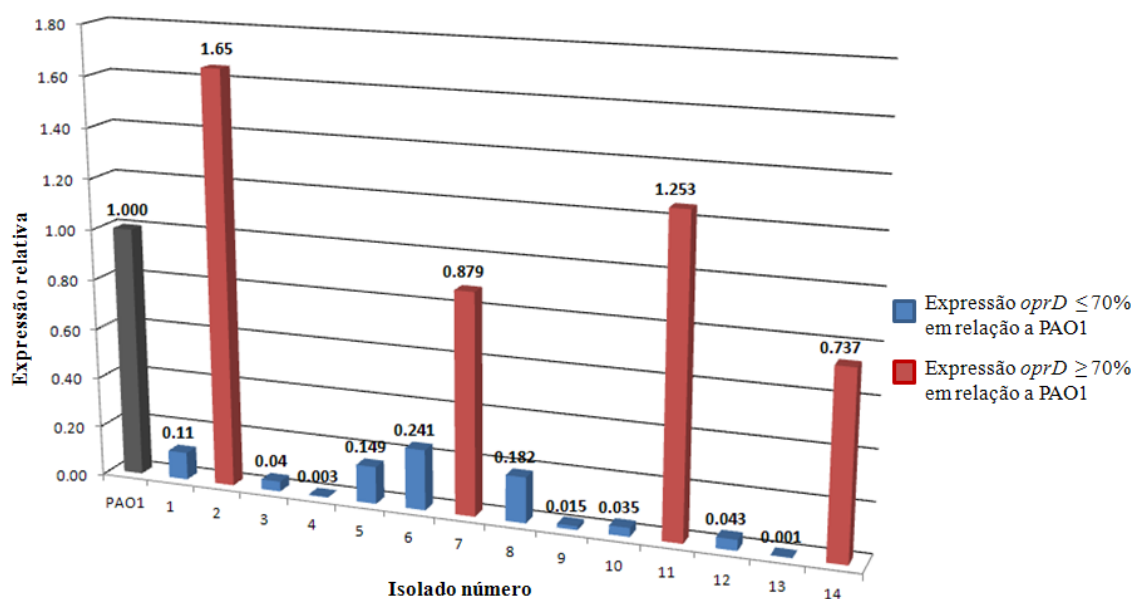


Figura 6. Expressão relativa de *oprD* dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a cepa de referência PAO1.

ANEXO I

[illegible]

ANEXO II - CEP


 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) 3239-4131
 e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissao.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº. 550/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU 223/09**

Projeto Pesquisa: Detecção de ESBL, AmpC e Metallo-B-Lactamase em amostras clínicas de Bacilos Gram-negativos de amostras de sangue de pacientes internados em um hospital universitário Mineiro.

Pesquisador Responsável: Rosineide Marques Ribas

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:

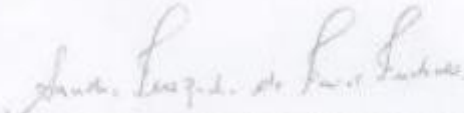
- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao 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.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

Data de entrega do relatório final: Dezembro de 2010

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

Uberlândia, 23 de outubro 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 descontinuar a pesquisa conforme definida 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 do 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.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista.

Universidade Federal de Uberlândia/MG

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo molecular dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue

Área Temática:

Pesquisador: Rosineide Marques Ribas

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

CAAE: 00763112.7.0000.5152

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 47897

Data da Relatoria: 15/06/2012

Apresentação do Projeto:

O estudo se justifica pela elevada frequência de resistência bacteriana frente a antibióticos.

O tema já foi tratado em estudo anterior (132/10 CEP/UFU), que versava sobre análise de frequência de tal ocorrência para *Pseudomonas aeruginosa*. Agora, é proposto estudo caso-controle para avaliar a casuística de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* no Hospital de Clínicas de Uberlândia, compreendendo o período entre março de 2011 e março de 2013. Como casos, serão incluídos aqueles pacientes infectados por microorganismo resistente a carbapenêmicos; como controle, os pacientes com infecções sensíveis ao medicamento.

Serão utilizadas fichas de coleta de dados demográficos e epidemiológicos, as quais serão preenchidas por consulta em prontuários. Ainda, haverá coleta de material biológico (sangue) para cultivo microbiológico e posterior investigação geno e fenotípica, a qual será contrastada entre casos e controles. Ressalte-se que a coleta de sangue é necessária ao diagnóstico específico da condição e, portanto, é pertinente ao atendimento usual do paciente.

A análise estatística é pertinente ao delineamento (teste de qui-quadrado, Fisher, odds-ratio e t de Student).

Propõe-se avaliação de 130 sujeitos a serem pesquisados, tendo sido apresentado cálculo amostral na resposta às pendências.

A equipe proponente é composta pela coordenadora (microbiologista) e uma colaboradora (doutoranda em Imunologia e Parasitologia).