



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**EPIDEMIOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR DE PNEUMONIAS ASSOCIADAS
À VENTILAÇÃO MECÂNICA POR *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTE/SUSCEPTÍVEL AO IMIPENEM EM PACIENTES INTERNADOS NA
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE ADULTOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Sabrina Royer

Uberlândia – MG

Fevereiro 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**EPIDEMIOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR DE PNEUMONIAS ASSOCIADAS
À VENTILAÇÃO MECÂNICA POR *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTE/SUSCEPTÍVEL AO IMIPENEM EM PACIENTES INTERNADOS NA
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE ADULTOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre.

Sabrina Royer

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho (orientador)

Profa. Dra. Marise Dutra Asensi (co-orientadora)

Uberlândia – MG

Fevereiro 2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
- E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: www.imunoparasito.ufu.br (034)3218-2333



Sabrina Royer

“Epidemiologia clássica e molecular de Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica por *Acinetobacter baumannii* resistente ao imipenem em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. Kátia Regina Netto dos Santos – UFRJ

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho (Orientador) – ICBIM/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- R891e Royer, Sabrina, 1981-
2013 Epidemiologia clássica e molecular de pneumonias associadas à
ventilação mecânica por *Acinetobacter baumannii* resistente/susceptível
ao imipenem em pacientes internados na unidade de terapia intensiva de
adultos do hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia /
Sabrina Royer. – 2013.
58 f. : il.

Orientador: Paulo P. Gontijo Filho.
Coorientador: Marise Dutra Asensi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia -- Teses. 2. Pneumonia -- Teses. 3. *Acinetobacter
baumannii* -- Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Asensi, Marise
Dutra. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 579

Dedico esta dissertação a Deus, aos meus pais e irmãos,
pelo incentivo e amor que guiaram o meu caminho.
Esta conquista também pertence a vocês!

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus, por sempre guiar meu caminho. Muito obrigada, Senhor, por essa grande conquista.

Aos meus familiares, principalmente meus pais Darcy e Ivete, por todo amor, carinho e compreensão. Aos meus irmãos, André, Betina e Tiago, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Paulo P. Gontijo Filho, pela oportunidade de aprendizado, disponibilidade, dedicação e exemplo.

À minha co-orientadora, Dra. Marise Dutra Asensi, e todos os alunos e técnicos do LAPIH – IOC/Fiocruz, RJ, pela atenção, oportunidade e treinamento.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia, Daiane, Ana Luiza, Paola, Melina, Raquel, Juliana, Deivid, Michel, Lílian, Nayara, Iara, Ana Paula, Rosana, e tantos outros, pela convivência, carinho e respeito.

Aos colegas de mestrado, que compartilharam tantas dificuldades e desafios e que se tornaram também amigos.

Aos sempre colegas e amigos da 1^a turma de Biomedicina da UFU, em especial, Caroline, Everton, Cynthia, Patrícia, Isabella, Marcela, Ana Carolina e Bruna.

A todos os amigos queridos, que estão presentes em todos os momentos e que comemoram comigo mais esta vitória.

Aos professores da Microbiologia: Profa. Dra. Rosineide, Prof. Dr. Geraldo, Prof. Dra. Denise, Profa. Dra. Karinne, Profa. Dra. Renata, pela disponibilidade e ajuda de sempre.

Às professoras que aceitaram o convite de participar da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas, Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah e Profa. Dra. Renata Cristina Cezário, pelo apoio, colaboração e sugestões propostas.

Às professoras Kátia Regina Netto dos Santos (UFRJ) e Rosineide Marques Ribas (UFU), por terem aceitado o convite de participar da minha banca de Mestrado, juntamente com meu orientador prof. Paulo.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Claudete, Ricardo e Samuel, pela ajuda, apoio, paciência e pelas valiosas dicas e ensinamentos.

A todos os funcionários da UTI Adulto do HC-UFU.

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

A todos os docentes do PPIPA e a todos os funcionários da UFU.

A CAPES, pela bolsa de estudo.

Muito Obrigada!

Lista de Abreviaturas e Siglas

<	Menor
>	Maior
\leq	Menor ou igual
\geq	Maior ou igual
μg	Microgramas
μL	Microlitros
AmpC	Ampicilinase
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMI	Amicacina
APS	Ampicilina/sulbactam
ASIS	<i>Average Severity of Illness Score</i>
BGN-NF	Bacilos gram negativos não-fermentadores
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COL	Colistina
CPIS	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FiO ₂	Fração Inspirada de Oxigênio
GEN	Gentamicina
HC-UFG	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IC	Intervalo de confiança
IOC/Fiocruz	Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
IMI	Imipenem
IMP	Imipenemase
LAS	Limite de Alerta Superior
LCS	Limite de Controle Superior
M β L	Metalo- β -lactamase

mg	Miligramma
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> , Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Milimolar
MR	Multirresistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina
OR	<i>Odds Ratio</i>
OXA	Oxacilinase
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
pb	<i>base pair</i> , par de base
PB	Polimixina B
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PM	Padrão de peso molecular
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
REP-PCR	<i>Repetitive Element Palindromic PCR</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SENTRY	“Antimicrobial Surveillance Program”
SIM	Seoul Imipenemase
THM	Teste de Hodge Modificado
TIG	Tigeciclina
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia / mililitro
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase
VM	Ventilação Mecânica
vs.	Versus
β	Beta
χ ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1.	Objetivo Geral.....	21
2.2.	Objetivos Específicos.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.	Hospital.....	21
3.2.	Desenho de estudo.....	21
3.3.	Definições.....	22
3.4.	Avaliação da gravidade do paciente pelo escore “Average Severity of Illness Score”, ASIS.....	23
3.5.	Escore clínico de infecção pulmonar (CPIS).....	23
3.6.	Coleta do Aspirado Traqueal.....	24
3.7.	Coleta de Amostras de Ambiente.....	24
3.8.	Técnica de coleta (“Wipe-rinse”) de Ambiente.....	25
3.9.	Técnicas Microbiológicas.....	25
3.9.1.	Cultivo de amostras de Ambiente.....	25
3.9.2.	Identificação.....	25
3.9.3.	Estocagem.....	25
3.9.4.	Testes de susceptibilidade “ <i>in vitro</i> ” aos antimicrobianos.....	26
3.9.5.	Detecção fenotípica de oxacilinas (OXA).....	27
3.10.	Análise Molecular.....	27
3.10.1.	Extração de DNA.....	27
3.10.1.2	Detecção genotípica de OXA carbapenemases por Multiplex PCR.....	27
3.10.2.	Tipagem molecular pela técnica de <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	28
3.10.2.1	Extração do DNA genômico.....	28
3.10.2.2	Digestão com endonucleases de restrição.....	29
3.10.2.3	Eletroforese em campo pulsado – PFGE.....	29
3.11.	Análise pelo Comitê de Ética da UFU.....	29
3.12.	Análise Estatística.....	29
4.	RESULTADOS.....	30
5.	DISCUSSÃO.....	38
6.	CONCLUSÕES.....	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
	ANEXOS.....	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama de controle do nível endêmico das taxas de PAV/paciente-dia na UTI de adultos do HC-UFU, no período de outubro de 2011 a junho de 2012..... 33
- Figura 2:** Análise por multiplex PCR das culturas de *A. baumannii* de aspirado traqueal e superfície. Linha: Tamanho molecular em pares de bases (pb) (1Kb DNA Extension Ladder InvitrogenTM), controles OXA-23, -24, -58, e -143 da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar do IOC/Fiocruz, números de 1-14 (amostras de aspirado traqueal), 15-20 (amostras de superfície) e 21-23 (amostras de aspirado traqueal susceptíveis aos carbapenêmicos)..... 34
- Figura 3:** Distribuição temporal de casos de PAV por *A. baumannii* e perfil de resistência das amostras aos carbapenêmicos, na UTI de adultos do HC-UFU, no período de abril de 2011 a junho de 2012..... 37
- Figura 4:** Dendograma resultante de análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), amostra, pulsotipo, data de isolamento, origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* de aspirado traqueal e de superfície, na Unidade de Terapia Intensiva de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Escala representa as porcentagens de similaridade. AMI, amicacina; APS, ampicilina-sulbactam; COL, colistina; GEN, gentamicina; IMI, imipenem; PB, polimixina B; TIG, tigeciclina..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cálculo do Escore Clínico de Infecção Pulmonar.....	24
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR para a detecção dos genes codificadores de oxacilinases.....	28
Tabela 3. Características demográficas e clínicas, fatores de risco e evolução dos pacientes com PAVs causadas por <i>A. baumannii</i> vs. <i>P. aeruginosa</i> na UTI de adultos do HC-UFU, no período de abril de 2011 a junho de 2012.....	31
Tabela 4. Regressão logística múltipla dos fatores de risco para PAV por <i>A. baumannii</i> em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU.....	33
Tabela 5. Prevalência de contaminação na mesa de cabeceira, grade da cama e maçaneta da porta dos quartos dos pacientes com PAV por <i>A. baumannii</i> , antes e depois da limpeza, na UTI de adultos do HC-UFU.....	35
Tabela 6. Perfil de susceptibilidade das amostras clínicas de <i>Acinetobacter baumannii</i> obtidas dos 30 pacientes com PAV internados na UTI de Adultos do HC-UFU no período de abril/2011 a junho/2012.....	36
Tabela 7. Perfil de susceptibilidade das 31 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> recuperadas do ambiente dos quartos dos pacientes com PAV por esse microrganismo internados na UTI de Adultos do HC-UFU no período de abril/2011 a junho/2012.....	36

RESUMO

Introdução: Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) está associada com taxas significativas de mortalidade e morbidade, adicionando consideráveis custos hospitalares, aspectos ainda mais significativos quando relacionados com microrganismos multirresistentes. **Objetivos:** Realizar estudo epidemiológico clássico e molecular de PAV causada por *Acinetobacter baumannii*, avaliar os fatores de risco associados a essas infecções versus aquelas por *Pseudomonas aeruginosa*, detectar a contaminação de superfícies próximas a pacientes com PAV por *A. baumannii* antes e após a limpeza, bem como caracterizar os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e a disseminação clonal desse microrganismo recuperado de espécime clínico e de superfície. **Material e métodos:** Foi realizado estudo de coorte prospectivo a fim de avaliar os potenciais fatores de risco associados às PAVs por *A. baumannii* vs. *P. aeruginosa*, na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG), no período de abril de 2011 a junho de 2012. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes e avaliados por análises estatísticas uni e multivariada. Apenas amostras clínicas de *A. baumannii* foram obtidas de culturas de aspirado traqueal e os pacientes identificados com PAV por esse microrganismo foram selecionados para amostragem ambiental. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados através do sistema automatizado VITEK® 2 ou através do método de disco difusão e a detecção fenotípica de oxacilinases através do teste de Hodge modificado. Foram utilizadas as técnicas de multiplex PCR para identificar a presença dos genes *bla_{OXA}* e a de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) para tipagem molecular. A investigação foi aprovada pelo comitê de ética da UFU. **Resultados:** No total, foram detectados 30 pacientes com PAV por *A. baumannii* e 30 por *P. aeruginosa* no período investigado e, após análise de regressão logística múltipla, apenas o diagnóstico de admissão trauma (OR 7.2122, 95% IC 1.62 - 32.10, p=0.0095) e terapia antimicrobiana inapropriada (OR 17.2911, 95% IC 2.61 - 114.50, p=0.0031) permaneceram como variáveis independentes associadas com o desenvolvimento de PAV por *A. baumannii*. A taxa de mortalidade hospitalar em 30 dias foi mais elevada, mas não significativa ($p > 0,05$), no grupo com PAV por *P. aeruginosa* (36,67%) do que por *A. baumannii* (29,63%). A maioria (56,7%) das amostras clínicas foi resistente ao imipenem e todas aquelas, clínicas ou de superfície, com resistência a este antibiótico, apresentaram o gene que codifica a OXA-23. A contaminação ambiental foi mais expressiva na grade da cama independente do momento da coleta. No total, oito genótipos foram identificados, quatro deles com 80% de similaridade, com os genótipos A (n=9; 52,9%, amostras clínicas) e H (n=4; 66,6%, amostras de superfície) predominando. **Conclusões:** O diagnóstico de admissão trauma e a terapia antimicrobiana inapropriada foram os únicos fatores de risco independentes associados aos casos de PAV por *A. baumannii*. A maioria das amostras de *A. baumannii* de casos clínicos foi resistente ao imipenem e apresentaram o gene *bla_{OXA-23}*, incluindo aquelas recuperadas de superfície, e identificou-se a coexistência de vários pulsotipos na unidade, com maior prevalência de dois clones distintos A e H, respectivamente, nos casos de PAV e na superfície.

Palavras-chave: Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), *Acinetobacter baumannii*, epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Introduction: Ventilator-associated pneumonia (VAP) is associated with significant morbidity and mortality, adding considerable costs to hospital care, aspects even more significant when related to multiresistant microorganisms. **Objectives:** To conduct an epidemiological study of classical and molecular VAP caused by *Acinetobacter baumannii*, evaluate risk factors associated with these infections versus those by *Pseudomonas aeruginosa*, detect contamination of surfaces near patients with VAP by *A. baumannii* before and after cleaning, and to characterize the mechanisms of resistance to carbapenems and the clonal spread of this microorganism recovered from clinical specimen and surface. **Methods:** We conducted a prospective cohort study to assess the potential risk factors associated with PAVs by *A. baumannii* vs. *P. aeruginosa* in an adult intensive care unit of the Uberlandia Federal University-Hospital Clinic (UFU-HC), from April 2011 to June 2012. Clinical and epidemiological data were obtained from patient charts and evaluated by univariate and multivariate statistical analyzes. Only clinical isolates of *A. baumannii* were obtained from cultures of endotracheal aspirate and patients identified as having VAP by this microorganism were selected for environmental sampling. The antimicrobial susceptibility testing was performed using the automated system VITEK® 2 or by disk diffusion method and the phenotypic detection of oxacillinases through the modified Hodge test. Multiplex polymerase chain reaction was used to detect *bla_{OXA}* genes and pulsed-field gel electrophoresis was performed for molecular typing. The research was approved by the ethics committee of UFU.

Results: Overall, we detected 30 patients with VAP by *A. baumannii* and 30 by *P. aeruginosa* during the study period and after multiple logistic regression analysis, only trauma admission diagnosis (OR 7.2122, 95% CI 1.62 - 32.10, p = 0.0095) and inappropriate antimicrobial therapy (OR 17.2911, 95% CI 2.61 - 114.50, p = 0.0031) remained as an independent variables associated with the development of *A. baumannii* VAP. The hospital mortality rate (30 days) was higher, but not significant (p > 0.05) in the group with VAP by *P. aeruginosa* (36.67%) than by *A. baumannii* (29.63%). The majority (56.7%) of clinical isolates were resistant to imipenem and all those, clinical or of surface, with resistance to this antibiotic, presented the gene encoding OXA-23. Environmental contamination was more expressive in the bed rail independent of the time of collection. Overall, eight genotypes were identified, four of them with 80% similarity, with genotypes A (n = 9, 52.9%, clinical isolates) and H (n = 4, 66.6%, isolates of surface) predominating. **Conclusions:** Trauma as admission diagnosis and inappropriate antimicrobial therapy were the only independent risk factors associated with cases of *A. baumannii* VAP. Most isolates of clinical cases of *A. baumannii* were resistant to imipenem and presented the *bla_{OXA-23}* gene, including those recovered from surface, and were identified the coexistence of several pulsotypes in the unit, with a higher prevalence of two distinct clones A and H, respectively, in the cases of VAP and on surface.

Key words: Ventilator-associated pneumonia (VAP), *Acinetobacter baumannii*, molecular epidemiology.

1. INTRODUÇÃO

Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é a infecção hospitalar mais frequente adquirida em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), com incidência variando de 6 a 52% (JOSEPH et al., 2010 a). Ela é definida como aquela que se desenvolve após 48 horas de intubação endotraqueal e ventilação mecânica (VM) (DAVIS, 2006) e está associada com o tempo de ventilação e período de internação prolongado, resultando em mortalidade e custos hospitalares elevados, aspectos ainda mais significativos quando estão relacionados com microrganismos multirresistentes (MR) (BOUADMA et al., 2010; CHAN et al., 2010).

A taxa de PAV é maior nos países em desenvolvimento do que aquela relatada em UTIs dos EUA, com uma taxa de 13,6 versus 3,3 por 1000 ventilador-dia, respectivamente (ROSENTHAL et al., 2010). Na UTI de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG), a frequência de pacientes em uso de VM é de aproximadamente 30% e a taxa de incidência de PAV por 1000 dias associada a este procedimento é alta, de 24,7 (MOREIRA et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

Pacientes hospitalizados em UTIs sofrem alterações na microbiota normal incluindo a da mucosa do trato respiratório superior, com substituição de bactérias como espécies de *Streptococcus* por bacilos gram-negativos (BGN) como representantes da família Enterobacteriaceae, além de não-fermentadores com destaque para *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, e gram-positivos como *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) (BASSI et al., 2010). Essa alteração ocorre a partir de 5 a 7 dias de internação e é favorecida pela gravidade do estado clínico do paciente, pelo uso de procedimentos invasivos e, sobretudo, pela utilização de antibióticos (RELLO et al., 2002). Esta colonização é um fator de risco para o posterior desenvolvimento de PAV (KIENINGER; LIPSETT, 2009). A introdução de prótese na traquéia compromete os mecanismos de defesa e juntamente com a diminuição no nível de consciência do paciente facilita a microaspiração de secreções da orofaringe para o pulmão, favorecendo o desenvolvimento de pneumonia, especialmente em pacientes imunocomprometidos (CRNICH; SAFDAR; MAKI, 2005; KIENINGER; LIPSETT, 2009).

Além da utilização da VM, sua duração e o comprometimento do nível de consciência do paciente, os seguintes fatores de risco são associados a esta infecção: idade avançada, gravidade do “status” clínico, presença de comorbidades, imunossupressão, trauma, cirurgia, uso de procedimentos invasivos, corticóides e antibióticos e prolongado período de internação (JOSEPH et al., 2010 b; HUGONNET; UÇKAY; PITTEL, 2007; SANDIUMENGE; RELLO, 2012). Em estudo realizado na UTI de Adultos do HC-UFG, o tempo de utilização de VM (\geq

7 dias), traqueostomia e uso de mais de 3 antibióticos foram fatores de risco independentes para o desenvolvimento de PAV (ROCHA et al., 2008).

O diagnóstico de pneumonia nosocomial é complexo e atualmente baseia-se na somatória de dados clínicos, radiológicos e microbiológicos, inexistindo um padrão-ouro (ZILBERBERG; SHORR, 2010). Os critérios mais utilizados são presença de novo ou progressivo infiltrado em radiografia de tórax e presença de duas ou três das seguintes características clínicas: temperatura $>38^{\circ}\text{C}$, leucocitose ou leucopenia, secreção respiratória purulenta, cultura de secreção do trato respiratório inferior positiva, e quando de cultura quantitativa, um ponto de corte de $\geq 10^6$ Unidades Formadoras de Colônia - UFC/ml para aspirado endotraqueal, 10^4 UFC/ml para o lavado broncoalveolar e 10^3 UFC/ml para o escovado protegido, e, nas culturas semiquantitativas, um crescimento “moderado” de bactérias (PELEG; HOOPER, 2010). Estes critérios podem ser pontuados permitindo a definição de um escore clínico de infecção pulmonar (“Clinical Pulmonary Infection Score”, CPIS) muito utilizado no diagnóstico de pneumonia, quando ≥ 6 , e com reservas quanto a sua sensibilidade e especificidade (ZILBERBERG; SHORR, 2010).

A PAV é classificada em precoce e tardia, a primeira ocorrendo nos quatro dias iniciais de uso de VM e associada a melhor prognóstico, e a segunda após ≥ 5 dias de ventilação e associada com taxas de morbidade e mortalidade mais elevadas (JOSEPH et al., 2010 b). Os microrganismos responsáveis pela PAV precoce são usualmente *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, enquanto as tardias são causadas por patógenos gram-negativos nosocomiais MR como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Klebsiella* spp., e gram-positivos, como MRSA (HUNTER, 2006). Dados mais recentes sobre microbiologia das PAVs mostram que os BGNs, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, são predominantes principalmente nos países em desenvolvimento, mas também em hospitais da América do Norte e Europa (ARABI et al. 2008; PELEG; HOOPER, 2010; HIDRON et al., 2008).

O gênero *Acinetobacter* engloba microrganismos cocobacilares gram-negativos, estritamente aeróbios, não-fermentadores, catalase positivos, oxidase-negativos e imóveis (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Entre as diferentes espécies compreendidas nesse gênero, *A. baumannii* é a de maior importância clínica, representando 75% dos isolados de *Acinetobacter* de espécimes clínicos (GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELAKOPOULOU, 2008). Considerada, no passado, bactéria de baixa virulência, atualmente é reconhecida como patógeno hospitalar importante, particularmente em infecções em pacientes críticos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). Esse microrganismo é

responsável por uma variedade de infecções nosocomiais, incluindo bacte remia, infecção do trato urinário, meningite e é um dos agentes de pneumonia mais frequentes em pacientes em uso de VM (KARAGEORGOPoulos; FALAGAS, 2008; GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2010).

A emergência, nos hospitais, deste microrganismo, tem sido atribuída à sua capacidade de resistir à dessecação no ambiente e nas mãos de profissionais de saúde por prolongado período de tempo, sua elevada resistência intrínseca aos antimicrobianos e desinfetantes, assim como a capacidade de adquirir mecanismos de resistência às poucas classes de antibióticos disponíveis (TOWNER, 2009).

Vários estudos evidenciam a contaminação de diferentes sítios no ambiente hospitalar por pacientes infectados (FOURNIER; RICHET, 2006; DENTON et al., 2005; HANLON, 2005), com relatos de *Acinetobacter* spp. sobrevivendo em superfícies de: ventilador, equipamento de aspiração, colchão, travesseiro, umidificador, grade de cama, cabeceira, entre outras (PATERSON, 2006). Evidências da presença de microrganismos epidemiologicamente importantes por longos períodos em superfícies secas, e particularmente naquelas passíveis de serem tocadas pelas mãos de profissionais de saúde, enfatizam o potencial do ambiente na epidemiologia (reservatório) de infecções hospitalares (OBASI et al., 2009).

A avaliação do impacto da mortalidade nas infecções por *A. baumannii* em pacientes hospitalizados permanece matéria de controvérsia (MARAGAKIS; PERL, 2008; PEREZ et al., 2007). Aspectos tais como o número limitado de pacientes, como em nossa investigação, a heterogeneidade metodológica e a dificuldade em parear adequadamente controles quanto à gravidade da doença do grupo caso, contribuem para esta indefinição (ABBO et al., 2007; FALAGAS; KOPTERIDES; SIEMPOS, 2006; FOURNIER; RICHET, 2006; MARAGAKIS; PERL, 2008). Há relatos na literatura de taxas de mortalidade atribuída a essas infecções variando de 10 a 43% (FALAGAS; BLIZIOTIS; SIEMPOS, 2006). Portanto, alguns autores defendem que a infecção por *A. baumannii* é um marcador para aqueles pacientes com doença grave e não um preditor independente de mortalidade (ALBRECHT et al., 2006).

As infecções por *Acinetobacter* tornaram-se ainda mais importantes com o aparecimento de amostras resistentes aos carbapenêmicos, grupo de escolha no tratamento de infecções graves causadas por esse microrganismo, considerando as poucas opções terapêuticas disponíveis (MARAGAKIS; PERL, 2008; MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2008), representadas por polimixinas B e E e tigeciclina (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; KARAGEORGOPoulos et al., 2008; TOWNER, 2009). A frequência de *Acinetobacter* MR aumentou durante as últimas duas décadas nos hospitais, sobretudo como consequência do

amplo uso de agentes antimicrobianos potentes de amplo espectro (TOWNER, 2009). Em alguns hospitais brasileiros amostras já apresentam taxas de resistência aos carbapenêmicos oscilando de 25% a 45% e, consequentemente as polimixinas, são amplamente utilizadas, apesar de sua toxicidade (LEVIN et al., 1999). Há relatos de amostras pan-resistentes, com mecanismos de resistência para as várias classes de antibióticos disponíveis, fazendo necessária uma combinação terapêutica no tratamento de infecções graves (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VALENCIA et al., 2009). Infecções causadas por amostras susceptíveis aos antibióticos são usualmente tratadas com cefalosporinas de amplo espectro, combinações de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamasas ou carbapenêmicos, usados isoladamente ou em combinação com aminoglicosídeos (MUNOZ-PRICE, WEINSTEIN, 2008).

No Brasil, infecções hospitalares diversas causadas por *A. baumannii*, bem como relacionadas a surtos em UTIs, emergiram a partir de 1996 (LEVIN et al., 1996), com detecção crescente de amostras resistentes aos carbapenêmicos e MR, tornando-se uma ameaça em muitos hospitais (ROSSI, 2011).

A. baumannii produz β -lactamasas que inativam penicilinas, cefalosporinas, incluindo aquelas de espectro estendido das famílias TEM-1, SHV e CTX-M, além de carbapenemases (GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2010). As cefalosporinases do tipo AmpC, de origem cromossomal, e β -lactamasas da classe B (Metalo- β -Lactamasas, M β Ls), como VIM (Verona Imipenemase), IMP (Imipenemase) e SIM (Seoul Imipenemase), que hidrolisam diversos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, também estão presentes (THOMSON; BONOMO, 2005). No entanto, as β -lactamasas mais difundidas com atividade carbapenemase são as oxacilinases, denominadas OXA, da classe D de Ambler. Essas enzimas pertencem a três grupos independentes de β -lactamasas resistentes ao ácido clavulânico, representadas pela OXA-23, OXA-24 e OXA-58, podendo ser codificadas por genes plasmidiais ou cromossomais (BROWN; AMYES, 2006; POIREL; NORDMANN, 2006; POURNARAS et al., 2006). Os genes responsáveis por essa resistência em *A. baumannii* não foram associados à presença de integrons, como em *Pseudomonas aeruginosa* (VILA; PACHÓN, 2008; MUNOZ-PRICE, WEINSTEIN, 2008).

As carbapenemases do tipo OXA emergiram globalmente como o principal mecanismo responsável pela resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* (CARVALHO et al., 2009; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). Recentemente, a variedade dessas enzimas aumentou substancialmente, sendo divididas em oito subgrupos, quatro identificados em *A. baumannii*: OXA-23-“like” (OXA-23, OXA-27 e OXA-49), OXA-24-

“like” (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72), OXA-58 e OXA-51-“like”, esse último constituindo uma família de enzimas cromossomais típicas de *A. baumannii* (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006), usado como marcador taxonômico da espécie (HÉRITIER et al., 2005). Em estudos realizados em São Paulo (ANTONIO et al., 2011) e no Rio de Janeiro (FIGUEIREDO et al., 2011) com amostras clínicas de *A. baumannii*, foi descrita pela primeira vez a presença do gene *bla*_{OXA-58} no país, respectivamente. Outra enzima da classe D, a OXA-143, foi detectada em amostras de sangue de um surto observado em UTI brasileira cuja prevalência permanece a ser determinada (HIGGINS et al., 2009). Essas amostras hidrolisam penicilinas, oxacilina, imipenem e meropenem, mas não hidrolisam cefalosporinas de espectro estendido e permanecem susceptíveis à ampicilina-sulbactam, colistina, tigeciclina e netilmicina (HIGGINS et al., 2009).

No Brasil, a OXA-23 é a principal responsável pela resistência de amostras hospitalares, com a primeira descrição realizada em Curitiba, quando de um surto no ano de 2003 (DALLA-COSTA et al., 2003). Posteriormente, em 2009, foram descritas a disseminação de diferentes clones produtores de OXA-23 no Rio de Janeiro (CARVALHO et al., 2009), bem como em Porto Alegre (MARTINS et al., 2009), evidenciando-se no segundo a transmissão clonal entre profissionais da saúde, equipamentos médicos e pacientes. A sua presença também foi relatada em quatro hospitais de São Paulo (MOSTACHIO et al., 2009), com o genótipo *bla*_{OXA-23-like} como o mais frequente entre as amostras resistentes aos carbapenêmicos.

A resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos também está ligada à perda de canais de porinas da membrana externa (THOMSON; BONOMO, 2005) e superexpressão de bombas de efluxo capazes de remover diversos antimicrobianos da célula bacteriana, incluindo β-lactâmicos, fluorquinolonas, e aminoglicosídeos (GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2010). A resistência aos aminoglicosídeos pode ser mediada por enzimas inativadoras, mecanismo de resistência que parece ser o mais frequente (VILA; PACHÓN, 2008). As mutações nos genes *gyrA* ou *parC* contribuem para resistência às fluorquinolonas (BONOMO; SZABO, 2006; VILA; PACHÓN, 2008).

A detecção rápida e efetiva de isolados clínicos de *A. baumannii* é crucial para o estabelecimento de terapia antimicrobiana apropriada, além de contribuir para prevenir sua disseminação nos hospitais (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Adicionalmente, a tipagem molecular é fundamental na compreensão da epidemiologia de surtos, já que estabelece o grau de similaridade entre as diferentes amostras auxiliando na identificação do

reservatório, modo de transmissão e associação com as fontes de infecção (SINGH et al., 2006).

A prevalência de *A. baumannii* em infecções hospitalares e a ocorrência de surtos por amostras MR aumentaram consideravelmente na última década (COELHO et al., 2006; NEMEC et al., 2008; POIREL; NORDMANN, 2006) fazendo-se imprescindível o emprego de métodos de tipagem molecular adequados para a investigação epidemiológica (HAMOUDA et al., 2010). Entre os métodos mais utilizados, incluem-se: ribotipagem, PCR, técnicas de macrorestrição, RFLP, RAPD, REP-PCR, “*Amplified Fragment Length Polymorphism*” (AFLP), eletroforese de campo pulsado (“*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”, PFGE) e “*Multilocus sequence typing*” (MLST).

Como em outros microrganismos as amostras MR de *A. baumannii* apresentam-se em relativo pequeno número de clones (COELHO et al., 2006; PATERSON, 2006; van den BROEK et al., 2006). Investigações de epidemiologia molecular são recomendadas para determinar a presença de clones sendo que a técnica de PFGE permanece como o método de escolha, considerada o “padrão-ouro” para caracterização de amostras de *Acinetobacter* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; HAMOUDA et al., 2010). Estudos evidenciaram que amostras MR de áreas geográficas distantes, ao contrário de amostras susceptíveis, são relacionadas clonalmente, o que sugere que o problema de resistência pode estar associado com número limitado de linhagens de *A. baumannii* que obtiveram êxito (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; NEMEC et al., 2008; van DESSEL et al., 2004).

A emergência de *A. baumannii* como um dos principais agentes de infecções relacionadas aos cuidados de saúde, sobretudo infecções graves como PAVs e de corrente sanguínea, em pacientes de unidades críticas e imunocomprometidos, e a possibilidade de sua transmissão por várias vias como: contato direto, mãos de profissionais de saúde, além do ar, exige uma melhor avaliação da epidemiologia local dessas infecções. Na UTI de Adultos do HC-UFG, a resistência aos carbapenêmicos aumentou consideravelmente nos últimos anos, e por isso há limitações significativas quanto à escolha de agentes antimicrobianos. Adicionalmente, a falta de recursos humanos e financeiros para a implementação das boas práticas de prevenção e controle de infecções hospitalares, facilita a transmissão intra-hospitalar desse microrganismo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar estudo epidemiológico clássico e molecular de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), causada por *Acinetobacter baumannii*, suscetível/resistente aos carbapenêmicos, na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG).

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar:

- os fatores de risco intrínsecos e extrínsecos associados a essas infecções versus aquelas por *Pseudomonas aeruginosa*,
- a mortalidade hospitalar no prazo de até 30 dias,
- a contaminação de superfícies próximas a pacientes diagnosticados com PAV por esse microrganismo,
- o perfil de resistência “*in vitro*” das amostras aos antimicrobianos,
- a presença dos genótipos OXA de resistência através do PCR,
- a relação clonal entre os isolados de *A. baumannii* recuperados de espécimes clínicos de PAVs e de superfícies pela técnica de PFGE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Hospital

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG), instituição de ensino com 530 leitos que oferece assistência de nível terciário. A Unidade de Terapia Intensiva de Adultos (UTI) é uma unidade mista, clínico-cirúrgica, com 30 leitos. Durante o período de estudo, no mês de setembro/2011, a unidade sofreu mudanças físico-estruturais e passou de 15 para 30 leitos.

3.2. Desenho do estudo

Foi realizado estudo de coorte prospectivo incluindo pacientes com diagnóstico de PAV por *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, internados na UTI de Adultos, no período de abril de 2011 a junho de 2012, compreendendo pacientes adultos (≥ 18

anos), quando do primeiro episódio de PAV por *A. baumannii* ou *P. aeruginosa*, detectados através de vigilância ativa na unidade. As características demográficas, clínicas e epidemiológicas foram obtidas dos prontuários médicos e uma ficha individual foi preenchida com os dados dos pacientes (Anexo I). Adicionalmente, foi solicitada a autorização do paciente/responsável para a participação na pesquisa mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

Apenas amostras clínicas (aspirado traqueal) e de ambiente (superfícies) de *A. baumannii* foram recuperadas a fim de avaliação microbiológica e molecular.

3.3. Definições

- **PAV:** foi definida como hospitalar quando da apresentação do quadro clínico em um período ≥ 48 horas de internação na UTI e uso de prótese ventilatória, através de critérios: radiológicos - desenvolvimento de infiltrado radiológico novo e/ou progressivo, microbiológico - cultura quantitativa de aspirado traqueal com contagem $\geq 10^6$ UFC/mL, e clínico-laboratoriais - com a presença de pelo menos dois dos seguintes sinais/sintomas - secreção respiratória purulenta, temperatura corpórea superior à 38°C ou inferior a 35°C , leucocitose sanguínea ($>10.000/\text{mL}$) ou leucopenia ($<4.000/\text{mL}$) (EDWARDS et al., 2007; PELEG, HOOPER, 2010). O escore clínico de infecção pulmonar (“Clinical Pulmonary Infection Score”, CPIS) foi calculado para cada paciente conforme descrito no item 3.5. (ZILBERBERG; SHORR, 2010).

-**Terapia antimicrobiana prévia:** utilização de um agente antimicrobiano por pelo menos 48 horas nas duas semanas que antecederam a coleta do aspirado traqueal (CHANG et al., 2011).

-**Terapia antimicrobiana empírica inapropriada:** quando a amostra for resistente “*in vitro*” aos antimicrobianos administrados quando da prescrição empírica (KOLLEF, 2000; MAGNOTTI et al., 2011).

- **Mortalidade hospitalar:** no prazo de até 30 dias após o desenvolvimento do diagnóstico de infecção (PEÑA et al., 2008).

- **Microrganismo multirresistente:** resistente a três ou mais classes de antibióticos (FALAGAS; KOLETSI; BLIZIOTIS, 2006).

- **Indicadores epidemiológicos** - os valores foram calculados para todas as PAVs, independente da etiologia, e incluíram:

-Taxa de incidência de PAVs: relação entre o número total de PAVs e o número total de ventiladores-dia, vezes 1000 (EDWARDS et al., 2007).

-Densidade de uso de prótese ventilatória: relação entre o número de dispositivo-dias (número total de dias de exposição ao dispositivo para todos os pacientes da população selecionada no período considerado) e o número de pacientes-dia (EDWARDS et al., 2007).

-Confecção do diagrama do nível endêmico das taxas de PAV/ paciente-dia, de acordo com o trabalho de Arantes e colaboradores (2003).

3.4. Avaliação da gravidade do paciente pelo escore “Average Severity of Illness Score”, ASIS

Foi calculado o ASIS, para todos pacientes com suspeita de PAV por *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, na data da coleta do aspirado traqueal. Os pontos foram totalizados conforme referido a seguir: um ponto para pacientes cirúrgicos que necessitassem apenas de uma observação pós-operatória de rotina, dois pontos para aqueles não cirúrgicos, estáveis fisiologicamente e que necessitassem de observação *overnight*, três pontos para os pacientes que necessitassem de cuidado e monitoração constante da enfermagem, quatro pontos para aqueles fisiologicamente instáveis, necessitando de cuidados intensivos médicos e de enfermagem e de frequentes reajustes da terapia, e cinco pontos para os fisiologicamente instáveis, em coma ou choque e que necessitassem de ressuscitação cardiopulmonar ou cuidados intensivos médicos e de enfermagem com reavaliação frequente (ROSENTHAL et al., 2006).

3.5. Escore clínico de infecção pulmonar (CPIS)

O CPIS foi determinado para todos pacientes com suspeita de PAV por *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, na data da coleta do aspirado traqueal, e calculado com base em pontos atribuídos aos sinais e sintomas de pneumonia, dados radiológicos, laboratoriais e microbiológicos, como descrito na tabela 1 (ZILBERBERG; SHORR, 2010), considerando-se como ponto de corte contagem ≥ 6 .

Tabela 1. Cálculo do Escore Clínico de Infecção Pulmonar.

Parâmetros	Pontos
Temperatura, °C	
36,5 - 38,4	0
38,5 - 38,9	1
≥ 39,0 e ≤ 36,0	2
Nível de Leucócitos no sangue, Leucócitos/mm ⁻³	
4.000 - 11.000	0
< 4.000 ou > 11.000	1
+ bastões ≥ 500	2
Secreção Traqueal	
< 14 +	0
≥ 14 +	1
+ Secreção purulenta	2
Oxigenação, PaO ₂ : FiO ₂ , mmHg	
> 240 ou SARA	0
≤ 240 e sem SARA	2
Radiografia Pulmonar	
Sem infiltrado	0
Infiltrado difuso ou irregular	1
Infiltrado localizado	2
Cultura do aspirado traqueal (semiquantitativo: 0 - 1, 2 ou 3+)	
Cultura das bactérias patogênicas ≤ 1 ou nenhum crescimento	0
Cultura das bactérias patogênicas > 1 +	1
+ Cultura da mesma bactéria patogênica identificada no Gram > 1+	2

NOTA: SARA - Síndrome da Angústia Respiratória Aguda; PaO₂: FiO₂ - razão da pressão parcial de oxigênio arterial pela fração de oxigênio inspirado.

3.6. Coleta do Aspirado Traqueal

Foi realizada durante a higienização da árvore ventilatória, por meio de sonda nº12, no início da manhã, por fisioterapeutas ou enfermeiros da unidade, em tubo de ensaio estéril e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do HC-UFG, para cultivo e identificação. As culturas caracterizadas como *Acinetobacter* foram preservadas a -20°C em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) acrescido de 15% de glicerol para posteriores análises microbiológicas e moleculares.

3.7. Coleta de Amostras de Ambiente

A amostragem ambiental foi realizada nos quartos da UTI ocupados por pacientes com PAV por *A. baumannii* e as coletas realizadas antes e após a limpeza de rotina da unidade, totalizando seis coletas por paciente, sendo a metade (três) antes e as demais após a limpeza do local.

Locais de coleta:

- Superfícies próximas ao paciente onde as mãos dos profissionais de saúde entram em contato (grade da cama)

- Superfícies localizadas até um metro do paciente (mesa de cabeceira)
- Superfícies distantes (>1m) do paciente (maçaneta da porta)

3.8. Técnica de coleta (“Wipe-rinse”) de Ambiente

A coleta foi realizada através de gaze pré-umidificada estéril (7 x 7 cm), removida cuidadosamente de um tubo, pressionada sobre a superfície através de movimentos circulares e então transferida para um frasco estéril contendo 10-15 mL de “Trypticase Soy Broth” (TSB), seguindo-se agitação por 20-30 segundos em Vortex e incubação *overnight* a 37°C (AL-HAMAD; MAXWELL, 2008).

3.9. Técnicas Microbiológicas

3.9.1. Cultivo de amostras de Ambiente

A partir do crescimento em TSB (item 3.8), a suspensão resultante foi inoculada em Agar MacConkey utilizando-se a técnica de esgotamento, seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001).

3.9.2. Identificação

As amostras isoladas de superfícies foram caracterizadas como *A. baumannii* pelos seguintes testes fenotípicos clássicos: reação de citocromo-oxidase, oxidação da glicose pelo teste de “Oxidação e Fermentação” (OF), crescimento em “Triple Sugar Iron” (TSI), utilização de citrato e motilidade. Como amostras controle foram utilizadas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001). A identificação das amostras clínicas de aspirado traqueal foi realizada no Laboratório de Microbiologia do HC-UFGU através do sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux).

3.9.3. Estocagem

As amostras de *A. baumannii* provenientes de aspirado traqueal isoladas no Laboratório de Microbiologia do HC-UFGU foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), cultivadas em “Trypticase Soy Agar” (TSA) pela técnica de esgotamento para obtenção de cultura pura e, posteriormente, subcultivadas em tubos com BHI acrescido de 15% de glicerol, seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas e a suspensão resultante estocada em temperatura de -20°C (KONEMAN;

ALLEN; JANDA, 2001). As culturas de *A. baumannii* obtidas de amostras do ambiente foram estocadas pela mesma técnica.

3.9.4. Testes de susceptibilidade “*in vitro*” aos antimicrobianos

Foi determinada pelos métodos de disco difusão, para as amostras de superfície, e diluição em gel (MIC), para as provenientes de aspirado traqueal, de acordo com os critérios recomendados pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2010).

De acordo com o método de disco difusão, as culturas estocadas foram subcultivadas em Agar TSA pela técnica de esgotamento e incubadas a 37°C por 24 horas. Cerca de 3 a 5 colônias representativas foram semeadas em 5mL de caldo TSB seguindo-se incubação a 37°C até atingir uma turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland, que corresponde aproximadamente à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, e semeadura da suspensão resultante em placa de Agar Mueller-Hinton com auxílio de “swab” de modo a obter crescimento confluente. Os discos com antimicrobianos foram aplicados sobre a superfície das placas e estas incubadas a 37°C por 24 horas. Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: amicacina, ampicilina/sulbactam, cefepime, ciprofloxacina, polimixina B, gentamicina, imipenem e tigeciclina. Pela inexistência de dados sobre tigeciclina para *Acinetobacter* spp., foram usados os pontos de corte propostos pelo “Food and Drug Administration” (FDA) listados para Enterobacteriaceae (≤ 2 , 4 e $\geq 8\mu\text{g}/\text{mL}$ para amostras suscetíveis, intermediárias e resistentes, respectivamente). Como amostras padrão foram utilizadas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

A susceptibilidade pelo método de diluição em gel (MIC) foi determinada através do VITEK® 2 (bioMérieux). As culturas teste foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma solução com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland e em seguida, diluídas 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 de maneira a 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 microrganismo.

3.9.5. Detecção fenotípica de oxacilinases (OXA)

As amostras com sensibilidade reduzida à carbapenêmicos, em especial resistência ao imipenem, foram submetidas ao Teste de Hodge Modificado (THM), originalmente descrito por Lee e colaboradores (2001). Uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland de *E. coli* ATCC 25922 foi preparada em caldo TSB, posteriormente diluída (1:10) e semeada em placa de Petri contendo Agar Mueller-Hinton a fim de obter um crescimento confluinte. No centro da placa foi acrescido um disco de ertapenem ou meropenem (10 μ g) e a cultura teste estriada da borda do disco até a periferia da placa. Após incubação *overnight* a 37°C, a observação de uma distorção (“endentação”) na zona de inibição da *E. coli* próximo à borda do inóculo da cultura teste foi interpretado como teste positivo para presença de carbapenemase.

3.10. Análise Molecular

3.10.1. Extração de DNA

Foi realizada de acordo com o método descrito por Jin e colaboradores (2009), com pequenas modificações. Amostras de *A. baumannii* foram cultivadas *overnight*, a 37°C, em Agar TSA e 5 a 6 colônias foram transferidas para tubos *eppendorf* com 500 μ L de água ultrapura e então passadas em agitador tipo Vortex. A suspensão resultante foi então fervida a 99°C por 10 min no termociclador *Eppendorf Mastercycler*, o sobrenadante com DNA extraído transferido para outro tubo, quantificado por espectrofotometria e conservado a -20°C até a utilização.

3.10.1.2. Detecção genotípica de OXA carbapenemases por Multiplex PCR

Utilizou-se o método de multiplex PCR descrito por Woodford e colaboradores (2006) e Higgins, Lehmann e Seifert (2010). Foram utilizados os *primers* relacionados na tabela 2.

A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 μ L utilizando os seguintes reagentes: 14,25 μ L de H₂O, 2,5 μ L de tampão de PCR 10X, 0,2 mM de dNTP mix, 1,5 μ L de MgCl₂, 0,25 μ L de cada *primer* de oxacilinase, 1,25 U de DNA polimerase e 1 μ L de DNA bacteriano. A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 25 s, anelamento a 52 °C por 40 s, extensão a 72 °C por 50 s, e extensão final a 72 °C por 6 min. Após amplificação do DNA, o produto final foi submetido à eletroforese em gel

de agarose 1,5% a 100V por cerca de 40 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (10mg/mL) durante 15 minutos e descorado em água por mais 15 minutos, para então ser visualizado utilizando o Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR para a detecção dos genes codificadores de oxacilinases.

Primer	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' - 3')	Gene alvo	Tamanho do Amplicon (pb)
OXA23-F	5'-GATCGGATTGGAGAACAGA-3'		
OXA 23-R	5'-ATTCTGACCGCATTCCAT-3'	<i>bla</i> _{OXA-23}	501
OXA 24-F	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3'		
OXA 24-R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'	<i>bla</i> _{OXA-24}	246
OXA 51-F	5'-TAATGCTTGATCGGCCTTG-3'		
OXA 51-R	5'-TGGATTGCACTCATCTTGG-3'	<i>bla</i> _{OXA-51}	353
OXA 58-F	5'-AAGTATTGGGGCTTGCTG-3'		
OXA 58-R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'	<i>bla</i> _{OXA-58}	599
OXA 143-F	5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT-3'		
OXA 143-R	5'-TAATCTGAGGGGGCCAACC-3'	<i>bla</i> _{OXA-143}	149

3.10.2. Tipagem molecular pela técnica de *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)

3.10.2.1. Extração do DNA genômico

A técnica de PFGE foi realizada seguindo o protocolo descrito por Romão e colaboradores (2005), com modificações. As amostras de *A. baumannii* foram inicialmente cultivadas em Agar TSA a 37°C *overnight*. A seguir, 5 colônias foram suspensas em 2 mL de salina estéril e centrifugadas (700 x g por 5 minutos), o sedimento foi ressuspensionado em 2mL de salina estéril e centrifugado (700 x g por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” foram adicionados: 30µL de 50mM de EDTA (pH=8,0), 10µL de solução de lisozima (10 mg/ml) e 200µL de solução TEN (100mM Tris - 100mM EDTA - 150 mM de NaCl, pH=7,5). Um volume de 240µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2% foi adicionado e a mistura solidificada em blocos. Os blocos de agarose foram incubados *overnight* a 50°C, em solução EC (10 mM EDTA - 6 mM Tris – 0,5% lauril sarcosil – 0,5% Brij 58 – 0,2% desoxicolato de sódio – 5,84% NaCl, pH 7,5) a 37°C e então tratados com solução de proteinase K (0,5 M EDTA - 1% lauril sarcosil - 1mg/ml proteinase K, pH 9,3). Posteriormente, os blocos foram lavados com água ultrapura, equilibrada com TE (100 mM Tris – 100 mM EDTA, pH 7,5) e estocados a 4°C até o uso.

3.10.2.2. Digestão com endonucleases de restrição

Antes da restrição, os blocos foram lavados quatro vezes com solução de DNS (20mM Tris - 1 mM MgCl₂) e então com 100 µl do tampão da enzima de restrição. Após este processo, o bloco de agarose foi transferido para uma solução contendo 30 U de *Apal* (Invitrogen®) e incubado durante 20h por 37°C.

3.10.2.3. Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Ao término da digestão enzimática do DNA, um bloco de cada amostra foi posicionado nos “slots” do gel de agarose preparado na concentração de 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X. Nos orifícios localizados nas extremidades do gel foram colocados discos contendo os marcadores de peso molecular “*lambda ladder*”. As canaletas foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão a 1% (g/v) em tampão TBE 0,5X.

A seguir, o gel foi submetido à eletroforese no aparelho CHEF-DR III® (BioRad) utilizando pulso inicial de 5s, pulso final 15s, durante 18 horas a 6V/cm a 14°C, com ângulo de 120°. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (10mg/mL) e então visualizado utilizando o Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia). Os padrões de banda foram inicialmente comparados por intermédio de inspeção visual de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (1995) e posterior análise pelo programa BioNumerics v.4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). A comparação dos padrões de banda foi então realizada pelo método de UPGMA (“Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages”) utilizando o coeficiente de similaridade de Dice.

3.11. Análise pelo Comitê de Ética da UFU

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de protocolo 228/11 (Anexo III).

3.12. 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. 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.

4. RESULTADOS

No total, foram identificados 30 pacientes com PAV causada por *A. baumannii* e 30 pacientes com PAV por *P. aeruginosa*, no período de abril de 2011 a junho de 2012. Foram excluídos do estudo epidemiológico três pacientes com PAV por *A. baumannii* associada a outro microrganismo (mista). As características demográficas e clínicas, incluindo os fatores de risco e a evolução dos pacientes infectados por essas bactérias, estão representadas na tabela 3. Os fatores de risco para aquisição de PAV por *A. baumannii* através da análise univariada ($p \leq 0,05$) foram: diagnóstico de admissão trauma, escore ASIS >4, microrganismo MR e terapia antimicrobiana inapropriada. A taxa de mortalidade hospitalar em 30 dias foi mais elevada ($p > 0,05$) no grupo com PAV por *P. aeruginosa* (36,67%) do que por *A. baumannii* (29,63%) e o prazo médio de mortalidade após o diagnóstico de PAV foi de 28,37 dias para o primeiro grupo versus 19,67 dias para o segundo grupo. Entretanto, após análise de regressão logística múltipla, apenas o diagnóstico de admissão trauma (OR 7.2122, 95% IC 1.62 - 32.10, $p=0.0095$) e terapia antimicrobiana inapropriada (OR 17.2911, 95% IC 2.61 - 114.50, $p=0.0031$) permaneceram como variáveis independentes associadas com o desenvolvimento de PAV por *A. baumannii* (Tabela 4).

Tabela 3. Características demográficas e clínicas, fatores de risco e evolução dos pacientes com PAVs causadas por *A. baumannii* vs. *P. aeruginosa* na UTI de adultos do HC-UFG, no período de abril de 2011 a junho de 2012.

Características	Microrganismo		p-valor	OR (95% IC)
	<i>A. baumannii</i> N= 27 (%)	<i>P. aeruginosa</i> N= 30 (%)		
Idade [média]; ± DP ^a	49.89; ±16.84	58.97; ±19.46	0.0636	-
Gênero				
Masculino	21 (77.78)	24 (80.00)	0.8372	0.8750 (0.2446 – 3.130)
Feminino	6 (22.22)	6 (20.00)		
Diagnóstico de admissão				
Clínico	7 (25.92)	21 (70.00)	0.0009	0.1500 (0.04691 – 0.4797)
Cirúrgico	2 (7.41)	1 (3.33)	0.5986	2.320 (0.1982 – 27.15)
Trauma	18 (66.67)	8 (26.67)	0.0025	5.500 (1.762 – 17.17)
Comorbidades				
Tabagismo	7 (25.92)	11 (36.67)	0.3837	0.6045 (0.1939 – 1.885)
Alcoolismo	7 (25.92)	6 (20.00)	0.5944	1.400 (0.4044 – 4.846)
Diabetes mellitus	2 (7.41)	6 (20.00)	0.2583	0.3200 (0.05870 – 1.745)
Cardiopatia	6 (22.22)	15 (50.00)	0.0299	0.2857 (0.08994 – 0.9076)
Doença pulmonar	5 (18.52)	4 (13.33)	0.7220	1.477 (0.3526 – 6.188)
Nefropatia	5 (18.52)	4 (13.33)	0.7220	1.477 (0.3526 – 6.188)
Acidente vascular cerebral	0 (0.0)	2 (6.66)	0.4925	0.2073 (0.009507 – 4.519)
Neoplasia	0 (0.0)	1 (3.33)	1.0000	0.3576 (0.01396 – 9.160)
Traumatismo crânioencefálico	8 (29.63)	4 (13.33)	0.1950	2.737 (0.7178 – 10.44)
ASIS ^b (> 4)	13 (48.15)	6 (20.00)	0.0244	3.714 (1.152 – 11.98)
CPIS ^c ≥ 6 ^d	8 (6~10)	7 (6~10)	0.3415	-
Traqueostomia	21 (77.78)	17 (56.67)	0.0914	2.676 (0.8391 – 8.537)
Hemodiálise	3 (11.11)	15 (50.00)	0.0019	0.1250 (0.03089 – 0.5058)
Cirurgia	20 (74.07)	19 (63.33)	0.3837	1.654 (0.5306 – 5.157)

Microrganismo MR ^e	14 (51.85)	7 (23.33)	0.0258	3.538 (1.138 – 11.00)
Terapia antimicrobiana				
Inapropriada	21 (77.78)	8 (26.67)	0.0001	9.625 (2.853 – 32.47)
Apropriada	6 (22.22)	22 (73.33)		
Terapia antimicrobiana empírica				
≥ 2	25 (92.59)	25 (83.33)	0.4273	2.500 (0.4426 – 14.12)
Carbapenêmicos	10 (37.04)	13 (43.33)	0.6285	0.7692 (0.2654 – 2.229)
Cefalosporinas (3 ^a e 4 ^a geração)	25 (92.59)	26 (86.67)	0.6727	1.923 (0.3229 – 11.45)
Aminoglicosídeos	0 (0.0)	1 (3.33)	1.0000	0.3576 (0.01396 – 9.160)
Fluoroquinolonas	8 (29.63)	7 (23.33)	0.5899	1.383 (0.4239 – 4.515)
Glicopeptídeos	19 (70.37)	19 (63.33)	0.7789	1.375 (0.4527 – 4.177)
Colistina	0 (0.0)	4 (13.33)	0.1138	0.1071 (0.005489 – 2.089)
PAV				
Tardia	20 (74.07)	24 (80.00)	0.5944	0.7143 (0.2063 – 2.473)
Precoce	7 (25.93)	6 (20.00)		
Período de internação na UTI antes da PAV (> 7 dias)	11 (40.75)	20 (66.67)	0.0497	0.3438 (0.1168 – 1.012)
Período de internação na UTI depois da PAV (> 20 dias)	11 (40.75)	11 (36.67)	0.7524	1.188 (0.4080 - 3.456)
Período de internação na UTI em dias (> 30)	9 (33.33)	13 (43.33)	0.4387	0.6538 (0.2225 - 1.922)
Período de internação no HC em dias (> 60)	8 (29.63)	11 (36.67)	0.5736	0.7273 (0.2394 - 2.209)
Mortalidade	8 (29.63)	11 (36.67)	0.5736	0.7273 (0.2394 - 2.209)

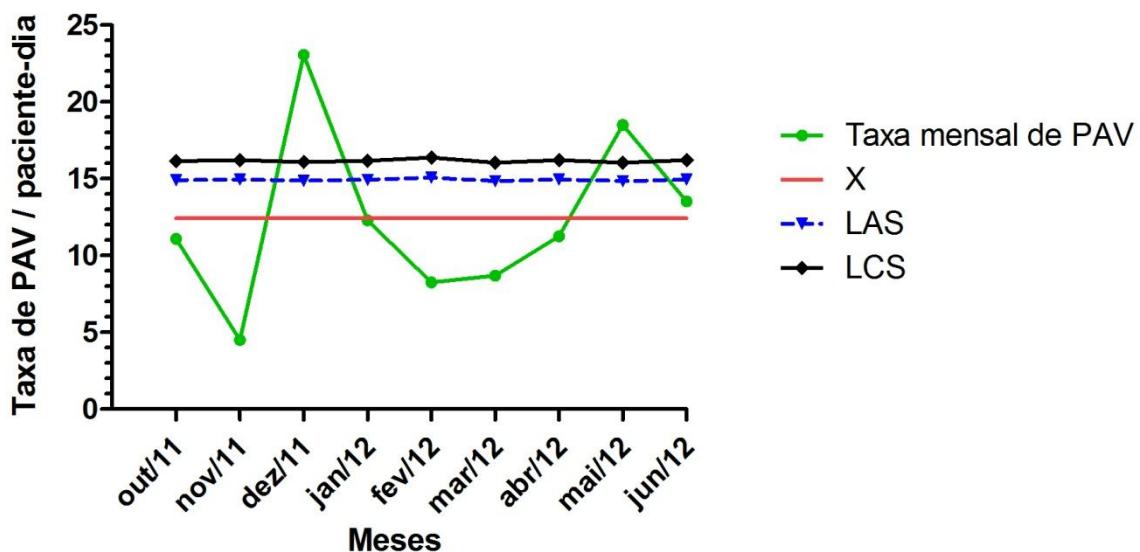
^aDP = desvio padrão; ^b “Average Severity of Illness Score”; ^c “Clinical Pulmonary Infection Score”; ^d Variáveis expressas como mediana (variação); ^e Multirresistente.

Tabela 4. Regressão logística múltipla dos fatores de risco para PAV por *A. baumannii* em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFG.

Variáveis	OR	95% IC	p-valor
Diagnóstico de admissão - trauma	7.2122	1.62 a 32.10	0.0095
ASIS ^a (> 4)	3.7154	0.85 a 16.20	0.0806
Microrganismo MR ^b	0.6736	0.11 a 4.02	0.6645
Terapia antimicrobiana inapropriada	17.2911	2.61 a 114.50	0.0031

^a“Average Severity of Illness Score”; ^bMultiresistência

Os indicadores epidemiológicos observados para todas as PAVs, independente da etiologia, no período de estudo, foram: taxa de incidência de PAV de 23,36 / 1000 ventiladores-dia e densidade de uso de prótese ventilatória de 0,52, ou seja, 52% dos pacientes-dia fizeram uso de ventilação mecânica. Foi confeccionado o diagrama de controle do nível endêmico das taxas de PAV/paciente-dia, no período de outubro de 2011 a junho de 2012, na UTI de adultos do HC-UFG, já com 30 leitos (Figura 1).



LCS: limite de controle superior ($3\sigma + X$); LAS: limite de alerta superior ($2\sigma + X$); X: linha central (taxa média de PAV=12,43)

Figura 1. Diagrama de controle do nível endêmico das taxas de PAV/paciente-dia na UTI de adultos do HC-UFG, no período de outubro de 2011 a junho de 2012.

Entre as 29 amostras clínicas de *A. baumannii* recuperadas de PAV, 17 (58,62%) foram resistentes ao imipenem e a maioria (12; 70,59%) positivas para a produção de carbapenemase através do THM. A caracterização dos genes de resistência foi realizada através do multiplex PCR e todas 12 amostras apresentaram o gene que codifica a OXA-23 (Figura 2). Três amostras clínicas com susceptibilidade aos carbapenêmicos apresentaram apenas o gene *bla*_{OXA-51} enquanto duas resistentes aos carbapenêmicos mas negativas no THM, foram positivas para a presença de *bla*_{OXA-23} (amostras 13 e 14 na figura 2).

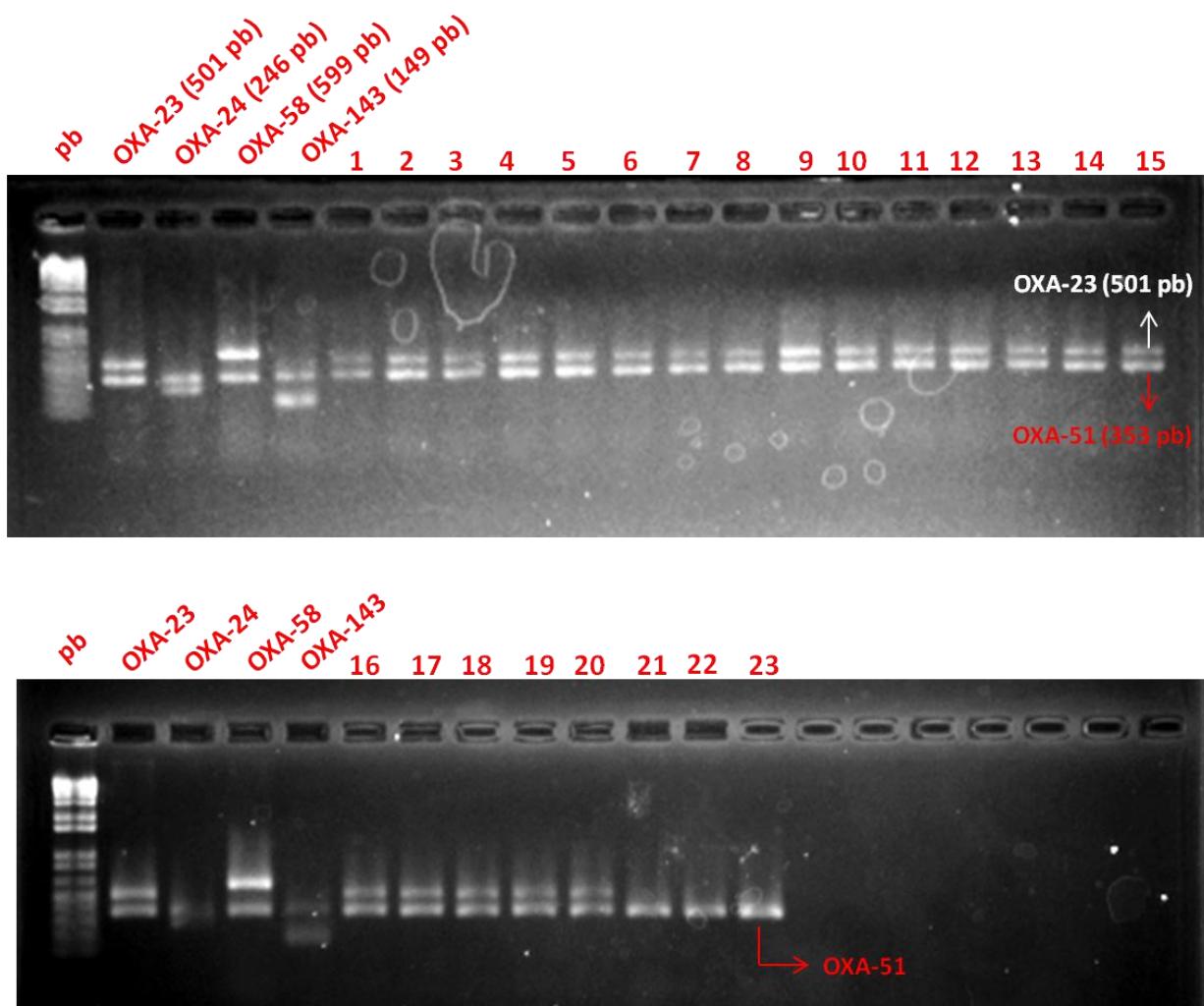


Figura 2. Análise por multiplex PCR das culturas de *A. baumannii* de aspirado traqueal e superfície. Linha: Tamanho molecular em pares de bases (pb) (1Kb DNA Extension Ladder InvitrogenTM), controles OXA-23, -24, -58, e -143 da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar do IOC/Fiocruz, números de 1-14 (amostras de aspirado traqueal), 15-20 (amostras de superfície) e 21-23 (amostras de aspirado traqueal suscetíveis aos carbapenêmicos).

No total, trinta e uma (29,5%) das 126 amostras obtidas de 21 quartos ocupados por pacientes com PAV por *A. baumannii* foram identificadas como *A. baumannii* e recuperadas principalmente da grade da cama, independente do momento da coleta (antes ou após a limpeza). As taxas de contaminação da mesa de cabeceira, grade da cama e maçaneta da porta, antes e após a limpeza, estão mostradas na tabela 5. A prevalência de *A. baumannii* MR foi de 74,2% (23/31), com 8 (25,8%) amostras resistentes ao imipenem e 6 (75,0%) positivas no THM. Todos as 6 amostras recuperadas de superfície foram positivas para os genótipos *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23} (Figura 2), sendo uma recuperada da mesa de cabeceira antes da limpeza, três e duas da grade da cama antes e depois da limpeza, respectivamente.

Tabela 5. Prevalência de contaminação na mesa de cabeceira, grade da cama e maçaneta da porta dos quartos dos pacientes com PAV por *A. baumannii*, antes e depois da limpeza, na UTI de adultos do HC-UFU.

Local	Momento (limpeza)	MR*
	N=31 (%)	N=23(%)
Mesa de cabeceira	Antes - 7 (22,6)	5 (21,7)
	Depois - 3 (9,7)	2 (8,7)
Grade da cama	Antes - 8 (25,8)	5 (21,7)
	Depois - 9 (29,0)	7 (30,4)
Maçaneta da porta	Antes - 3 (9,7)	3 (13,0)
	Depois - 1 (3,2)	1 (4,3)

* Multirresistente

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados “*in vitro*” das amostras de *A. baumannii* recuperadas de espécimes clínicos (aspirado traqueal) e de superfície está descrito nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Perfil de susceptibilidade das amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii* obtidas dos 30 pacientes com PAV internados na UTI de Adultos do HC-UFG no período de abril/2011 a junho/2012.

Antimicrobiano	Susceptível N (%)	Intermediário N (%)	Resistente N (%)
Amicacina	19 (63,3)	5 (16,7)	6 (20,0)
Ampicilina/Subactam	11 (36,7)	4 (13,3)	15 (50,0)
Cefepime	4 (13,3)	0 (0)	26 (86,7)
Ciprofloxacina	4 (13,3)	0 (0)	26 (86,7)
Colistina	30 (100)	0 (0)	0 (0)
Gentamicina	19 (63,3)	1 (3,3)	10 (33,3)
Imipenem	13 (43,4)	0 (0)	17 (56,7)
Tigeciclina	23 (76,7)	1 (3,3)	6 (20,0)

Tabela 7. Perfil de susceptibilidade das 31 amostras de *Acinetobacter baumannii* recuperadas do ambiente dos quartos dos pacientes com PAV por esse microrganismo internados na UTI de Adultos do HC-UFG, no período de abril/2011 a junho/2012.

Antimicrobiano	Susceptível N (%)	Intermediário N (%)	Resistente N (%)
Amicacina	14 (45,2)	4 (12,9)	13 (41,9)
Ampicilina/Subactam	22 (70,9)	7 (22,6)	2 (6,5)
Cefepime	4 (12,9)	1 (3,2)	26 (83,9)
Ciprofloxacina	6 (19,4)	0 (0)	25 (80,6)
Polimixina B	31 (100)	0 (0)	0 (0)
Gentamicina	23 (74,2)	2 (6,5)	6 (19,3)
Imipenem	23 (74,2)	0 (0)	8 (25,8)
Tigeciclina	28 (90,3)	2 (6,5)	1 (3,2)

O número de casos de PAV por *A. baumannii* durante o período do estudo, bem como a resistência das amostras em relação aos carbapenêmicos, estão representados na figura 3, verificando-se uma média (30 / 15 meses) de dois casos por mês.

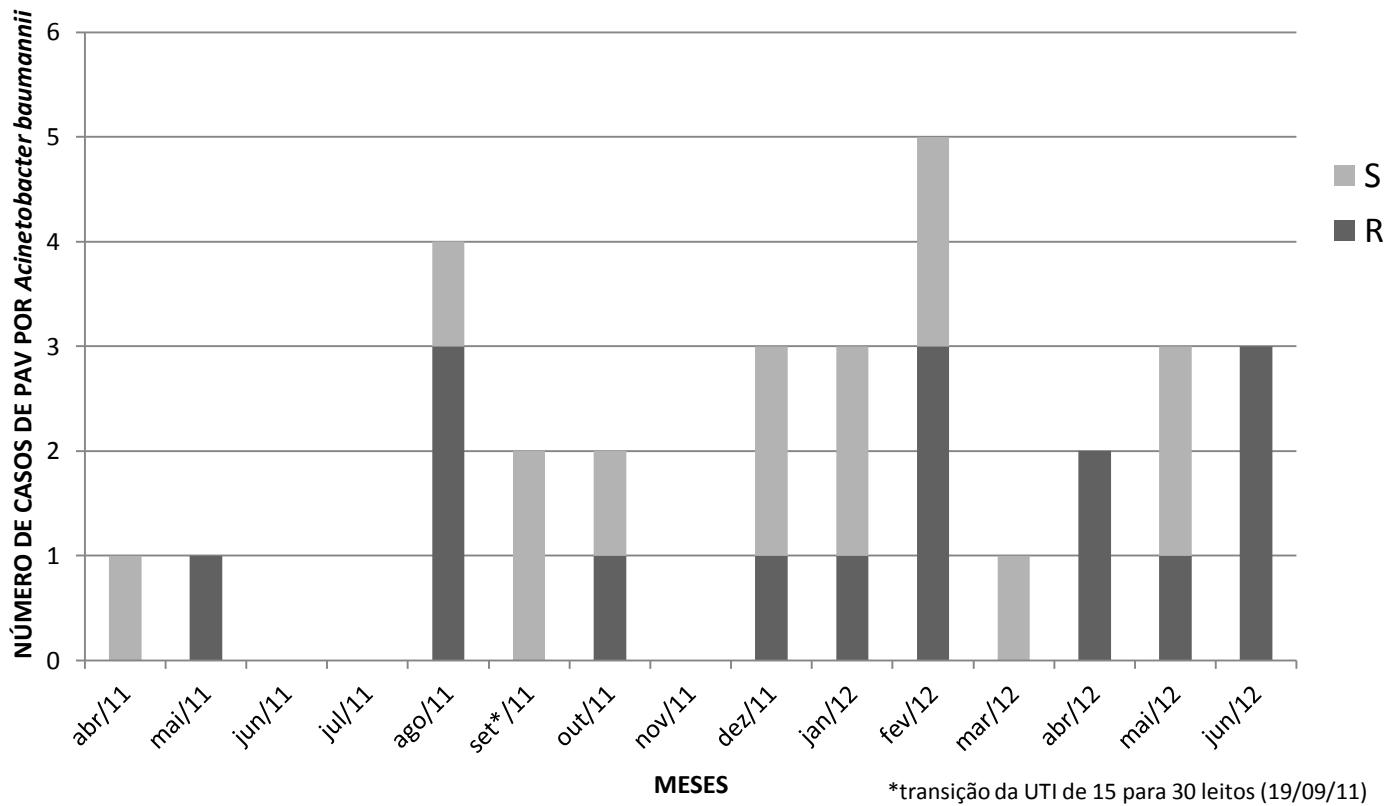


Figura 3. Distribuição temporal de casos de PAV por *A. baumannii* e perfil de resistência das amostras aos carbapenêmicos, na UTI de adultos do HC-UFG, no período de abril de 2011 a junho de 2012.

A técnica de macrorestrição de DNA – PFGE, foi realizada para 23 amostras de *A. baumannii*, na sua maioria resistentes ao imipenem (20/23; 86,9%) e recuperadas de episódios de PAV (17/23; 73,9%). No total, oito genótipos foram identificados (A – H), quatro deles (A, C, G e H) apresentaram amostras com pelo menos 80% de similaridade, e o genótipo A (n=9; 52,9% das amostras clínicas) e H (n=4; 66,6% das amostras de superfície) foram os mais frequentes (Figura 4). Em geral, observou-se diferentes genótipos entre as amostras de *A. baumannii* resistentes ao imipenem de ambiente (H) e aspirado traqueal (A). As amostras susceptíveis ao imipenem testadas pertenceram a dois genótipos distintos (1, F – 2, G). Adicionalmente, foi possível a detecção de um “cluster”, em agosto de 2011, representado por pacientes com PAV pelo clone A (Figura 4).

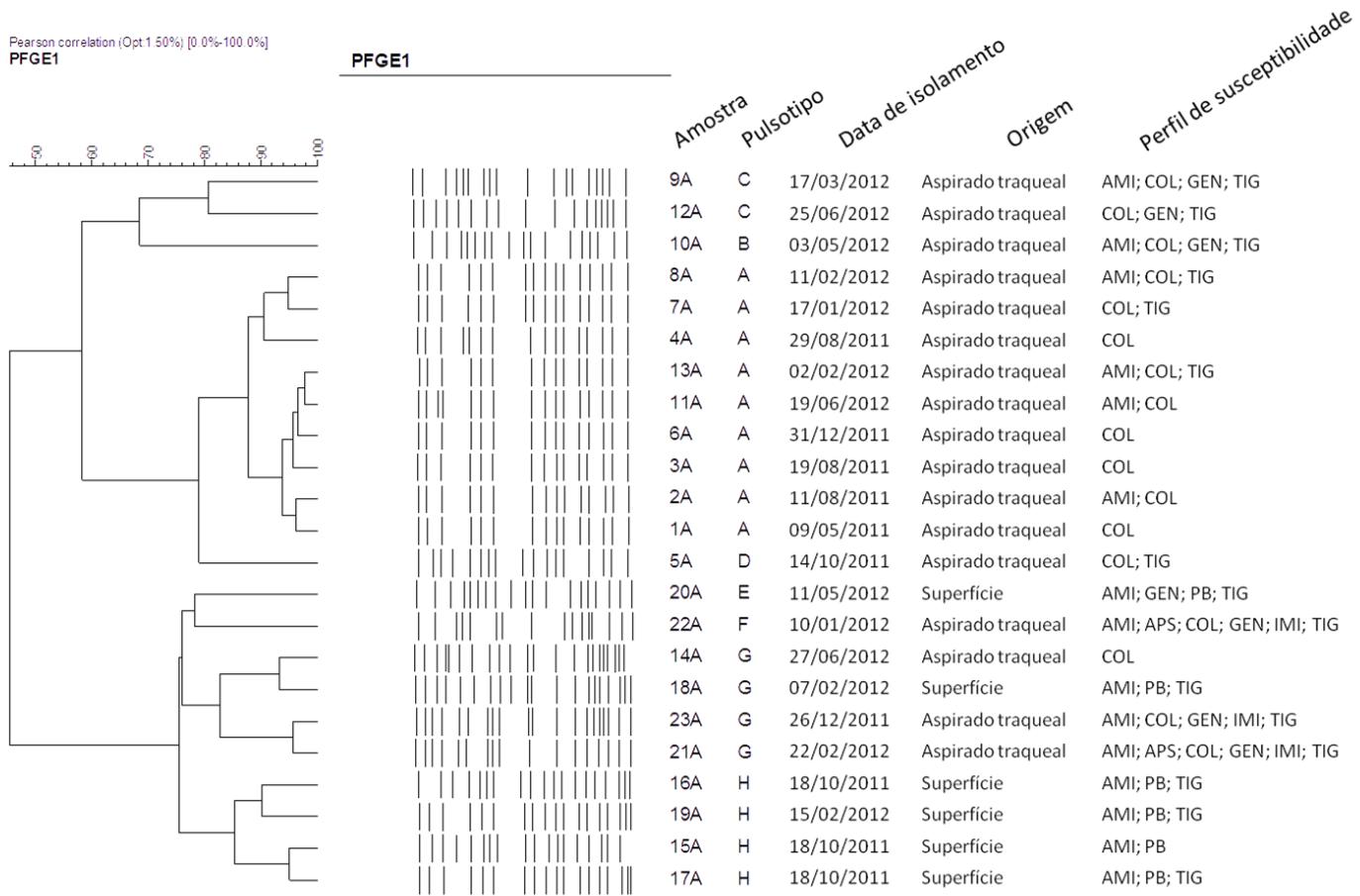


Figura 4. Dendograma resultante de análise dos perfis do *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE), amostra, pulsotipo, data de isolamento, origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* de aspirado traqueal e de superfície, na Unidade de Terapia Intensiva de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Escala representa as porcentagens de similaridade. AMI, amicacina; APS, ampicilina-sulbactam; COL, colistina; GEN, gentamicina; IMI, imipenem; PB, polimixina B; TIG, tigeciclina.

5. DISCUSSÃO

Pneumonia associada à ventilação mecânica causada por *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, particularmente quando relacionada a microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, está associada com significativas taxas de mortalidade e morbidade, adicionando consideráveis custos hospitalares (BASSI et al., 2010; PARK, 2005). Em países em desenvolvimento, as taxas de PAV variam de 10 a 41,7 por 1000 ventiladores-dia e são geralmente mais elevadas do que nos EUA, Canadá e alguns países europeus (ARABI et al., 2008). Em nosso estudo, o diagnóstico de PAV foi definido baseado em critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos e foi observada uma elevada taxa de incidência de PAV, de

23,36 por 1000 ventiladores-dia, similar à encontrada em países em desenvolvimento como o Brasil. A densidade de utilização de prótese ventilatória também foi alta (0,52) e, através da construção da curva endêmica de PAV/paciente-dia, observamos dois picos acima do limite de controle superior (LCS), nos meses de dezembro de 2011 e maio de 2012, indicativo de surtos de PAV no período (ARANTES et al., 2003).

Atualmente, os bacilos gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são os microrganismos responsáveis pela maioria dos casos de PAV em países em desenvolvimento, América do Norte e Europa (ARABI et al., 2008; CHASTRE; FAGON, 2002). Na América Latina, de acordo com dados do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY 2008 – 2010, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são os agentes mais comuns de pneumonia (17,7% e 31,2%, respectivamente) (GALES et al., 2012). Na UTI de adultos do HC-UFG, os BGN-NF são os principais agentes etiológicos de PAVs (72,8%), com *P. aeruginosa* representando 39,5% e *A. baumannii* 29,2% dos casos (MOREIRA; FILHO, 2012).

Os fatores de risco para PAV devido *A. baumannii* usualmente não apresentam diferenças quando comparados com aqueles causados por *P. aeruginosa* e incluem principalmente traumatismo craniano, hospitalização prolongada e uso prévio de antibióticos (GARNACHO-MONTERO et al., 2005), enquanto PAV por *P. aeruginosa* é diagnosticada em pacientes imunocomprometidos, especialmente naqueles com neutropenia (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006). Em nosso estudo, a análise univariada identificou algumas variáveis como fatores de risco significativos para aquisição de PAV por *A. baumannii*, mas apenas trauma como diagnóstico de admissão e terapia antimicrobiana inapropriada foram fatores de risco independentes para o desenvolvimento de PAV por essa bactéria.

Trauma grave é uma das principais causas de internação em UTIs, afetando especialmente indivíduos jovens, e a infecção mais comum nesse grupo é a PAV (MAGRET et al., 2010). Pacientes politraumatizados e com lesões muito graves que desenvolvem PAV apresentam maior tempo de uso de VM, períodos prolongados de internação em UTI e no hospital, e fazem uso mais frequente de traqueostomia (ZYGUN et al., 2006). No nosso estudo, trauma como diagnóstico de admissão permaneceu como uma variável independente associada ao desenvolvimento de PAV por *A. baumannii* na unidade, que é clínico-cirúrgica e recebe muitos pacientes politraumatizados, principalmente devido a acidentes de trânsito.

Atualmente, um dos aspectos de maior importância e complexidade no tratamento de PAV é a necessidade de se iniciar precocemente o tratamento empírico com antibióticos adequados e apropriados. Kuti, Patel e Coleman (2008) realizaram uma meta-análise sobre a

questão, usando dados não-ajustados e ajustados, e verificaram que a terapia inapropriada aumenta significativamente a chance de mortalidade (OR 2.34, P=0.0001; OR 3.03, P=0.0292, respectivamente). O uso prévio de antibióticos é o fator de risco mais comum para aquisição de *A. baumannii* MR (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006), cuja frequência correspondeu a aproximadamente metade dos casos de PAV em nosso estudo (51,85%), e os carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira geração e/ou fluoroquinolonas são antibióticos comumente implicados como fatores de risco para esta aquisição (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Em nossa série, o uso empírico desses antibióticos correspondeu a, respectivamente, 37,04%, 92,59% e 29,63%, foi muitas vezes inapropriado e se tornou um fator independente associado à PAV por *A. baumannii*.

A mortalidade atribuída à infecção por *P. aeruginosa* é de cerca de 16% (FURTADO et al., 2009) enquanto a por *A. baumannii* permanece controvertida (PEREZ et al., 2007), isto porque muitos dos estudos utilizaram amostragens pequenas, com diferenças metodológicas e apresentaram dificuldades em parear adequadamente os controles quanto a gravidade da doença (MARAGAKIS; PERL, 2008). Os nossos dados mostraram uma maior mortalidade ($p > 0,05$) nos pacientes com PAV por *P. aeruginosa* (36,67%) do que nos pacientes por *A. baumannii* (29,63%) refletindo a maior virulência da *P. aeruginosa* (KERR; SNELLING, 2009) resultante de uma grande variedade de fatores celulares e extracelulares. Alguns autores sustentam que a infecção por *A. baumannii* é um marcador para o aumento da mortalidade em pacientes com doença grave, embora não seja um preditor independente de mortalidade (ALBRECHT et al., 2006).

Opções terapêuticas são limitadas no tratamento de PAV por *A. baumannii* e a resistência antimicrobiana deste microrganismo está associada a vários mecanismos, sendo o principal a produção de β -lactamases, conferida por enzimas da classe molecular D de Ambler (oxacilinases) (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). Atualmente, os carbapenêmicos são considerados os antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções graves causadas por esse microrganismo (PEREZ et al., 2007). No Brasil e em outros países, (GALES et al., 2012; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011) entre amostras resistentes aos carbapenêmicos, predominam as produtoras de OXA-23, como evidenciado em todas as amostras resistentes ao imipenem recuperadas em nosso estudo.

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras clínicas (aspirado traqueal) e ambientais de *A. baumannii*, as taxas de resistência foram relativamente semelhantes, embora as amostras de origem clínica mostrem menor susceptibilidade ao imipenem e à ampicilina/sulbactam. No que se refere à multirresistência, amostras de aspirado

traqueal representaram 51,85%, enquanto as de superfície 74,2%, indicando a importância do ambiente como reservatório para microrganismos MR, enfatizando a necessidade da implementação das boas práticas de prevenção e controle de infecções hospitalares quanto a limpeza e desinfecção de unidades críticas (WEBER et al., 2010).

Apesar de a fonte mais importante de *A. baumannii* ser o paciente já infectado e/ou colonizado, a disseminação ambiental da bactéria é frequentemente demonstrada (MARAGAKIS; PERL, 2008), como visto em nosso estudo, com uma contaminação mais expressiva na grade da cama independente do momento de coleta, questionando a rotina do serviço de limpeza na UTI. Como o microrganismo pode sobreviver em ambiente seco e persistir por prolongado período de tempo (TOWNER, 2009), as superfícies podem ser um potencial reservatório de amostras epidêmicas envolvidas em surtos em UTIs, exigindo o seu fechamento para limpeza e desinfecção terminal (DANCER, 2009).

Em nosso estudo, durante um período endêmico de infecções por *A. baumannii*, identificamos um “cluster” pelo clone A, em agosto de 2011, quando infelizmente a análise de amostras de ambiente não foi realizada. Há a coexistência de um ou mais clones de *A. baumannii* em UTIs, como observado em nossa investigação, mas diferente de outros autores (dos SANTOS SAALFELD et al. 2009; THOM et al. 2011) demonstramos a prevalência e coexistência de dois clones diferentes tipados por PFGE, o A entre as amostras clínicas e o H nas ambientais, dificultando o controle de sua transmissão (MARCHAIM et al., 2007).

Existem várias limitações no presente estudo que merecem ser mencionadas: Primeiro, a amostra foi relativamente pequena, resultante de um estudo realizado em um único hospital e que pode ter perdido alguns preditores importantes. Segundo, a incidência de patógenos MR está estritamente ligada a fatores locais e varia de uma instituição para outra. Terceiro, não foram analisadas pela técnica de PFGE todas as amostras ambientais e isto pode justificar as diferenças entre as prevalências dos clones detectados no estudo. Em síntese, realizamos uma avaliação dos potenciais fatores de risco e evolução dos pacientes com PAV por *A. baumannii* vs. *P. aeruginosa*, caracterizamos os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e a disseminação clonal de amostras clínicas e ambientais de *A. baumannii*, informações que são escassas no Brasil.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados documentam o diagnóstico de admissão trauma e a terapia antimicrobiana inapropriada como fatores de risco independentes associados aos casos de PAV por *A. baumannii*;
- A taxa de mortalidade hospitalar em 30 dias foi mais elevada no grupo com PAV por *P. aeruginosa* (36,67%) do que por *A. baumannii* (29,63%) ($p > 0,05$);
- Observou-se uma contaminação ambiental mais expressiva na grade da cama independente do momento da coleta;
- O perfil de resistência das amostras clínicas (aspirado traqueal) e ambientais de *A. baumannii* foi relativamente semelhante, embora as de origem clínica mostrem menor susceptibilidade ao imipenem e à ampicilina/sulbactam;
- Todas as amostras clínicas e de superfície resistentes ao imipenem analisadas por multiplex PCR apresentaram o gene que codifica a OXA-23;
- Identificamos a coexistência de vários pulsotipos distintos na unidade, com a prevalência do clone A, entre as amostras de origem clínica, e o H, entre as recuperadas de superfície.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBO, A.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; SIEGMAN-IGRA, Y.; SCHWABER, M.J. Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, n.11, p.793-800, 2007.
- ALBRECHT, M.C.; GRIFFITH, M.E.; MURRAY, C.K.; CHUNG, K.K.; HORVATH, E.E.; WARD, J.A.; HOSPENTHAL, D.R.; HOLCOMB, J.B.; WOLF, S.E. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v.203, n.4, p.546-50, 2006.
- AL-HAMAD, A.; MAXWELL, S. How clean is clean? Proposed methods for hospital cleaning assessment. **Journal of Hospital Infection**, v.70, n.4, p.328-334, 2008.
- ANTONIO, C.S.; NEVES, P.R.; MEDEIROS, M.; MAMIZUKA, E.M.; ELMOR DE ARAÚJO, M.R.; LINCOPAN, N. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the *bla_{OXA-143}* Gene in Brazilian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.3, p.1322-1323, 2011.
- ARABI, Y.; AL-SHIRAWI, N.; MEMISH, Z.; ANZUETO, A. Ventilator-associated pneumonia in adults in developing countries: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.5, p.505-12, 2008.
- ARANTES, A.; CARVALHO, E. DA S.; MEDEIROS, E.A.; FARHAT, 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.768-74, 2003.
- BASSI, G.L.; FERRER, M.; SAUCEDO, L.M.; TORRES, A. Do guidelines change outcomes in ventilator-associated pneumonia? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, n.2, p.171-7, 2010.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p. 148-165, 1996.

BONOMO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, suppl.2, p.S49-56, 2006.

BOUADMA, L.; MOURVILLIER, B.; DEILER, V.; LE CORRE, B.; LOLOM, I.; RÉGNIER, B.; WOLFF, M.; LUCET, J.C. A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures. **Critical Care Medicine**, v.38, n.3, 2010.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 57, n.1, p.1-3, 2006.

CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, M.J.; ASENSI, M.D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, n.1, p.25-8, 2009.

CHAN, J.D.; GRAVES, J.A.; DELLIT, T.H. Antimicrobial Treatment and Clinical Outcomes of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.25, n.6, 2010.

CHANG, H.C.; CHEN, Y.C.; LIN, M.C.; LIU, S.F.; CHUNG, Y.H.; SU, M.C.; FANG, W.F.; TSENG, C.C.; LIE, C.H.; HUANG, K.T.; WANG, C.C. Mortality risk factors in patients with *Acinetobacter baumannii* ventilator - associated pneumonia. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.110, n.9, p.564-71, 2011.

CHASTRE, J.; FAGON, J.Y. Ventilator-associated pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine**, v.165, n.7, p.867-903, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;** Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20, v. 29, n.3, 2010.

COELHO, J.; WOODFORD, N.; AFZAL-SHAH, M.; LIVERMORE, D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.2, p.756-8, 2006.

CRNICH, C.J.; SAFDAR, N.; MAKI, D.G. The role of the intensive care unit environment in the pathogenesis and prevention of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v.50, n.6, p. 813-38, 2005.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.; CASTRO, M.E.; STIER, C.J.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3403-6, 2003.

DANCER, S.J. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.4, p.378-85, 2009.

DAVIS, K.A. Ventilator-associated pneumonia: a review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 21, n.4, p.211-26, 2006.

DENTON, M.; WILCOX, M.H.; PARSELL, P.; GREEN, D.; KEER, V.; HAWKEY, P.M.; EVANS, I.; MURPHY, P. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 21, n.2, p. 94-8, 2005.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.12, p.939-51, 2007.

dos SANTOS SAALFELD, S.M.; FUKITA VIANA, G.; DIAS SIQUEIRA, V.L.; CARDOSO, C.L.; BOTELHO GARCIA, L.; BRONHARO TOGNIM, M.C. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. **The Journal of Hospital Infection**, v.72, n.4, p.365-8, 2009.

EDWARDS, J.R.; PETERSON, K.D.; ANDRUS, M.L.; TOLSON, J.S.; GOULDING, J.S.; DUDECK, M.A.; MINCEY, R.B.; POLLOCK, D.A.; HORAN, T.C.; NHSN FACILITIES. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006, issued June 2007. **American Journal of Infection Control**, v.35, n.5, p.290-301, 2007.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A.; SIEMPOS, I.I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **Critical Care**, v.10, n.2, R48, 2006.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, n.9, p.1333-41, 2005.

FALAGAS, M.E.; KOLETSI, P.K.; BLIZIOTIS, I.A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1619-1629, 2006.

FALAGAS, M.E.; KOPTERIDES, P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **Journal of Hospital Infection**, v.64, n.1, p.7-15, 2006.

FALAGAS, M.E.; KOPTERIDES, P.; SIEMPOS, I.I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, n.3, p.389, author reply 389-90, 2006.

FIGUEIREDO, D.Q.; SANTOS, K.R.; PEREIRA, E.M.; SCHUENCK, R.P.; MENDONÇA-SOUZA, C.R.; TEIXEIRA, L.M.; MONDINO, S.S. First report of the *blaOXA-58* gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.3, p.368-370, 2011.

FOURNIER, P.E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.5, p.692–9, 2006.

FURTADO, G.H.; BERGAMASCO, M.D.; MENEZES, F.G.; MARQUES, D.; SILVA, A.; PERDIZ, L.B.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. **Journal of Critical Care**, v.24, n.4, 625.e9–625.e14, 2009.

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 Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n.4, p.354-60, 2012.

GARNACHO-MONTERO, J.; AMAYA-VILLAR, R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, n.4, p.332-9, 2010.

GARNACHO-MONTERO, J.; ORTIZ-LEYBA, C.; FERNÁNDEZ-HINOJOSA, E.; ALDABÓ-PALLÁS, T.; CAYUELA, A.; MARQUEZ-VÁCARO, J.A.; GARCIA-CURIEL, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F.J. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. **Intensive Care Medicine**, v.31, n.5, p.649–655, 2005.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol.32, n.2, p.106-19, 2008.

HAMOUDA, A.; EVANS, B.A.; TOWNER, K.J.; AMYES, S.G. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla_{OXA-51}*-like genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.7, p.2476-83, 2010.

HANLON, G.W. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, n.5, p.375-8, 2005.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; FOURNIER, P.E.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D.; NORDMANN, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.49, n.10, p.4174-9, 2005.

HIDRON, A.I.; EDWARDS, J.R.; PATEL, J.; HORAN, T.C.; SIEVERT, D.M.; POLLOCK, D.A.; FRIDKIN, S.K.; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.11, p.996-1011, 2008.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n.3, p.305, 2010.

HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.53, n.12, p.5035-8, 2009.

HUGONNET, S.; UÇKAY, I.; PITTEL, D. Staffing level: a determinant of late-onset ventilator-associated pneumonia. **Critical care**, v.11, n.4, R80, 2007.

HUNTER, J.D. Ventilator associated pneumonia. **Postgraduate Medical Journal**, v.82, n.965, p.172-8, 2006.

JIN, H.; XU, X.M.; MI, Z.H.; MOU, Y.; LIU, P. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. **Chinese Medical Journal**, v.122, n.3, p.301-6, 2009.

JOSEPH, N.M.; SISTLA, S.; DUTTA, T.K.; BADHE, A.S.; PARIJA, S.C. Ventilator-associated pneumonia: role of colonizers and value of routine endotracheal aspirate cultures. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.8, e723-9, 2010 b.

JOSEPH, N.M.; SISTLA, S.; DUTTA, T.K.; BADHE, A.S.; RASITHA, D.; PARIJA, S.C. Role of intensive care unit environment and health-care workers in transmission of ventilator-associated pneumonia. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.4, n.5, p.282-91, 2010 a.

KARAGEORGOPoulos, D.E.; FALAGAS, M.E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.751-62, 2008.

KARAGEORGOPoulos, D.E.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; FALAGAS, M.E. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n.1, p.45-55, 2008.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.4, p. 338-344, 2009.

KIENINGER, A.N.; LIPSETT, P.A. Hospital-acquired pneumonia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Surgical Clinics of North America**, v.89, n.2, p.439-61, 2009.

KOLLEF, M.H. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, Suppl 4, p.S131–8, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. **Diagnóstico Microbiológico**, 5th ed., Medsi, Rio de Janeiro, 263-279, 2001.

KUTI, E.L.; PATEL, A.A.; COLEMAN, C.I. Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis. **Journal of Critical Care**, v.23, n.1, p.91–100, 2008.

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

LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENÇO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, 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.1008-11, 1999.

LEVIN, A.S.; MENDES, C.M.; SINTO, S.I.; SADER, H.S.; SCARPITTA, C.R.; RODRIGUES, E.; SAUAIA, N.; BOULOS, M. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. **Infection Control and hospital epidemiology**, v.17, n.6, p.366-8, 1996.

MAGNOTTI, L.J.; CROCE, M.A.; ZARZAUR, B.L.; SWANSON, J.M.; WOOD, G.C.; WEINBERG, J.A.; FABIAN, T.C. Causative pathogen dictates optimal duration of antimicrobial therapy for ventilator-associated pneumonia in trauma patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v.212, n.4, p.476-86, 2011.

MAGRET, M.; AMAYA-VILLAR, R.; GARNACHO, J.; LISBOA, T.; DÍAZ, E.; DEWAELE, J.; DEJA, M.; MANNO, E.; RELLO, J.; EU-VAP/CAP Study Group. Ventilator-associated pneumonia in trauma patients is associated with lower mortality: results from EU-VAP study. **The Journal of Trauma**, v.69, n.4, p.849-54, 2010.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, n.8, p. 1254-63, 2008.

MARCHAIM, D.; NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M.J.; CARMELI, Y. Molecular and epidemiologic study of polyclonal outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an Israeli hospital. **Infection control and hospital epidemiology**, v.28, n.8, p.945-50, 2007.

MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.; SUKIENNIK, T.; BOFF, R.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; MACHADO, A.B.; BARTH, A.L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v.37, n.5, p.474-6, 2009.

MOREIRA, M.R.; CARDOSO, R.L.; ALMEIDA, A.B.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk Factors and Evolution of Ventilator-Associated Pneumonia by *Staphylococcus aureus* Sensitive or Resistant to Oxacillin in Patients at the Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.6, p.499-503, 2008.

MOREIRA, M.R.; FILHO, P.P.G. Multidrug-resistant pathogens causing ventilator-associated pneumonia: Risk factors, empirical antimicrobial therapy and outcome of patients in an intensive care unit (ICU) of a Brazilian university hospital. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v.4, n.9, p.204-210, 2012.

MOSTACHIO, A.K.; VAN DER HEIJDEN, I.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n.11, p.1522-1524, 2009.

MUNOZ-PRICE, L.S.; WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **The New England Journal of Medicine**, v.358, n.12, p.1271-81, 2008.

NEMEC, A.; KRÍZOVÁ, L.; MAIXNEROVÁ, M.; DIANCOURT, L.; VAN DER REIJDEN, T.J.; BRISSE, S., VAN DEN BROEK, P., DIJKSHOORN, L. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n.3, p.484-9, 2008.

OBASI, C.; AGWU, A.; AKINPELU, W.; HAMMONS, R.; CLARK, C.; ETIENNE-CUMMINGS, R.; HILL, P.; ROTHMAN, R.; BABALOLA, S.; ROSS, T.; CARROLL, K.; ASIYANBOLA, B. Contamination of equipment in emergency settings: an exploratory study with a targeted automated intervention. **Annals of Surgical Innovation and Research**, v.3, p.1-9, 2009.

PARK, D.R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory care**, v.50, n.6, p. 742-65, 2005.

PATERSON, D.L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, v.43 (Suppl. 2), p.S43–8, 2006.

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.1804-13, 2010.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, vol.21, n.3, p.538-82, 2008.

PEÑA, C.; GUDIOL, C.; CALATAYUD, L.; TUBAU, F.; DOMÍNGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; ARIZA, J.; GUDIOL, F. Infections due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum β-lactamase among hospitalized patients: factors influencing mortality. **Journal of Hospital Infection**, v.68, n.2, p.116-22, 2008.

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.3471-84, 2007.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, p.826-36, 2006.

POURNARAS, S.; MARKOGIANNAKIS, A.; IKONOMIDIS, A.; KONDYLI, L.; BETHIMOUTI, K.; MANIATIS, A.N.; LEGAKIS, N.J.; TSAKRIS, A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v.57, n.3, p. 557-61, 2006.

RELLO, J.; OLLENDORF, D.A.; OSTER, G.; VERA-LLONCH, M.; BELLM, L.; REDMAN, R.; KOLLEF, M.H.; VAP Outcomes Scientific Advisory Group. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. **Chest**, v.122, n.6, p.2115-21, 2002.

ROCHA, L. DE A.; VILELA, C.A.; CEZÁRIO, R.C.; ALMEIDA, A.B.; GONTIJO- FILHO, P.P. Ventilator-associated pneumonia in an adult clinical-surgical intensive care unit of a Brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.1, p.80-5, 2008.

ROMÃO, C.M.; FARIA, Y.N.; PEREIRA, L.R.; ASENSI, M.D. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.5, p. 541-8, 2005.

ROSENTHAL, V.D.; MAKI, D.G.; JAMULITRAT. S.; MEDEIROS, E.A.; TODI, S.K.; GOMEZ, D.Y.; LEBLEBICIOGLU, H.; ABU KHADER, I.; MIRANDA NOVALES, M.G.; BERBA, R.; RAMÍREZ WONG, F.M.; BARKAT, A.; PINO, O.R.; DUEÑAS, L.; MITREV, Z.; BIJIE, H.; GURSKIS, V.; KANJ, S.S.; MAPP, T.; HIDALGO, R.F.; BEN JABALLAH, N.; RAKA, L.; GIKAS, A.; AHMED, A.; THU LE, T.A.; GUZMÁN SIRITT, M.E.; INICC MEMBERS. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, v.38, n.2, p.95-104, 2010.

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.582-91, 2006.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.9, p.1138-43, 2011.

SANDIUMENGE, A.; RELLO, J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.18, n.3, p.187-93, 2012.

SINGH, A.; GOERING, R.V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.L.; ZERVOS, M.J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p. 512-30, 2006.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKESEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.9, p.2233-9, 1995.

THOM, K.A.; JOHNSON, J.K.; LEE, M.S.; HARRIS, A.D. Environmental contamination because of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* surrounding colonized or infected patients. **American Journal of Infection Control**, v.39, n.9, p.711-5, 2011.

THOMSON, J.M.; BONOMO, R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! **Current Opinion in Microbiology**, vol.8, n.5, p.518-24, 2005.

TOWNER, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.4, p. 355-63, 2009.

VALENCIA, R.; ARROYO, L.A.; CONDE, M.; ALDANA, J.M.; TORRES, M.J.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; GARNACHO-MONTERO, J.; CISNEROS, J.M.; ORTÍZ, C.; PACHÓN, J.; AZNAR, J. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.30, n.3, p.257-63, 2009.

van den BROEK, P.J.; ARENDSD, J.; BERNARDS, A.T.; De BRAUWER, E.; MASCINI, E.M.; van der REIJDEN, T.J.; SPANJAARD, L.; THEWESSEN, E.A.; van der ZEE, A.; van ZEIJL, J.H.; DIJKSHOORN, L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, p. 837-43, 2006.

van DESSEL, H.; DIJKSHOORN, L.; van der REIJDEN, T.; BAKKER, N.; PAAUW, A.; van den BROEK, P.; VERHOEF, J.; BRISSE, S. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 105-12, 2004.

VILA, J.; PACHÓN, J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.9, n.4, p.587-99, 2008.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n.3, p.373-83, 2006.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.; MILLER, M.B.; HUSLAGE, K.; SICKBERT-BENNETT, E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. **American Journal of Infection Control**, v. 38 (5 Suppl 1), p.S25-33, 2010.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.27, n.4, p. 351–353, 2006.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, n.5, p.736-55, 2011.

ZILBERBERG, M.D.; SHORR, A.F. Ventilator-associated pneumonia: the clinical pulmonary infection score as a surrogate for diagnostics and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, Suppl.1, p.131-5, 2010.

ZYGUN, D.A.; ZUEGE, D.J.; BOITEAU, P.J.; LAUPLAND, K.B.; HENDERSON, E.A.; KORTBEEK, J.B.; DOIG, C.J. Ventilator-associated pneumonia in severe traumatic brain injury. **Neurocritical Care**, v.5, n.2, p.108-14, 2006.

ANEXO I

FICHA INDIVIDUAL DE VIGILÂNCIA – INFECÇÃO POR <i>Acinetobacter baumannii</i>								
Número		Idade		Gênero	Masculino (<input type="checkbox"/>) Feminino (<input type="checkbox"/>)	Data da Inclusão na Pesquisa		
Data de Admissão Hospitalar		Diagnóstico de Admissão						
Data de admissão na UTI		Diagnóstico de Admissão UTI						
Comorbidades								
ANTIBIOTICOTERAPIA								
Antibiótico	Início	Término	Antibiótico	Início	Término	Antibiótico	Início	
Infecções por <i>A. baumannii</i> – coleta de aspirado								
Data	Resultado			Data	Resultado			
Cirurgia		Data	DISPOSITIVOS INVASIVOS					
			(<input type="checkbox"/>) CVC	(<input type="checkbox"/>) VM	(<input type="checkbox"/>) SV	(<input type="checkbox"/>) SNE/SNG	(<input type="checkbox"/>) NPT	Anotações:
EVOLUÇÃO								
ASIS								
CPIS								

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu/sua responsável legal está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “Epidemiologia de PAVs por *Acinetobacter baumannii* resistente ao imipenem em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos, clínico-cirúrgica, de um Hospital Universitário brasileiro”, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Paulo P. Gontijo Filho (coordenador) e executado pela aluna de pós-graduação Sabrina Royer.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender melhor as questões relacionadas com pneumonia quando da utilização de respirador, tais como os agentes responsáveis à sua resistência aos antibióticos e o resultado do tratamento. Não será realizada nenhuma coleta de espécime clínica.

No momento da visita a unidade, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela aluna de pós-graduação Sabrina Royer.

Na oportunidade você/seu (sua) acompanhante será perguntado (a) quanto à liberação de dados tais como: sexo, idade, doenças, tratamento que serão obtidos do prontuário.

O material clínico (secreção traqueal) processado pelo Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU será recuperado e enviado para posterior análise ao Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Bloco 4C, andar superior, localizado na Rua Amazônia, sem número, telefone: 3218-2236. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Não há previsão de que ocorra qualquer risco ao paciente e os benefícios serão o melhor conhecimento dessas pneumonias, melhor tratamento e a possibilidade de adoção de práticas para proteção aos demais pacientes internados na unidade. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

-Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho (Coordenador, ARIMP, UFU)

-Sabrina Royer (Responsável, UFU)

Laboratório de Microbiologia - (034) 3218-2236.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco 1A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38400-098; fone: (34) 3239-4131.

Uberlândia, de de 20 .

Assinatura da responsável

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXO III

Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A – sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

**ANÁLISE FINAL Nº. 735/11 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
228/11**

Projeto Pesquisa: “Epidemiologia de PAVs por Acinetobacter baumannii resistente ao imipenem em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) de adultos, clínico-cirúrgico, de um hospital universitário brasileiro”.

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.
 O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

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

Data de Entrega de Relatório Final: dezembro de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

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

Uberlândia, 10 de novembro de 2011.

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